

Consultation

sur

PLACE uniquement

50376

1984

1

UNIVERSITE DE LILLE - FACULTE DES SCIENCES

THESE

présentée à

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE 3^{ème} CYCLE

par

Alioune SENE



DE PROLIFERATION ET D'ORGANOGENESE
EXPLANTATS RACINAIRES DE CICHORIUM
INTYBUS L. CULTIVES IN VITRO

obtenue en mars 1984 devant la Commission d'Examen

président : M. R. BOURIQUET
rapporteur : M. J. VASSEUR
examinateur : Mlle C. PAUPARDIN

Dest :
Date : 14 MARS 1984
Exp :

ERRATA

Remerciements : 2e ligne. réalisés au lieu de ralisés

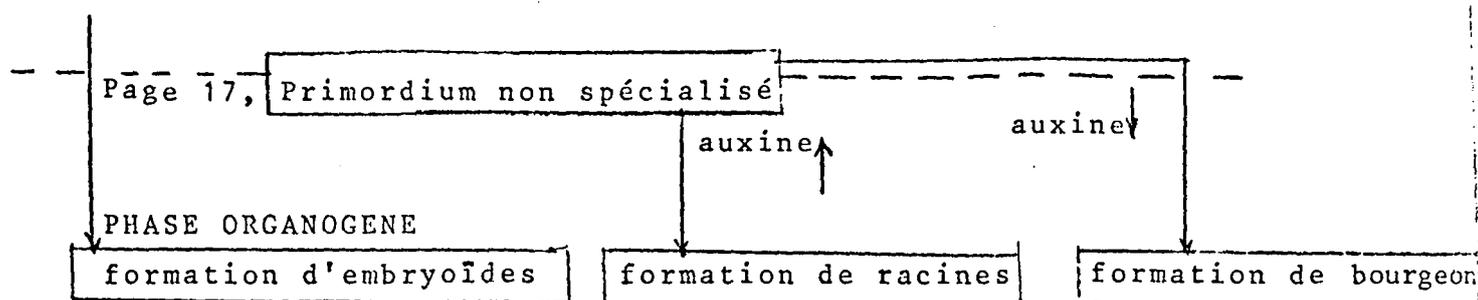
Table des matières : Page 108. IV.2) Transfert sur un "milieu inducteur de racines" (ANA 10^{-6} M, KIN 10^{-7} M, saccharose 1 %).

Abréviations : U.V. Ultra-violet

Page 1, dernière ligne : BLONDEL, 1979 ; ROGER, 1981 ; BACKOULA, 1983

Page 4, dernière ligne : ne pouvaient s'expliquer.

Page 16, 3e ligne : déclenchent



Pages 53 et 55 : lire : astérisques au lieu de astérix

Page 56, Figure 6, 4e ligne; cultivés

Page 77, ligne 27, En l'absence de phosphates, l'addition de l'ion NO_3^- provoque une importante stimulation de la prolifération qui se traduit par une croissance nettement supérieure à celle présente dans la solution de MURASHIGE & SKOOG (1962) (Tableau 24).

BIBLIOGRAPHIE :

Page 136, HALPERIN W., 1964. - Morphogenetic studies with partially synchronised cultures of carrot embryos.

Science, 146, 408-410.

Page 137, JULIEN M., 1974. - La culture *in vitro* de cellules du tissu foliaire d'*Asparagus officinalis* L. : obtention de souches à embryogenèse permanente et régénération de plantes entières.

Page 140, MARETZKI A. et THOM M., 1978. - Characteristics of a galactose adapted sugarcane cell line grown in suspension culture.

Plant Physiol., 61, 544-548.

N° d'ordre : 1146

50376
1984
1

50376
1984
1

UNIVERSITE DE LILLE - FACULTE DES SCIENCES

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE 3ème CYCLE

par

Alioune SENE



**CAPACITE DE PROLIFERATION ET D'ORGANOGENESE
DE PETITS EXPLANTATS RACINAIRES DE *CICHORIUM
INTYBUS L. CULTIVES IN VITRO***

Soutenu en mars 1984 devant la Commission d'Examen

Président :	M.	R. BOURIQUET
Rapporteur :	M.	J. VASSEUR
Examineur :	Mle	C. PAUPARDIN

A MAME BIRAM SENE, Mon père,
en hommage posthume.

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I. ETUDES PHYSIOLOGIQUES	3
1) Auxines-cytokinines	3
2) L'acide gibbérellique	7
3) Les éléments minéraux	7
4) Les glucides	8
5) L'éclairement	9
6) Les radiations	10
7) Composition de l'atmosphère	11
8) L'état physique du milieu	12
9) Lieu de prélèvement	12
10) Nature des tissus	13
11) Composés divers	14
II. ETUDES HISTOLOGIQUES	16
III. ETUDES BIOCHIMIQUES	18
MATERIEL ET METHODES	20
I. MATERIEL VEGETAL	20
1) Stérilisation	20
a) Les racines	20
b) Les graines	20
2) Prélèvement des explantats	21
II. COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE	23
1) Explantats racinaires	21
a) Les éléments minéraux	21
b) Les vitamines	23

	Page
c) Les régulateurs de croissance	23
d) Les composés organiques	23
2) Graines en germination	24
III. CONDITIONS DE CULTURE	24
IV. METHODES DE MESURE	24
1) L'organogénèse	24
2) La callogénèse	25
3) Calculs statistiques	25
V. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES	25
1) Préparation des coupes	25
2) Colorations	26
VI. DOSAGE DES PROTEINES	26
 RESULTATS EXPERIMENTAUX	
PREMIERE PARTIE : CULTURE D'EXPLANTATS RACINAIRES	27
 PREMIER CHAPITRE : ESSAIS PRELIMINAIRES	28
1) Action conjuguée de l'ANA et de la kinétine	28
2) Action conjuguée du 2,4-D et de la kinétine	28
 DEUXIEME CHAPITRE : ETUDE LA RHIZOGENESE	32
I. CHOIX DES CONDITIONS HORMONALES	32
1) Recherche de la dose d'ANA	32
2) Recherche d'une dose optimale de kinétine	34
II. INFLUENCE DE LA TAILLE DES EXPLANTATS ET DU GLUCOSE EXOGENE	34
III. TRANSFERT DES EXPLANTATS SUR DES MILIEUX SANS GLUCOSE	39

	Page
IV. L'INFLUENCE DE L'AG ₃ ET DE LA LUMIERE	39
TROISIEME CHAPITRE : PROLIFERATION DES CULTURES PRIMAIRES	43
I. RECHERCHE D'UN MILIEU DE PROLIFERATION	43
1) Choix d'une dose d'ANA	43
2) Choix d'une dose de kinétine	43
II. ESSAIS D'AMELIORATION DE LA PROLIFERATION	43
1) Action des acides aminés et des vitamines	43
2) Action des glucides et de l'éclairement	47
3) Influence de la concentration en gélose	49
4) Action des régulateurs de croissance	49
a) Action de l'acide gibbérellique et du lait de coco	49
b) Action des auxines et des cytokines	52
5) Influence de l'origine et de la nature des tissus	57
6) Evolution de la croissance des explantats	60
7) Analyse histologique des explantats au cours de la culture	64
8) Expériences de transfert	66
a) Transfert des explantats cultivés initialement en présence du "milieu cal", sur des milieux inducteurs d'organes	66
α) Transfert sur un milieu sans hormones et sans glucides	66
β) Transfert sur un milieu sans hormones mais additionné de glucose	66
γ) Transfert sur un "milieu inducteur de racines"	68
λ) Transfert sur un "milieu inducteur de bourgeons"	68

	Page
b) Influence de la concentration auxinique du milieu initial sur l'organogenèse ultérieure	69
α) Milieu renfermant $5 \cdot 10^{-5}$ M d'ANA	69
β) Milieu renfermant 10^{-6} M d'ANA	69
9) La nutrition minérale	72
a) Action de quelques solutions minérales	72
b) Influence de la concentration ionique totale	75
c) Influence de la nutrition azotée	77
α) Influence de l'ion NO_3^-	77
β) Influence de l'ion NH_4^+	77
d) Action conjuguée des ions NO_3^- et H_2PO_4^-	77
e) Action conjuguée du Ca^{++} et du K^+	82
f) Conclusions	82
DEUXIEME PARTIE : COLONIES TISSULAIRES	
I. ETABLISSEMENT D'UNE COLONIE TISSULAIRE A PARTIR D'EXPLANTATS RACINAIRES	86
1) Composition hormonale du milieu de culture	87
2) Choix de la concentration en saccharose	89
3) Choix de l'âge de la culture primaire	89
II. ETABLISSEMENT D'UNE COLONIE TISSULAIRE A PARTIR DE PLANTULES ASEPTIQUES	91
1) La germination des graines	94
2) La culture <i>in vitro</i>	94
a) Culture de graines	94
α) Avant germination	94
β) En début de germination	94

	Page
b) Culture des racines	97
c) Culture de feuilles	97
α) Feuilles isolées	97
β) Rosettes de feuilles	97
d) Culture de fragment d'hypocotyle	97
e) Conclusions	98
 III. RECHERCHE D'UN MILIEU NUTRITIF POUR L'ENTRETIEN DES COLONIES TISSULAIRES	 98
1) Les substances auxiniques	98
2) La nutrition carbonée	100
a) Influence de la nature des glucides	100
b) Influence de la teneur en glucide	100
3) La nutrition azotée	102
4) Conclusions	106
 IV. CAPACITES ORGANOGENES DES COLONIES TISSULAIRES	 106
1) Transfert sur un "milieu entretien" dépourvu de substances hormonales	108
2) Transfert sur un "milieu inducteur de racines" (ANA 10^{-6})	108
3) Transfert sur des "milieux inducteurs de bourgeons" (BAP associée ou non à l'AIA)	108
4) Obtention de boutures enracinées	110
 DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS	 111
I. RHIZOGENESE	111
II. CALLOGENESE	118
III. COLONIES TISSULAIRES	127
 BIBLIOGRAPHIE	 130

ABREVIATIONS

AG ₃	:	Acide gibbérellique
AIA	:	Acide indolylacétique
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ANA	:	Acide naphtylacétique
ARN	:	Acide ribonucléique
BAP	:	6-benzylaminopurine
°C	:	Degré Celsius
cm	:	Centimètre
EDTA	:	Acide éthylène diamino-tétraacétique
KIN	:	Kinétine
M	:	Molarité
meq/l	:	Milliéquivalent par litre
mg/l	:	Milligramme par litre
mm	:	Millimètre
μM	:	Micromolarité (10 ⁻⁶ M)
M.F.	:	Matière fraîche
M.S.	:	Matière sèche
2,4-D	:	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
UV	:	Ultraviolet

INTRODUCTION

Si les progrès récents réalisés en biologie peuvent contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires, ils laissent également espérer un essor spectaculaire dans le domaine de l'amélioration des espèces végétales, agricoles et horticoles grâce aux méthodes de culture *in vitro*.

Avec des cellules isolées, les contacts cellulaires sont supprimés; au contraire, dans les fragments d'organes, les contacts cellulaires ou tissulaires demeurent et doivent permettre l'expression des programmes morphogènes tels qu'ils se présentent dans les plantes entières.

La technique de culture *in vitro* des tissus, en assurant un meilleur contrôle des facteurs nutritifs et d'environnement, a permis de mettre en évidence les potentialités des cellules végétales, liées aux processus de dédifférenciation et de différenciation cellulaire ou organogène.

L'étude de la néoformation d'un organe végétatif par un fragment d'organe présente alors, l'avantage de pouvoir suivre la formation des méristèmes puis leur développement. Parallèlement, il est possible d'étudier les effets exercés par les régulateurs de croissance sur les phénomènes d'organogenèse. L'amélioration de nos connaissances servira alors, sur le plan pratique, de support à la maîtrise de la multiplication végétative *in vitro*. Sur le plan fondamental, avant de pouvoir analyser à l'échelle moléculaire, les mécanismes qui gouvernent la formation de bourgeons végétatifs ou de racines, il convient de mettre au point des modèles expérimentaux. C'est ce qui a motivé ce travail.

Nous avons choisi d'utiliser la chicorée Witloof qui est une plante régionale et dont la culture *in vitro* de petits explantats issus de la racine a déjà permis de préciser les conditions nécessaires à la réalisation d'un test de bourgeonnement (BLONDEL, 1979, 1981 ; BACKOULA, 1983).

Nous nous sommes donc proposé ici, de définir une condition expérimentale permettant l'analyse ultérieure des phénomènes de rhizogenèse. Cela suppose de mettre en place une méthodologie rigoureuse qui permette d'obtenir une réponse uniforme. Cela signifie également, que l'on maîtrise suffisamment les facteurs mis en jeu pour assurer une reproductibilité satisfaisante d'une expérience à l'autre. Si l'on sait par ailleurs, que les phénomènes d'organogenèse *in vitro* dépendent d'un système complexe de facteurs endogènes et exogènes, réagissant entre eux, on peut entrevoir les difficultés qui peuvent se présenter.

De plus, nous avons analysé les conditions nécessaires à l'obtention, sur les explantats primaires, d'un cal sans manifestation organogène. Ce sera une "condition témoin" qui servira de référence dans l'étude des manifestations organogènes et à partir de laquelle nous avons envisagé les possibilités d'installation d'une colonie tissulaire.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Des progrès remarquables ont été réalisés dans le domaine de la culture des tissus végétaux depuis que NOBECOURT (1939), GAUTHERET (1939) et WHITE (1939a) ont réalisé pour la première fois la culture indéfinie des tissus végétaux. La culture *in vitro* qui permet de travailler en conditions aseptiques et dans un environnement contrôlé, s'est montrée un excellent outil pour l'étude des phénomènes d'organogenèse. Les découvertes auxquelles elle a donné lieu sont actuellement exploitées en agriculture et en amélioration des plantes. Les travaux qu'elle a suscités sont extrêmement nombreux.

Nous nous limiterons à rappeler ceux qui concernent l'organogenèse végétative des tissus de *Cichorium Intybus* en évoquant simplement au passage certains résultats obtenus avec d'autres espèces végétales, par exemple le tabac.

I - ETUDES PHYSIOLOGIQUES

L'exceptionnelle aptitude des tissus de la racine de chicorée Witloof à former des bourgeons est connue depuis longtemps (SCHOUTEDEN-WERY, 1922) et les premiers essais de culture *in vitro* de ces tissus sont anciens. C'est GAUTHERET (1941a) qui le premier observe que des fragments de racines cultivés sur des milieux nutritifs additionnés de sucre se développent de manière exubérante, produisant à la fois des racines et des bourgeons. Un tel pouvoir d'organogenèse laissant peu d'espoir à la réussite de la culture indéfinie.

1) Auxines - cytokinines

En faisant agir différents composés auxiniques GAUTHERET (1941b) note que les explantats réagissent de manière particulière à l'action de l'ANA. En effet, à la concentration de 5.10^{-8} M, cette substance augmente le volume des cals et réduit le nombre des bourgeons néoformés. Une dose supérieure tout en renforçant les effets précédents, favorise la production de racines et en présence de 5.10^{-6} M d'ANA, le développement des bourgeons est totalement inhibé alors que les tissus forment des cals énormes portant cependant encore quelques racines. L'AIA bien que provoquant les mêmes effets est toutefois moins actif. GAUTHERET (1941b) constate également que

la formation du cal est polarisée car il se développe uniquement sur la partie distale et que les bourgeons apparaissent presque exclusivement sur la partie située en dehors du milieu de culture quelle que soit l'orientation du fragment lors de l'ensemencement. Cette aptitude à former spontanément des bourgeons à la face proximale des explantats, et des racines à la face distale fait de la chicorée Witloof un matériel de choix pour l'étude des phénomènes d'organogenèse (Schéma 1). Ultérieurement il montre que le degré d'inhibition de la formation des organes dépend à la fois de la nature et de la concentration auxinique ainsi que de l'orientation des fragments (GAUTHERET, 1947, 1959). La polarité des tissus est en relation avec les substances hormonales endogènes (CAMUS, 1949 ; WARMKE et WARMKE, 1950). Ces chercheurs mettent en évidence une concentration en auxine plus faible dans la zone proximale que dans la zone distale ainsi qu'une réduction de la teneur en auxine jusqu'au moment de l'initiation des bourgeons. Par la suite, VARDJAN et NITSCH (1961) démontrent qu'il existe un gradient de répartition des substances de croissance le long de la racine de *Cichorium Intybus* caractérisé par une teneur relativement basse en auxine dans la région proximale voisine du collet et des concentrations plus élevées lorsqu'on s'en éloigne. A l'inverse, les cytokinines diminuent lorsqu'on passe de la partie proximale à la partie distale (Figures 1 et 2). La polarité du bourgeonnement s'explique par une polarité biochimique et les tissus de chicorée présentent des réponses physiologiques qui sont conformes au schéma de la "balance hormonale" proposée par SKOOG et MILLER (1957) pour expliquer les phénomènes d'organogenèse des tissus de tabac. Un rapport auxine/cytokinine élevé orientant l'organogenèse vers la formation de racines alors que lorsqu'il est bas c'est la formation des bourgeons qui est favorisée. En effet, TOPONI (1963 a et b) observe sur des fragments foliaires de *Cichorium Intybus* que la rhizogenèse, très importante aux fortes doses d'AIA, est réduite par des concentrations également élevées de kinétine et que parallèlement, le bourgeonnement induit par la kinétine est diminuée par des doses importantes d'AIA. Ces résultats sont en accord avec les travaux menés par GWOZDZ et SZWEYKOWSKA (1967) sur des explantats racinaires.

Il est apparu cependant que les phénomènes d'organogenèse ne pouvait s'expliquer par le seul équilibre entre ces

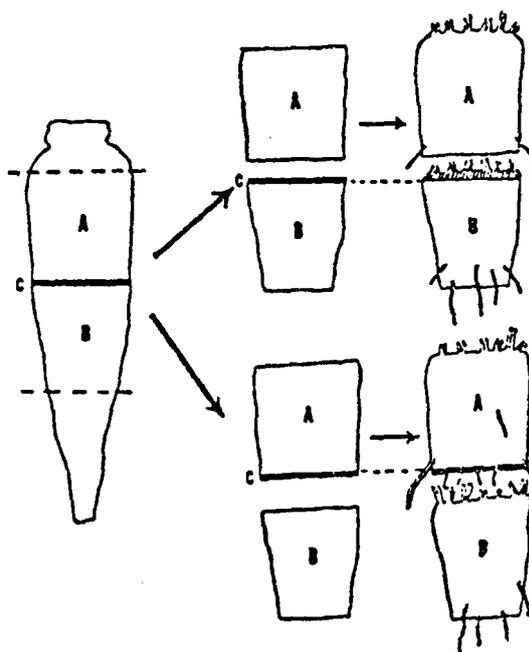


Schéma 1 : Une zone cellulaire (c) située au milieu de la racine de chicorée (gauche) peut être orientée vers deux voies : si le prélèvement est effectué de manière que la zone C se trouve située au sommet du fragment B, elle produira des bourgeons (en haut, à droite) ; si le prélèvement est réalisé de manière que la zone C se trouve située à la base du fragment A, la même zone produira des racines. (D'après NITSCH J.P., 1966).



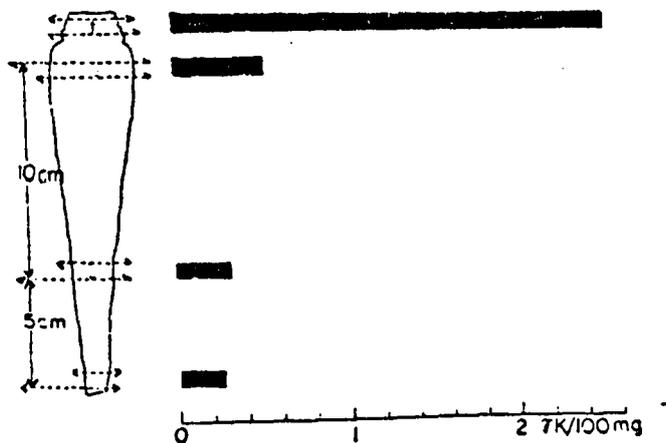


Figure 1 : Distribution de la teneur en cytokinine au niveau de la tige (t) et le long de la racine de chicorée, exprimée en μg de kinétine par 100 mg de matière sèche. (D'après VARDJAN et NITSCH, 1961).

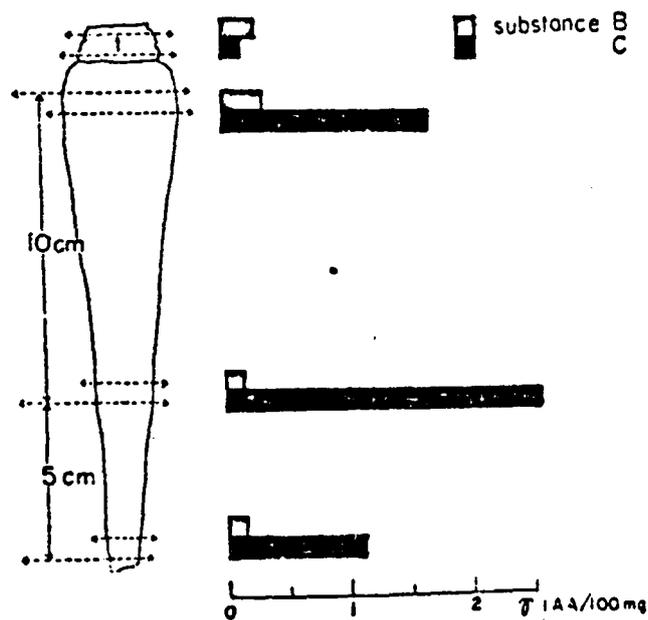


Figure 2 : Distribution dans la tige (t) et la racine de chicorée, de deux substances actives sur le test d'avoine. Les activités biologiques sont exprimées en équivalents de μg d'IAA par 100 mg de matière sèche. (D'après VARDJAN et NITSCH, 1961).



régulateurs de croissance et qu'un grand nombre d'autres facteurs participent à leur régulation.

2) L'acide gibbérellique

L'AG₃ n'a pas d'influence sur la néoformation spontanée de bourgeons par les tissus racinaires de *Cichorium Intybus*, mais il réduit la caulogénèse induite par la kinétine (BESSEMER, 1968). IL exerce également une action similaire sur les fragments de feuilles vertes sans affecter cependant la formation des racines (BESSEMER, 1969).

Sur des fragments de feuilles étiolées, VASSEUR (1978) constate que de faibles doses d'AG₃ n'exercent pas d'effet notable sur la caulogénèse mais stimulent légèrement la formation des racines et qu'au delà de 10⁻⁵M, l'inhibition de l'organogénèse est totale.

D'autre part SENE et Coll. (1983) montrent qu'en associant l'ANA et la kinétine à l'AG₃, celui-ci stimule la rhizogénèse des explantats racinaires.



Ces résultats semblent indiquer que l'AG₃ ne présente pas à lui seul un effet particulier sur les processus d'organogénèse, mais lorsqu'il est associé avec les auxines, il renforce l'action stimulante ou inhibitrice de ces composés. Ce qui suggère que l'AG₃ intervient au niveau du métabolisme auxinique.

Dans le cas des cals de tabac, il a été montré que les gibbérellines inhibent l'organogénèse (MURASHIGE 1961, 1964). Cette inhibition porterait sur la réduction de la quantité d'amidon accumulée dans les tissus et qui sert de réserve énergétique lors des premiers stades de l'organogénèse (THORPE et MURASHIGE, 1968, 1970 ; ROSS et Coll., 1973 a et b).

3) Les éléments minéraux

La composition minérale des milieux nutritifs joue un rôle important sur le développement des fragments racinaires de

chicorée (ROGOZINSKA, 1961). Ainsi l'absence d'azote et de phosphate stimule leur rhizogénèse. Des doses relativement basses en ces éléments sont par contre favorables au bourgeonnement alors que des teneurs élevées provoquent l'inhibition totale de l'organogénèse et l'augmentation de la prolifération cellulaire (GWOZDZ et SZWEYKOWSKA, 1969). Par ailleurs, il apparaît que les nitrates (> 10 meq/l) sont indispensables à l'initiation florale *in vitro* des bourgeons néoformés car leur absence assure le maintien de l'état végétatif (MARGARA et Coll, 1966).

Parmi les autres éléments, il semble que seul l'effet exercé par les ions Mg^{++} aux concentrations élevées (16 meq/l) soit net. Cet élément se révèle également très favorable au développement des bourgeons néoformés par les tissus racinaires surtout lorsqu'il est associé aux nitrates. Appliqué aux racines en cours de forçage hydroponique, il permet d'accroître la production de "chicons" (LEFEBVRE, 1980).

Un autre élément, le fer, sous forme chélatée ou non, est capable de stimuler le bourgeonnement (LEGRAND, 1975). La présence d'EDTA modifie cependant la caulogénèse car si ce composé facilite l'utilisation des sels de fer, il devient rapidement toxique à fortes doses. L'efficacité de ce chélateur est d'ailleurs plus marquée à la lumière qu'à l'obscurité.

4) Les glucides

Les fragments de racine de chicorée cultivés *in vitro* sont capables de produire des bourgeons en n'utilisant que leurs propres réserves. L'apport de glucides exogènes favorise la prolifération cellulaire mais réduit d'autant plus le bourgeonnement que la dose des glucides est plus forte (LEFEBVRE et YAMEOGO, 1976 ; ROGER et VASSEUR, 1983).

Un autre effet des glucides exogènes est de favoriser le maintien de fortes teneurs en glucides solubles dans les tissus (LEFEBVRE, 1979). Ce qui expliquerait les phénomènes de brunissement souvent observés, et qui envahissent les cultures lorsque le milieu nutritif renferme des concentrations de sucre élevées (BLONDEL, 1979 ; GWOZDZ et SZWEYKOWSKA, 1967 ; SENE, 1981).

Par ailleurs, l'apparition au sein des explantats racinaires de la chicorée Witloof de zones fortement amylofères sous les zones d'initiation des bourgeons (RANCILLAC, 1973) suggère qu'il existe une relation entre amylogenèse et différenciation comme cela a déjà été signalé pour les tissus de tabac (ROSS et Coll., 1973).

Les glucides (glucose et saccharose) exogènes peuvent cependant stimuler la rhizogenèse de fragments racinaires de chicorée (SENE et Coll., 1983).

Ces résultats mettent donc en évidence le rôle métabolique et énergétique des glucides dans les phénomènes d'organogénèse. Il est possible cependant qu'ils interviennent également sur la pression osmotique comme cela a été montré sur les tissus de tabac. BROWN et Coll. (1979) observent en effet que si le saccharose à la dose de 30g/l est favorable à la néoformation des bourgeons, des concentrations plus faibles provoquent une diminution très nette du nombre des organes formés. Un apport de mannitol correspondant à une pression osmotique du milieu égale à celle obtenue par l'addition de saccharose à 3 % est sans effet. Mais si l'on diminue au 1/3 la concentration en saccharose, et que l'on ajoute du mannitol pour obtenir une pression osmotique égale à celle obtenue pour 3 % de saccharose la néoformation des bourgeons est rétablie.

5) L'éclairement

La lumière n'est pas indispensable à la formation des bourgeons par les tissus racinaires de chicorée (GAUTHERET, 1942). Toutefois à l'obscurité, leur morphologie est profondément modifiée, les feuilles restent petites, à l'état d'écaillés blanchâtres appliquées étroitement contre la tige qui se développe de manière anormale. Au contraire, à la lumière, la tige reste très courte, les feuilles verdissent et se développent vigoureusement (BOURIQUET, 1966). L'absence de lumière se traduit au niveau cellulaire par un ralentissement des processus de différenciation, ce qui expliquerait la baisse

du nombre des bourgeons et le retard observé dans leur apparition (RANCILLAC, 1973).

Les conditions initiales d'éclairement semblent cependant modifier ce processus. En effet l'application d'une période lumineuse au début de la culture de fragments de feuilles étiolées a pour effet de diminuer la néoformation caulinaire (LEGRAND, 1972).

Inversement si les tissus sont d'abord placés à l'obscurité avant d'être soumis à un éclairage continu, la stimulation est particulièrement nette pour une période obscure de trois jours. La lumière, quoique ayant dans l'ensemble un effet favorable, exerce donc pendant les trois premiers jours de culture, une action néfaste sur le bourgeonnement. D'autre part, LEGRAND (1974) constate que la lumière inhibe ou stimule le bourgeonnement selon qu'elle est appliquée avant ou après le sixième jour de culture qui correspond à la date d'apparition des ébauches de bourgeons.

Dans les conditions d'éclairement alterné, jour-nuit (12h/12h), les tissus racinaires cultivés sur un milieu dépourvu de sucre, synthétisent des quantités appréciables de chlorophylle avant même que les bourgeons ne se forment (LEFEBVRE, 1979). Les explantats exposés à la lumière sont donc capables d'utiliser rapidement le gaz carbonique de l'atmosphère en tant que source supplémentaire de carbone.

6) Les radiations

La radiosensibilité des tissus foliaires de *Cichorium Intybus* a été étudiée par BOURIQUET et COUVEZ (1967). Ils trouvent que le traitement aux rayons X provoque aux faibles doses une augmentation du nombre et de la taille des bourgeons. Pour des irradiations prolongées, il y a une inhibition qui est accompagnée souvent d'un retard de l'expression caulogène.

Sur des cals de tabac, SEIBERT et Coll. (1975) trouvent que les rayons UV présentent des effets variables selon l'intensité du rayonnement. Si l'intensité est basse, il y a stimulation

du bourgeonnement et de la prolifération cellulaire alors que si elle est élevée, ces processus sont inhibés.

7) Composition de l'atmosphère

Les fragments racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés *in vitro* produisent davantage de bourgeons lorsqu'ils séjournent après la mise en culture, sous faible tension d'oxygène (LEFEBVRE, 1964). La stimulation est cependant plus importante en présence de 2 % d'O₂ que dans l'azote pur, de même lorsque le traitement est effectué avant l'apparition des ébauches caulinaires (LEFEBVRE, 1970).

En l'absence de l'O₂, les tissus produisent de l'éthanol, celui-ci diffuse en grande partie dans le milieu de culture et peut, si la concentration est trop élevée, empêcher définitivement le développement des bourgeons en inhibant la protéogénèse (LEFEBVRE, 1971a). Une faible quantité d'éthanol (0,1 %), par contre, favorise la néoformation des ébauches caulinaires; cette action n'est pas spécifique puisqu'elle s'observe aussi en présence d'autres alcools (méthanol, butanol I, propanol I) (LEFEBVRE, 1971b).

Cependant, le bourgeonnement est totalement inhibé lorsque les explantats sont privés d'oxygène pendant plus d'une semaine après l'ensemencement même s'ils sont replacés ensuite dans des conditions ordinaires.

La stimulation du bourgeonnement en conditions anaérobies aurait pour cause, une accumulation d'éthanol lors des processus fermentaires. La réoxygénation même faible des tissus permet alors la transformation de cet alcool en acétaldéhyde puis en éthylène, composé produit naturellement par les végétaux et dont les nombreuses propriétés physiologiques l'on fait considérer comme un véritable régulateur de croissance (PHAN, 1971). Ainsi, par exemple, un traitement de courte durée par l'éthylène à 1/10 000e au début de la culture (entre le 3e et le 7e jour), stimule le bourgeonnement des fragments racinaires de chicorée (BOURIQUET, 1972). L'éthane par contre diminue la capacité organogène des tissus et peut même s'opposer à l'action stimulante de l'éthylène (LEFEBVRE, 1978).

8) L'état physique du milieu

WHITE (1939b) rapporte le premier la possibilité de contrôler l'organogenèse *in vitro* en observant que les cals de tabac (hybride de *Nicotiana glauca-Nicotiana langsdorffii*) ne produisent pas d'organes lorsqu'ils sont placés sur un milieu gélosé alors qu'ils forment des bourgeons lorsqu'ils sont immergés dans un milieu liquide.

L'importance de l'état physique du milieu nutritif a également été mise en évidence à propos de l'induction florale de tissus de *Cichorium Intybus* cultivés *in vitro* par BOUNIOLS et MARGARA (1968). Ils observent que les bourgeons néoformés demeurent à l'état végétatif lorsque les explantats racinaires sont cultivés sur un milieu nutritif liquide (support de papier filtre). A l'inverse, la solidification par la gélose -toutes les autres conditions étant égales par ailleurs- induit un passage rapide du développement des bourgeons vers l'état inflorescentiel. BOUNIOLS (1968) précise que ce n'est pas la composition chimique du support qui est responsable mais bien l'état physique, solide ou liquide. Ces chercheurs attribuent l'effet du milieu liquide à l'hydratation excessive des tissus qui se manifeste par la formation d'un cal hyalin et de limbes foliaires à bord peu découpé et à pilosité réduite. Alors que sur un milieu gélosé, le cal obtenu est compact et les feuilles sont poilues et dentées.

Des travaux ultérieurs permettent à BOUNIOLS et MARGARA (1971) d'observer des différences dans la composition en acides aminés d'explantats racinaires placés soit sur un milieu liquide, soit sur un milieu gélosé, ce qui suggère une incidence du support sur la synthèse protéique.

Sur des tissus foliaires, VASSEUR (1978) montre que le milieu liquide est non seulement défavorable à la formation des bourgeons, mais encore qu'il réduit le nombre des explantats capables de proliférer et retarde l'apparition du cal. Il signale en outre que le milieu gélosé lui-même inhibe dans certaines conditions la prolifération et la néoformation des bourgeons.

9) Lieu de prélèvement

Les petites feuilles situées au centre du bourgeon étioilé (chicon) de la chicorée Witloof, se montrent les plus organo-

gènes vraisemblablement parcequ'elles sont plus jeunes (VASSEUR, 1966 ; BOURIQUET et VASSEUR, 1966). D'autre part, les explantats prélevés à la pointe de ces feuilles produisent davantage de bourgeons que ceux de la base bien que l'analyse histologique met en évidence un degré de différenciation sensiblement identique (VASSEUR, 1965).

De manière similaire, MARGARA et Coll. (1966) préconisent l'utilisation de la région médiane de la racine de chicorée qui représente un équilibre entre les capacités rhizogènes et caulogènes des parties distale et proximale .

10) Nature - des tissus

Il apparaît cependant que la nature des tissus cultivés est tout aussi importante que le lieu de prélèvement des explantats. Ainsi RANCILLAC (1973) montre que les tissus de la zone périphérique des explantats racinaires cultivés sur un milieu minéral additionné de saccharose (45 g/l) sont incapables de régénérer des bourgeons alors que ceux de la zone centrale forment des bourgeons avec cependant une intensité moindre que les tissus de la zone cambiale. Il remarque également que contrairement aux tissus isolés de la moelle de tabac qui ne prolifèrent et ne produisent des bourgeons qu'en présence d'éléments vasculaires ou de substances de croissance (JABLONSKI et SKOOG, 1954), les fragments de phloème isolés de la racine de chicorée, même placés dans ces conditions, ne présentent aucune manifestation de croissance. Cette incapacité semble cependant provenir d'un mauvais état de conservation de la zone externe du phloème caractérisée en particulier, par un grand nombre de cellules senescentes et de méats intercellulaires. En effet l'aptitude particulière à la caulogenèse des cellules du phloème voisines des laticifères est connue depuis les travaux de BUVAT (1945). GAUTHERET (1959) constate également que sur un fragment de phloème ayant été cultivé sur un milieu dépourvu de substance stimulante, les cordons libériens et les laticifères prolifèrent non seulement en surface mais aussi jusqu'à une certaine profondeur pour donner des massifs parenchymateux contenant souvent des formations cribrovasculaires. L'analyse cytologique permet à BUVAT (1944) de constater que les plastes des cellules des laticifères sont moins différenciés que ceux des cellules parenchymateuses banales ce qui permet d'expliquer le pouvoir de prolifération supérieur des cellules des laticifères.

Cependant, il est permis de supposer que les vaisseaux, les canaux sécréteurs et les cordons libériens renferment des substances de division. Cette interprétation est corroborée par le fait que des fragments de moelle de tabac (JABLONSKI et SKOOG, 1954) qui sont incapables de proliférer spontanément, manifestent au contraire une grande activité lorsqu'ils sont associés à du xylème.

Il se pourrait enfin que la discontinuité intertissulaire qui existe au niveau de ces diverses formations stimule la multiplication des cellules (GAUTHERET, 1959). Cette hypothèse s'appuie sur le fait que le contact de deux tissus de nature différente provoque souvent une prolifération aboutissant à la néoformation de cambium.

11) Composés divers

En dehors des régulateurs de croissance, de nombreuses substances peuvent également affecter les phénomènes d'organogenèse. Ainsi l'acide diphénylacétique exerce sur le développement des bourgeons de chicorée une action semblable à celle de l'AIA (BERTOSI, 1950) alors qu'un antibiotique comme la kanamycine présente une action dépressive marquée sur le développement des bourgeons (RAMBOUR et MONTUELLE, 1963). Il a été montré également que certains composés phénoliques pouvaient stimuler le bourgeonnement (LEE and SKOOG, 1965) ou la rhizogenèse (RUCKER et PAUPARDIN, 1969) des cals de tabac.

En 1971, BAGNI et FRACASSINI mettent en évidence l'action inhibitrice de dérivés de coumarines sur l'organogenèse et la croissance de tissus racinaires de chicorée. L'activité de ces composés dépend de la position et de la nature des radicaux substitués sur la molécule. Par ailleurs, VASSEUR (1978) rapporte que le développement des cals sur des fragments foliaires de *Cichorium Intybus* ne semble pas modifié par l'addition de bases d'acides nucléiques dans le milieu de culture. Sur la formation des bourgeons, c'est l'adénine qui se montre la plus favorable suivie par l'uracile

et la thymine. Le traitement des tissus avec des analogues structuraux comme l'hydrazide maléique inhibe à la fois la prolifération cellulaire et la formation des bourgeons. Cette inhibition peut cependant être levée par l'uracile (GAUTHERET, 1952 ; VASSEUR, 1978). Ces résultats qui mettent en évidence le rôle important du métabolisme nucléique sur les phénomènes de prolifération cellulaire et d'organogénèse permettent de relier les processus morphogénétiques à des transformations biochimiques.

II - ETUDES HISTOLOGIQUES

Le prélèvement d'un fragment d'organe et sa mise en culture déclenche de nombreuses modifications structurales qui concourent à la division cellulaire puis à la néoformation des organes.

Le début de la prolifération est marquée par la formation d'une zone génératrice superficielle. Plus tard apparaît une seconde zone génératrice dans la profondeur des tissus qui produit vers l'intérieur du parenchyme vasculaire dans lequel se différencient des vaisseaux et vers l'extérieur du parenchyme libérien dans lequel se forment des laticifères (GAUTHERET, 1941b).

BUVAT, (1944) a montré que la néoformation des bourgeons sur la racine de chicorée se déroule en plusieurs étapes : des groupes de cellules subissent progressivement un rajeunissement de leurs structures jusqu'à un stade ultime comparable à celui que l'on observe dans les cellules des méristèmes primaires. Ce stade doit être atteint pour que l'organogenèse puisse avoir lieu. Dans le cas des tissus foliaires de *Cichorium Intybus*, de telles formations ne semblent pas avoir pour origine des cellules spécialisées particulières (TOPONI, 1963a ; VASSEUR, 1965 ; PROFUMO, 1967 ; PROFUMO et DAMERI, 1969). Sur les explantats racinaires, deux sites principaux ont été mis en évidence (RANCILLAC, 1973). Le premier est localisé dans le parenchyme ligneux et se forme à partir de cellules entourant les trachéïdes, l'autre, le plus important, se situe dans le phloème néoformé, situé dans le prolongement des éléments conducteurs préexistants, lors de la reprise d'activité intense du cambium.

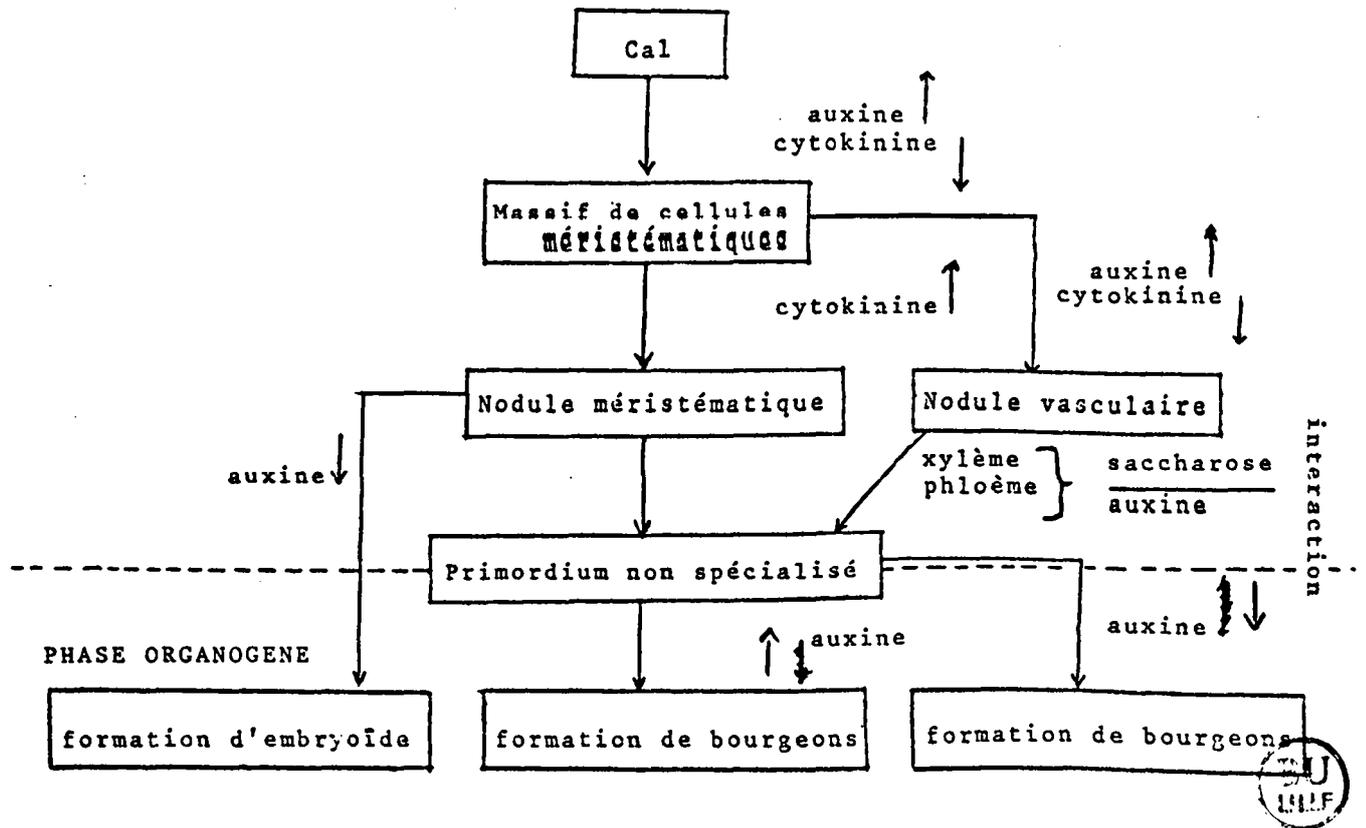
Les trachéïdes néoformés s'entourent alors d'une zone génératrice avant de former des faisceaux cribrovasculaires aux environs du 3e jour de culture. L'évolution en méristèmes caulinaires est rapide et l'émergence des premiers bourgeons intervient vers le 8e jour (ROGER, 1981).

Les bourgeons prennent naissance le plus souvent à la périphérie mais également en profondeur à partir du cambium, du phloème (BUVAT, 1945 ; CAMUS, 1949) et du parenchyme vasculaire (COUILLEROT et Coll., 1978). Des observations similaires ont été faites chez le tabac par STERLING (1951)

Les données dont on dispose sur les événements histologiques qui concourent à la naissance d'une structure organisée peuvent être regroupées selon le schéma élaboré par GRESSHOFF (1978) (schéma 2).

SCHEMA GENERAL DE L'ORGANOGENESE

(selon GRESSHOFF, 1978)



NB : ↑ et ↓ expriment les teneurs élevées ou faibles en régulateurs de croissance

En présence d'auxine et de cytokinine, on observe au sein des cals, des cellules en division active qui se groupent en massifs méristématiques évoluant soit en nodules cribrovasculaires renfermant du phloème, du xylème et du cambium, soit en nodules méristématiques. Selon les conditions de culture (teneur en auxines et en glucides notamment), il apparait alors des primordiums non spécialisés qui servent de point de départ soit à la caulogenèse soit à la rhizogenèse.

III - ETUDES BIOCHIMIQUES

L'utilisation des techniques biochimiques et histochimiques a contribué à une meilleure compréhension des événements métaboliques qui accompagnent les processus morphogénétiques. C'est ainsi que l'augmentation de la teneur en RNA peut être considérée comme un des premiers signes d'activation précédant les phénomènes de division cellulaire et de différenciation organogène sur les explants de feuilles étiolées de chicorée en culture *in vitro* (VASSEUR, 1978).

Des observations similaires ont été réalisées par ROGER et VASSEUR (1983) sur les tissus racinaires de la même plante. L'activation cellulaire serait liée à une synthèse précoce d'ARN spécifique qui permet celle des protéines de structure et des protéines enzymatiques nécessaires à la duplication de l'ADN puis à la division.

Sur un autre plan, BOUNIOLS et Coll. (1973) rapportent que la photopériode peut également se répercuter au niveau du métabolisme des acides aminés et des protéines enzymatiques puisque l'édification des nodules méristématiques (du 1er au 8e jour) au sein des explants de la racine de *Cichorium Intybus* est accompagnée d'une diminution de la teneur en acides aminés libres alors que la différenciation végétative des méristèmes se traduit, à la lumière, par une accumulation d'acides aminés libres, en particulier l'arginine, l'acide glutamique et l'acide aspartique. Cette évolution s'oppose à celle observée dans les tissus cultivés à l'obscurité dans lesquels des teneurs élevées en aminoacides libres n'apparaissent qu'au 14e jour de la culture.

Par ailleurs, il est établi que l'activité peroxydasique de ces tissus cultivés *in vitro* est plus forte à l'obscurité qu'à la lumière. Le transfert de l'obscurité à la lumière se traduit par une diminution de l'activité enzymatique et vice et versa (LEGRAND, 1974). L'éclairement favorisant la synthèse de composés phénoliques (acide caféique et acide chlorogénique), ce chercheur pense que la lumière contrôle l'activité peroxydasique par l'intermédiaire des composés phénoliques (LEGRAND et Coll. 1976 ; LEGRAND, 1977).

Dans les tissus racinaires de chicorée cultivés en absence d'hormone, il y a une exaltation de l'activité peroxydasi- que lors de la mise en place des méristèmes et leur développement en pousses feuillées (NAKANISHI, 1979). Par contre, la prolifération cellulaire de ces tissus en présence d'AIA (10 mg/l) est caractérisée par une forte réduction de l'activité des peroxydases ainsi d'ailleurs que celle d'autres enzymes telles que la ribonucléase et la phosphatase (GWYDZ, 1973 ; SOBCZYK, 1976).

GORDON et FLOOD (1979, 1980) signalent également que l'induction du cal par une dose élevée de 2,4-D (10^{-5} M) provoque une considérable hydratation des tissus qui est associée à l'hydrolyse de l'inuline en fructosanes et en sucres réducteurs de poids moléculaire plus faible ainsi que par une importante augmentation de l'activité invertasique. Récemment DORCHIES (1984) a mis en évidence sur des cultures de tissus racinaires ou foliaires de chicorée Witloof, une activité nitrate réductasique qui après une phase de latence de 6 heures, présente un optimum vers le 2ème jour de la culture.

Cette revue bibliographique souligne la grande diversité des facteurs de croissance qui agissent sur la néoformation des bourgeons. L'organogenèse dépend davantage d'un équilibre de facteurs stimulants ou inhibiteurs plutôt que d'un facteur spécifique unique. Il fallait donc définir et quantifier les éléments intervenant dans un tel équilibre. Ensuite, on constate que la majorité des travaux effectués à partir des tissus de la chicorée Witloof portent sur le bourgeonnement alors que les phénomènes de rhizogenèse et de prolifération cellulaire n'ont suscité que peu d'intérêt.

Le plan de ce travail est donc tracé. Nous préciserons d'abord les facteurs qui déterminent la néoformation des racines puis nous analyserons les capacités de prolifération des explantats racinaires pour finalement étudier les possibilités d'obtention d'une colonie tissulaire.

MATERIEL ET METHODES

I - MATERIEL VEGETAL

Les plantes de *Cichorium Intybus* L. variété WITLOOF, cultivar "Zoom" se sèment au printemps de début avril à fin juin dans le nord de la France. Les racines sont mûres c'est-à-dire aptes à produire un "chicon" de bonne qualité vers la première quinzaine du mois d'août pour les variétés les plus hâtives. La récolte se poursuit jusqu'au début du mois de mai. A ce stade, les racines sont arrachées et privées de leurs feuilles. Elles sont alors conservées à une température de 4° C en chambre froide.

1) Stérilisation

a) Les racines

Au moment de leur utilisation, les racines préalablement épluchées sont stérilisées par immersion dans une solution d'hypochlorite de calcium ($(ClO)_2Ca$, 115-120° chlorométrique) à 14 %, pendant 25 minutes, puis rincées par trois bains successifs d'eau stérile de 5, 10 et 15 minutes respectivement.

b) Les graines

Afin de produire des plantules aseptiques, les graines sont traitées dans trois bains successifs à propriété bactéricide ou fongicide

- . mercryl-laurylé à 10 % (10 minutes)
- . éthanol 70° (5 minutes)
- . hypochlorite de calcium à 9 %
+ (15 minutes)
mercryl-laurylé à 5 %

Elles sont ensuite rincées par trois lavages à l'eau distillée stérile d'une durée de 10, 15 et 30 minutes respectivement.

2) Prélèvement des explantats

Après la stérilisation des racines, des sections cylindriques sont alors prélevées au niveau de la zone génératrice à l'aide d'un emporte-pièce de 6 mm de diamètre, selon la technique de MARGARA et Coll. (1966).

Les explantats utilisés sont généralement de faibles dimensions (2 mm de longueur) ; ils permettent du fait de la réduction des corrélations internes, une meilleure analyse des effets occasionnés par des changements de milieu de culture ou des conditions d'environnement.

Nous n'avons utilisé habituellement que la partie médiane de la racine, en éliminant la pointe et le collet, afin d'éviter les variations dues au gradient d'hormones endogènes (WARMKE et WARMKE, 1950 ; VARDJAN et NITSCH, 1961).

II - COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

1) Explantats racinaires

Les milieux nutritifs utilisés renferment des éléments minéraux, des vitamines, des régulateurs de croissance, des substances organiques et divers produits naturels complexes. L'addition ou non de glucides dépend du type de culture à réaliser. A l'exception de ceux utilisés pour la culture en milieu liquide tous les milieux nutritifs sont solidifiés par la gélose (agar-agar pour bactériologie, BLOKAR, type E). Leur pH est toujours ajusté à 5,5 à l'aide d'une solution de soude, (NaOH, 0,1 N), ou d'acide chlorhydrique (HCl, 1N). Ils sont ensuite stérilisés par autoclavage à 110° C pendant 20 minutes.

a) Les éléments minéraux

Les solutions minérales que nous avons utilisées sont celles de HELLER (1953) et de MURASHIGE et SKOOG (1962).

IONS	WHITE (1943)	HELLER (1953)	GAUTHERET (KNOPx1/2) (1959)	MURASHIGE & SKOOG (1962)	ERIKSSON (1965)	MARGARA & COLL (1966)	GAMBORG & COLL (1974)	NITSCH & NITSCH (1956)	LESCURE (1969)	SCHENK & HILDEBRANDT (1972)
NO ₃ ⁻	3,24	7,06	5,48	39,43	33,8	48	25,0	19,8	21	25,0
H ₂ PO ₄ ⁻	0,14	0,9	0,92	1,25	2,50	2	1,1	1,81	6,5	2,6
SO ₄ ⁻	8,8	2,04	1,02	3	3	6	4,0	2,04	1,44	3,24
Cl ⁻	0,9	11,09	-	6	6	-	2,0	20,47	0,9	2,72
Total Anions m Eq/L	12,98	21,15	7,41	49,7	45,3	56	32,1	50,0	31,60	33,60
K ⁺	1,7	10,07	2,16	20,6	21,3	22	25,0	20,06	26	25,0
Na ⁺	2,94	7,96	-	-	-	24	1,1	-	0,5	-
Mg ⁺⁺	6	2,04	1,02	3	3	6	2,0	3	1,44	3,24
Ca ⁺⁺	2,44	1,02	4,24	6	6	4	2,0	6	3,66	2,72
NH ₄ ⁺	-	-	-	20,62	15,0	-	2,0	20,62	-	2,6
Total Cations m Eq/L	12,98	21,15	7,41	49,7	45,3	56	32,1	50,0	31,60	33,6



Tableau 1 : Composition ionique (meq/l) des solutions minérales utilisées

Des essais comparatifs avec d'autres solutions minérales ont cependant été entrepris. Le tableau 1 indique leurs concentrations ioniques respectives.

b) Les vitamines

Nous avons employé la solution de vitamines préconisée par MURASHIGE et SKOOG (1962) à laquelle nous avons additionné d'autres vitamines : la biotine, l'inositol et l'acide folique. (Tableau 2).

VITAMINES PRECONISEES par	CONCENTRATIONS	
	mg/L	µM/L
1- <u>MURASHIGE et SKOOG</u>		
Thiamine - HCl (B1)	0,1	0,29
Pyridoxine - HCl (B6)	0,5	2,43
Acide nicotinique	0,5	4,05
2 - <u>ADDITIONNELLES</u>		
Biotine	0,05	0,20
Inositol	100,00	555,00
Acide folique	0,5	1,13

Tableau 2 : Concentrations des solutions vitaminiques utilisées.

c) Les régulateurs de croissance

Nous avons couramment utilisé l'acide naphtylacétique (ANA) et l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), ainsi que deux cytokinines : la 6-furfurylamino purine ou kinétine (Kin.) et la 6-benzylaminopurine (BAP).

Dans certains essais, nous avons fait également intervenir l'acide indolylacétique (AIA), ou l'acide gibbérellique (AG₃).

d) Les composés organiques

La sensibilité des tissus à l'action excitoformatrice de produits naturels complexes comme l'hydrolysate de caséine et le lait de coco a été éprouvée ; de même que l'influence de deux acides aminés : le glyco-colle et la glutamine.

2) Graines en germination

Dans certains cas, nous avons utilisé des plantules issues de graines mises à germer aseptiquement. Le milieu de germination est alors constitué de :

- . macro et microéléments de HELLER. Le fer étant fourni sous forme chélatée ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$) à la dose de 50 mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ qui correspond à la concentration présente dans le milieu de M & S diluée de moitié.
- . gélose à 7 %.
- . saccharose à 1 %

III - CONDITIONS DE CULTURE

Les cultures sont placées dans une salle climatisée assurant une température de $22^\circ \pm 1^\circ \text{C}$ et éclairée en permanence par des tubes luminescents (General electric, type cool, white de luxe, 15 Wm^{-2}).

Les milieux gélosés sont coulés avant autoclavage dans des tubes en verre (22 x 160 mm) et bouchés par du coton hydrophile, recouvert d'une feuille d'étain ou d'un bouchon en plastique. Chaque tube contient environ 15 ml de milieu.

Un lot de 24 tubes est généralement utilisé par condition.

IV - METHODES DE MESURE

1) L'organogénèse

La mesure de l'intensité de l'organogénèse est faite en dénombrant les organes (racines ou bourgeons) visibles à

l'oeil nu, après 4 semaines de culture; les résultats sont exprimés par rapport à l'ensemble des explantats organogènes en :

- nombre moyen d'organes par fragment
- taille moyenne des organes.

De plus, nous avons toujours calculé, par rapport à la totalité des cultures, le pourcentage d'explantats organogènes.

2) La callogénèse

La croissance des tissus est évaluée par l'augmentation de la masse de matière fraîche et de matière sèche en cours de culture. Le poids de matière sèche est obtenu après un passage de 48 heures à l'étuve (105 ° C).

3) Calculs statistiques

Les caractères rencontrés en biologie suivent en général des lois voisines de la loi normale. Ainsi l'erreur standard de la moyenne (m) au risque de 5 % est donnée pour un petit nombre de cas (n) par la formule suivante :

$$x = m \pm \frac{t.S}{\sqrt{n}}$$

S étant l'écart type estimé sur l'échantillon

t la valeur donnée par la table de STUDENT pour le nombre de degré de liberté ($n - 1$) et le risque 5 % .

V - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

L'étude histologique des tissus est réalisée au microscope photonique selon les techniques décrites par LANGERON (1949).

1) Préparation des coupes.

Les fragments tissulaires sont fixés pendant 24 heures dans le mélange F.A.A. (Formaldéhyde 40 %, Acide acétique pur, Ethanol 95 ° ; 10/5/85 V/V).

Afin d'activer la pénétration du fixateur, le traitement est effectué sous vide durant les 30 premières minutes.

Après un rinçage d'une journée à l'eau courante, ils sont déshydratés dans une série éthanol-xylène, puis inclus dans la paraffine. Ils sont finalement débités en coupes de 10 à 12 μm d'épaisseur qui sont déparaffinées avant d'être colorées.

2) Colorations

Nous avons utilisé :

- la coloration de FEULGEN (LISON, 1960) pour les zones à activité mitotique intense ; (hydrolyse 12 mn, coloration 24 heures, l'ADN est coloré en rouge).
- . La double coloration safranine - fast-green ; safranine 4 h, fast-green 4 minutes, ADN coloré en rouge, parois et cytoplasme colorés en vert, parois lignifiées colorées en rouge.

VI - DOSAGE DES PROTEINES

Les protéines sont dosées selon la technique de LOWRY et Coll. (1951).

RESULTATS EXPERIMENTAUX

PREMIERE PARTIE

CULTURE D'EXPLANTATS RACINAIRES

CULTURE D'EXPLANTATS RACINAIRES

Le rôle des hormones dans la régulation des phénomènes d'organogenèse *in vitro* a donné lieu à de nombreux travaux. L'auxine induit la prolifération des zones génératrices libéroligneuses et des parenchymes peu différenciés. SKOOG et MILLER en 1957 ont montré que ce sont les concentrations relatives d'auxines et de cytokinines qui orientent le programme morphogénétique soit vers la callogenèse, soit vers le bourgeonnement ou la rhizogenèse. Ce travail, réalisé avec des tissus de moëlle de tabac cultivés *in vitro*, a été confirmé depuis avec du matériel très divers.

Pour notre part, nous avons voulu éprouver les capacités organogènes de fragments racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés sur des milieux contenant une auxine et/ou une cytokinine. Par la suite nous avons recherché les facteurs favorables à la néoformation de racines et la prolifération cellulaire.

PREMIER CHAPITRE ESSAIS PRELIMINAIRES

Nous avons tout d'abord vérifié les capacités de petits explantats de la racine de *Cichorium Intybus* à proliférer et à produire des racines. Pour cela, nous avons cultivé de petits explantats de racines en présence de deux auxines ; l'acide naphtylacétique (ANA) et l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), associées avec une cytokinine : la kinétine (Kin).

1) Action conjuguée de l'ANA et de la Kinétine

Dès $10^{-7}M$, l'ANA inhibe le bourgeonnement; cette inhibition devient totale (Tableau 3) au delà de $10^{-6}M$.

La rhizogenèse est par contre fortement stimulée. Ainsi, les explantats cultivés en présence de $6.10^{-7}M$ de cette hormone forment un nombre de racines quinze fois supérieur à celui du témoin. L'intensité du phénomène diminue à mesure qu'augmentent les doses d'ANA pour s'annuler à $5.10^{-5}M$.

Aux concentrations utilisées, l'action de la kinétine sur l'organogenèse est peu perceptible. Toutefois, en l'associant à l'ANA à des teneurs comprises entre $6.10^{-4}M$ et $10^{-6}M$ elle stimule de manière importante la néoformation des racines, en particulier lorsque la cytokinine est présente dans le milieu à une concentration de $10^{-7}M$. Ainsi on observe que le maximum de racines (5 en moyenne par explantat) est obtenu en présence d'ANA à $10^{-6}M$ et de kinétine à $10^{-7}M$.

Par ailleurs, les fragments racinaires produisent des cals volumineux lorsqu'ils sont soumis à de fortes doses d'ANA. La prolifération cellulaire qui est appréciable à partir de $10^{-6}M$ d'ANA devient importante à $5.10^{-5}M$. Cette condition provoque la formation d'un cal volumineux sans organe apparent.

2) Action conjuguée du 2,4-D et de la Kinétine

L'apport de 2,4-D favorise légèrement la formation des bourgeons aux concentrations inférieures à $10^{-7}M$. Au delà, l'inhibition de la callogenèse est totale (Tableau 4).



TABLEAU 3 : Action conjuguée de l'ANA et de la kinétine sur le nombre d'organes produits par des fragments de racines de *Cichorium Intybus* cultivés à la lumière en présence de glucose (1%). Le nombre de croix (+) signale l'intensité de la prolifération cellulaire.

B : Bourgeons

R : Racines

Explantats de racine de ϕ et 2 mm de hauteur

Kin (M)	ANA (M)	Concentration											
		0	10^{-7}	$2 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-7}$	$8 \cdot 10^{-7}$	10^{-6}	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$7,5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-5}$
0	B	2,54	2,12	2,00	1,00	1,01	0,91	0,78	0	0	0	0	0
	R	0,10	0,10	0,16	0,20	1,50	1,16	1,10	0,91	0,33	0,33	0,10	0
10^{-9}	B	2,50	2,16	2,20	1,00	1,09	0,54	0,88	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0,18	1,00	1,45	1,00	0,20	0,10	0,10	0,17	0
10^{-8}	B	2,08	1,81	2,00	1,36	0,94	0,50	0,91	0,20	0	0	0	0
	R	0,16	0,15	0,10	0,54	0,81	3,10	1,58	0,58	0,25	0,18	0	0
10^{-7}	B	2,36	1,81	1,50	1,16	0,83	0,36	0,16	0	0	0	0	0
	R	0	0,10	0,10	0,16	1,75	3,09	5,08	0,55	0,25	0,10	0	0



TABLEAU 4 : Action conjuguée du 2,4-D et de la kinétine sur le nombre d'organes produits par des fragments de racines de *Cichorium Intybus* cultivés à la lumière en présence de glucose (1%). Le nombre de croix (+) signale l'intensité de la prolifération cellulaire.

B : Bourgeons
R : Racines

Explantats de 5mm de ϕ et 2mm d'épaisseur

Kin (M)		2,4-D (M)											
		0	10^{-8}	$2 \cdot 10^{-8}$	$4 \cdot 10^{-8}$	$6 \cdot 10^{-8}$	$8 \cdot 10^{-8}$	10^{-7}	$2 \cdot 10^{-7}$	$4 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-7}$	$8 \cdot 10^{-7}$	10^{-6}
0	B	1,05	1,40	1,33	1,37	1,42	1,35	0,75	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0,10	0,50	0,30	0,25	0,30	0	0	0	0
10^{-8}	B	1,08	1,37	1,35	0,90	1,22	1,29	1,09	0,10	0	0	0	0
	R	0,11	0	0,17	0,20	0,40	0,33	0,20	0,20	0	0	0	0
10^{-7}	B	1,10	1,50	1,40	1,35	1,41	1,57	1,50	0,16	0	0	0	0
	R	0,12	0,10	0,20	0,30	0,41	0,42	0,16	0,16	0	0	0	0
$5 \cdot 10^{-7}$	B	1,00	0,80	0,90	0,54	0,82	1,11	1,00	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0,18	0,57	0,33	0	0	0	0	+	+
10^{-6}	B	1,00	0,80	0,85	0,80	0,50	0,50	0,40	0	0	0	0	0
	R	0	0	0	0	0,10	0,20	0,50	0,20	0	0	0	0

La rhizogenèse ne semble pas très affectée par la présence de ce régulateur de croissance. On dénombre en moyenne moins de 1 racine par explantat même pour les conditions les plus favorables.

Comme précédemment, la kinétine ajoutée seule dans les milieux de culture ne paraît exercer d'effet sensible ni sur la néoformation des organes, ni sur la prolifération cellulaire.

L'addition simultanée de ces deux hormones ne s'avère pas plus bénéfique. Nous avons cependant observé la formation de cals non organogènes à partir d'une dose de $4 \cdot 10^{-7}$ M de 2,4-D. Mais la prolifération cellulaire reste néanmoins toujours relativement modeste.

De ces résultats, il apparaît que l'ANA est nettement plus favorable que le 2,4-D pour stimuler la prolifération cellulaire : la présence d'ANA à $5 \cdot 10^{-5}$ M permet la production de cals volumineux sans organes apparents. La rhizogenèse nécessite par ailleurs la présence simultanée d'ANA et de kinétine ; le maximum de racines étant obtenu pour des doses de 10^{-6} M d'ANA et 10^{-7} M en kinétine.

DEUXIEME CHAPITRE

ETUDE DE LA RHIZOGENESE

Les essais préliminaires (Tableaux 3 et 4) ont permis de déterminer un milieu de culture favorable à la rhizogenèse de petits fragments racinaires de 6 mm de diamètre et 2 mm d'épaisseur. Il renferme la solution minérale de HELLER additionnée d'ANA, de kinétine et de glucose. Les explantats présentent alors de nombreuses racines, mais de rares bourgeons subsistent encore. De plus les résultats sont variables d'une culture à l'autre. La réalisation d'essais complémentaires s'imposait donc.

Nous nous sommes alors fixé pour objectif ; d'une part de déterminer les conditions expérimentales induisant uniquement la néoformation de racines et d'autre part, d'obtenir des résultats homogènes au sein d'un même lot expérimental et reproductibles d'une expérience à l'autre.

I - CHOIX DES CONDITIONS HORMONALES

Compte tenu de nos résultats antérieurs, nous nous sommes proposé de vérifier s'il était possible d'augmenter la production de racines en modifiant les concentrations d'hormones nécessaires à la rhizogenèse.

1) Recherche de la dose d'ANA

En absence d'ANA dans le milieu de culture (Tableau 5), tous les explantats (6 x 2 mm) bourgeonnent mais peu d'entre eux produisent des racines. Un effet favorable de l'ANA sur la rhizogenèse s'observe dès la dose de 10^{-7} M. De 10^{-7} M à 10^{-6} M, l'ANA favorise la rhizogenèse, ce qui se traduit par un accroissement du nombre des racines par explantat.

Parallèlement, leurs capacités de bourgeonnement diminuent régulièrement. Mais à partir de $5 \cdot 10^{-6}$ M, l'ANA agit différemment vis à vis de l'organogenèse. Certes le bourgeonnement est totalement inhibé mais, la rhizogenèse n'en n'est pas pour autant

TABLEAU 5 : Action de l'acide naphtylacétique sur les capacités organogènes des explantats de racines de *Cichorium Intybus* (6 mm Ø et 2 mm de longueur) cultivés *in vitro* en présence de 10 g/l de glucose.



	Acide Naphtyl-acétique (M)						
	0	10^{-7}	$5 \cdot 10^{-7}$	10^{-6}	$5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-5}$
(% d'explantats							
(avec bourgeons	100	95,8	75,0	29,2	0	0	0
(avec racines	16,7	20,8	29,2	41,7	20,1	8,3	0
(Nombre moyen, par							
(explantat de							
(bourgeons	1,7	1,6	1,1	0,4	0	0	0
(racines	0,2	0,2	0,6	0,9	0,3	0,1	0

activée et le pourcentage d'explantats porteurs de racines ainsi que le nombre moyen de racines sont moins importants que sur les témoins cultivés en l'absence d'ANA.

De ces résultats, il ressort, que lorsqu'il y a inhibition totale du bourgeonnement, l'effet rhizogène de l'ANA est faible sinon nul.

De plus, on note que le milieu qui contient 10^{-6} M d'ANA permet d'obtenir un maximum de fragments porteurs de racines et un nombre élevé de racines néoformées.

Cette condition a donc été retenue pour les essais ultérieurs.

2) Recherche d'une dose optimale de kinétine.

En présence d'ANA, la kinétine, à la dose de 10^{-7} M, augmente à la fois le nombre moyen de racines et le pourcentage de fragments rhizogènes (Tableau 6). A 10^{-6} M, on observe une inhibition totale du bourgeonnement, mais en même temps, une forte réduction de la rhizogénèse et le nombre moyen des racines correspond alors à moins de la moitié de celui observé sur les explantats témoins. C'est pourquoi nous avons choisi d'ajouter systématiquement dans les milieux de culture de l'ANA à 10^{-6} M et de la kinétine à 10^{-7} M.

II - INFLUENCE DE LA TAILLE DES EXPLANTATS ET DU GLUCOSE EXOGENE

Lors des essais précédents, les explantats disposaient de leurs propres réserves glucidiques intratissulaires ainsi que du glucose (10g/l) additionné aux milieux nutritifs.

Nous nous sommes alors demandé, si la taille des explantats et l'apport exogène de sucre étaient susceptibles d'influencer la rhizogénèse.

Pour cela, des cylindres tissulaires de 6 mm de diamètre sont prélevés au niveau de la zone génératrice, puis



TABLEAU 6 : Action de la Kinétine sur les capacités organogènes de fragments de racines de *Cichorium Intybus* (6 mm de \emptyset et 2 mm de longueur) cultivés en présence de 10^{-6} M d'ANA et de 10 g/l de glucose.

	Kinétine (M)			
	0	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
(% d'explantats				
(avec bourgeons	33,3	41,7	20,8	0
(avec racines	37,5	37,5	45,8	29,2
(Nombre moyen, par explantat de:				
(bourgeons	0,3	0,5	0,2	0
(racines	1,2	1,3	1,7	0,5

sectionnés en tronçons de 2, 4, 6 ou 8 mm de longueur. Ces fragments ont été ensemencés sur des milieux nutritifs additionnés ou non de glucose et contenant de l'ANA 10^{-6} M et de la kinétine 10^{-7} M.

En absence de glucose exogène (Tableau 7), on n'observe pas d'organe sur les explantats de 2 ou 4 mm de longueur. Sur les explantats de 6 mm d'épaisseur, quelques racines apparaissent et leur nombre s'accroît ensuite avec la taille des fragments. Ainsi, les explantats de 8 mm de longueur présentent des capacités rhizogènes très supérieures (en pourcentage d'explantats organogènes et en nombre moyen de racines) à celles des fragments de 6 mm.

La présence du glucose (10g/l) dans le milieu de culture provoque la formation de racines quelle que soit la taille des explantats et une augmentation des capacités rhizogènes à mesure que cette taille croît.

Nous avons alors choisi d'utiliser les explantats de 6 mm de longueur pour lesquels le pourcentage d'explantats organogènes est déjà très élevé (83 %) et qui ne présentent qu'un petit nombre de bourgeons.

De plus, ces résultats nous ont incité à étudier de manière plus approfondie l'action du glucose, qui par ailleurs s'est révélé inhibiteur du bourgeonnement (LEFEBVRE, 1976).

YAMEO GO

L'addition de glucose en concentration croissantes (Tableau 8) ne permet pas d'orienter l'organogénèse exclusivement vers la production de racines. En effet si les explantats cultivés sur un milieu dépourvu de sucre ne produisent que de rares racines, un apport de 2,5 g/l de glucose permet la formation, sur près de la moitié des cultures, de 3,4 racines en moyenne par explantat. On observe parallèlement l'apparition de quelques bourgeons.

A partir d'une concentration de 5 g/l de glucose, le nombre de fragments rhizogènes atteint un palier. Les doses supérieures ne modifient pas le nombre des néoformations.



TABLEAU 7 : Influence de la taille des explantats sur la production des racines en présence ou non de glucose à 10 g/l. Le milieu de culture contient en outre de l'ANA à 10^{-6} M et de la kinétine à 10^{-7} M.

		Explantats de 6 mm ϕ et de longueur			
		2 mm	4 mm	6 mm	8 mm
Glucose = 0	% d'explantats :				
	avec bourgeons	0	0	0	12,5
	avec racines	0	0	8,3	33,3
	Nombre moyen par explantat de :				
	bourgeons	0	0	0	0,1
	racines	0	0	0,2	0,7
Glucose 10g/l	% d'explantats :				
	avec bourgeons	8,3	9,1	12,5	37,5
	avec racines	37,5	54,2	83,3	83,3
	nombre moyen par explantat de :				
	bourgeons	0,1	0,1	0,2	0,7
	racines	1,5	2,4	4,5	5,1



TABLEAU 8 : Effet de différentes concentrations de glucose sur la production de racines par des fragments racinaires de *Cichorium Intybus* (6 mm ϕ x 6 mm de longueur) cultivés en présence de 10^{-6} M d'ANA et de 10^{-7} de kinétine.

	glucose (g/l)						
	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15
(% d'explantats	:	:	:	:	:	:	:
(avec bourgeons	: 0	: 16,7	: 18,2	: 20,8	: 12,5	: 8,3	: 8,3
(avec racines	: 12,5	: 45,8	: 79,2	: 79,2	: 81,8	: 74,2	: 67,2
(Nombre moyen, par	:	:	:	:	:	:	:
(explantat de	:	:	:	:	:	:	:
(bourgeons	: 0	: 0,3	: 0,3	: 0,2	: 0,2	: 0,2	: 0,1
(racines	: 0,2	: 3,4	: 4,9	: 5,7	: 6,4	: 5,2	: 4,1

Un maximum de racines est observé à 10 g/l; au delà, on constate un léger brunissement des explantats qui marque un début de toxicité, ainsi qu'une réduction des capacités organogènes. Cette teneur en glucose (10 g/l) a donc été retenue pour la suite des expérimentations.

III - TRANSFERT DES EXPLANTATS CULTIVES SUR DES MILIEUX SANS GLUCOSE.

L'absence de glucose dans les milieux de culture contenant de l'ANA 10^{-6} M et de la KIN 10^{-7} M empêche l'apparition des racines mais provoque par contre la formation de cals volumineux d'aspect verdâtre. Histologiquement, on observe cependant de nombreux méristèmes nettement individualisés mais ils ne se développent pas.

Nous nous sommes donc proposé pour tenter de faire apparaître ces organes, de transférer les explantats sur des milieux renfermant ou non du glucose. Les fragments racinaires utilisés dans cet essai ont 6 mm de diamètre et 2 ou 6 mm de longueur et sont donc transférés après 30 jours de culture sur différents milieux (Tableau 9).

Les explantats de 2 mm de longueur ne produisent jamais d'organes lorsqu'ils sont transférés sur des milieux pourvus ou non de glucose. Après transfert, on observe la présence de racines sur les tissus essentiellement lorsque le milieu de repiquage contient du glucose et si les explantats ont initialement 6 mm de longueur.

Dans ces conditions, tous les fragments forment des racines dont le nombre moyen est voisin de 12. La présence de régulateurs de croissance améliore encore, parallèlement à la prolifération cellulaire, la rhizogénèse puisque l'on note alors une moyenne de 14 racines par explantat.

IV - INFLUENCE DE L'AG₃ ET DE LA LUMIERE.

En général, les gibbérellines exercent une action inhibitrice sur l'organogénèse (THORPE, 1978). Ceci nous a incité à éprouver leur influence sur les explantats de racines de *Cichorium Intybus*. Les cultures sont exposées soit à la lumière soit

TABLEAU 9 : Influence du transfert sur des milieux nutritifs divers, pourvus ou non de glucose (10 g/l). Les explantats de 6 mm de diamètre et 2 ou 6 mm de longueur sont cultivés pendant un mois sur un milieu renfermant la solution minérale de HELLER additionnée de 10^{-6} M d'ANA et de 10^{-7} M de kinétine.
30 jours après le transfert sur le second milieu on détermine : le poids de matière fraîche (M.F.) ou sèche (M.S) ainsi que le nombre de racines (r) de bourgeons (b) et le % d'explantats porteurs de racines.



Milieux de transfert :	Taille des explantats :	Heller	Heller	Heller	Heller	Heller	Heller
		Heller	+ Glucose 1 %	ANA 10^{-6} M	Glucose 1 % ANA 10^{-6} M	ANA 10^{-6} M Kin 10^{-7} M	Glucose 1 % ANA 10^{-6} M Kin 10^{-7} M
Explantat de 2 mm de longueur	M.F.(mg)	429 ± 64	549 ± 105	480 ± 58	742 ± 107	516 ± 101	856 ± 130
	M.S(mg)	22,40	38,34	23,12	44,74	24,12	45,93
	r.	0	0	0	0	0	0
	b.	0	0	0	0	0	0
Explantat de 6 mm de longueur	M.F(mg)	484 ± 65	994 ± 82	693 ± 148	1 077 ± 224	708 ± 151	1 285 ± 204
	M.S(mg)	24,77	68,78	29,63	70,79	33,57	77,87
	r.	0,16	12,00	0,33	6,80	0,83	14,00
	% r.	22	100	33	60	33	100

à l'obscurité.

En présence de lumière, (Tableau 10) l'addition d'AG₃ a pour effet de diminuer la caulogénèse tout en augmentant le nombre de fragments rhizogènes.

C'est finalement la dose de 10^{-5} M d'AG₃ associée aux effecteurs précédents (ANA 10^{-6} M, K 10^{-7} M et glucose 10 g/l) qui nous a permis d'atteindre le but que nous nous étions fixé. (Planche I, Photo 1 et Photo 2 B).

On observe en effet que dans ces conditions, tous les explantats forment des racines en grand nombre à l'exclusion de toute néoformation gemmaire. Mais ceci ne s'observe que dans les cas où les tissus sont exposés à la lumière. L'obscurité réduit par contre les capacités rhizogènes des fragments.

TABLEAU 10: Action de différentes doses d'acide gibbérellique, en présence d'ANA 10^{-6} M, de kinétine 10^{-7} M et de glucose 10 g/l sur la production de racines. Les explantats (6mm \emptyset x 6 mm de longueur) ont été cultivés soit à la lumière, soit à l'obscurité.



		Acide gibbérellique (M)			
		0	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
Lumière	: % d'explantats	:	:	:	:
	: avec bourgeons	: 20,0	: 12,0	: 0	: 0
	: avec racines	: 70,0	: 75,0	: 100	: 65,0
	: Nombre moyen par	:	:	:	:
	: explantat de	:	:	:	:
	: bourgeons	: 0,2	: 0,1	: 0	: 0
	: racines	: 7,3	: 7,0	: 9,6	: 6,4
Obscurité	: % d'explantats	:	:	:	:
	: avec bourgeons	: 9,1	: 5,3	: 0	: 0
	: avec racines	: 63,6	: 54,2	: 81,7	: 66,4
	: Nombre moyen par	:	:	:	:
	: explantat de	:	:	:	:
	: bourgeons	: 0,2	: 0,2	: 0	: 0
	: racines	: 3,8	: 4,0	: 6,1	: 4,4

TROISIEME CHAPITRE

PROLIFERATION DES CULTURES PRIMAIRES

I - RECHERCHE D'UN MILIEU DE PROLIFERATION

1) Choix d'une dose d'ANA

Les petits explantats racinaires de *Cichorium Intybus* produisent naturellement des bourgeons et quelques rares racines, en culture *in vitro*. L'adjonction aux milieux de culture d'ANA augmente le nombre des racines et réduit celui des bourgeons (Tableau 11).

Ce n'est cependant que pour des doses supérieures à 10^{-5} M que l'on n'observe plus de manifestations organogènes et à 5.10^{-5} M, seule une prolifération cellulaire très importante subsiste.

2) Choix d'une dose de kinétine

L'étude histologique des cals formés en présence de 5.10^{-5} M d'ANA met en évidence, la présence de nombreux nodules méristématiques néoformés qui ne se développent pas.

L'addition de kinétine permet de réduire leur nombre, particulièrement à la concentration de 10^{-7} M. Des doses plus élevées inhibent la prolifération cellulaire (Tableau 12). Nous avons donc cultivé les tissus en présence de 5.10^{-5} M d'ANA et de 10^{-7} M de kinétine pour favoriser la callogenèse de ces tissus.

II - ESSAIS D'AMELIORATION DE LA PROLIFERATION

La maîtrise de la culture *in vitro* des tissus végétaux nécessite de bien connaître, l'influence des conditions externes et des différents facteurs du milieu de culture.

1) Action des acides aminés et des vitamines

Nous avons tout d'abord étudié l'influence des éléments organiques du milieu préconisé par MURASHIGE ET SKOOG (1962).

L'hydrolysate de caséine (1g/l) stimule puissamment la prolifération cellulaire. Cette exaltation permet de doubler la quantité de matière fraîche ou de matière sèche des cultures témoins (Tableau 13).

TABLEAU 11 : Action de l'ANA sur l'organogenèse des explantats racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés *in vitro* sur un milieu renfermant les éléments minéraux de la solution de HELLER et 1 % de glucose.



	Acide naphtylacétique (M)				
	0	10^{-6}	$5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-5}$
(% d'explantats	:	:	:	:	:
(avec bourgeons	: 100	: 29,2	: 0	: 0	: 0
(avec racines	: 16,7	: 41,7	: 20,1	: 8,3	: 0
(Nombre moyen par	:	:	:	:	:
(explantat de	:	:	:	:	:
(bourgeons	: 1,7	: 0,4	: 0	: 0	: 0
(racines	: 0,2	: 0,9	: 0,3	: 0,1	: 0



Tableau 12 : Action de la kinétine sur la prolifération d'explantats de racines de *Cichorium Intybus* cultivés *in vitro* sur un milieu renfermant la solution minérale de HELLER additionnée d'ANA $5 \cdot 10^{-5}$ M et de glucose 1 %.

Kinétine (M)	Poids de matière fraîche (mg)	Poids de matière sèche (mg)	% Eau
0	1 005	19	98,10
10^{-7}	571	15	97,37
10^{-6}	231	10	95,67
10^{-5}	175	8	95,42
10^{-4}	165	8	95,20

Tableau 13 : Intensité de la prolifération cellulaire de fragments racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés en présence ou non de substances organiques.

Le milieu renferme la solution minérale de HELLER additionnée d'ANA $5.10^{-5}M$, de Kinétine $10^{-7}M$.



Hydrolysat de caséine 1g/l	Vitamines	Glycocolle 2mg/l	Matière fraîche (mg)	Matière sèche (mg)	% Eau
			290	10,10	96,51
			265	9,66	96,25
			284	9,63	96,61
			242	8,90	96,32
			733	24,50	96,65
			859	26,66	96,89
			329	13,33	95,94
			374	13,41	96,41

Le mélange vitaminique (thiamine (B1), pyridoxine (B6), inositol, acide nicotinique, acide folique et biotine) à lui seul inhibe légèrement la callogenèse, mais il renforce l'efficacité de l'hydrolysate de caséine.

Le glyco-colle a peu d'effet sur la croissance des tissus qu'il soit utilisé seul ou associé aux vitamines.

Pour la suite de nos expériences, nous avons associé l'hydrolysate de caséine et le mélange vitaminique.

2) Action des glucides et de l'éclaircissement

L'insuffisance de l'assimilation chlorophyllienne par les tissus végétaux cultivés *in vitro* nécessite d'ajouter des glucides aux milieux de culture.

Dans le cas des tissus de chicorée Witloof, nous avons remarqué qu'en présence de 1 % de sucre, ils brunissaient à la lumière. On pouvait donc se demander si à l'obscurité, on ne pourrait pas réduire la toxicité qui accompagne toujours le brunissement des tissus. De même, nous avons vérifié si la réduction de la dose de glucides n'améliorerait pas la croissance.

Même à faible dose, les glucides ont un effet favorable sur la croissance des tissus (Tableau 14). A la lumière, les faibles doses (0,125 et 0,250 %) de glucose et de saccharose ont des effets comparables. Pour des concentrations plus élevées, le saccharose stimule davantage la croissance des tissus. A la dose de 1 %, ces glucides doublent le poids de matière sèche des explantats. Toutefois, si le cal formé par les témoins (sans sucre) est vert clair, en présence de sucre même à dose faible (0,125 %), il brunit au contact du milieu nutritif. La nécrose est d'autant plus forte que la concentration en glucide est plus élevée et en présence de 1 % de sucre, les explantats sont totalement bruns.

Si les glucides exogènes stimulent la croissance pondérale des explantats, ils présentent néanmoins l'inconvénient de manifester très rapidement une certaine toxicité qui suggère que les glucides endogènes doivent suffire à la prolifération des tissus.

Tableau 14 : Influence de la concentration en glucose et en saccharose sur la prolifération cellulaire d'explantats racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés à la lumière ou à l'obscurité.
 Le milieu nutritif renferme la solution minérale de HELLER, de l'ANA ($5 \cdot 10^{-5}M$), de la kinétine ($10^{-7}M$), de l'hydrolysate de caséine (1g/l) et des vitamines.
 Les résultats sont exprimés en mg de matière fraîche (MF) ou de matière sèche (MS) par explantat.



		Concentrations en glucides (%)						
		0	0,125	0,250	0,500	0,750	1,00	
Lumière	Glucose	M.F.	1 314 ± 167	1 439 ± 112	1 569 ± 118	1 599 ± 82	1 672 ± 77	1 914 ± 169
		M.S.	24,60	25,62	34,99	36,90	41,38	49,39
		Z Eau	98,1	98,2	97,8	97,7	97,5	97,4
	Saccharose	M.F.	1 314 ± 167	1 510 ± 122	1 673 ± 111	1 828 ± 132	1 898 ± 102	1 934 ± 76
		M.S.	24,60	32,06	35,68	49,80	56,66	58,04
		Z Eau	98,1	97,9	97,9	97,3	97,0	97,0
Obscurité	Saccharose	M.F.	931 ± 59	1 300 ± 178	1 437 ± 97	1 573 ± 79	1 586 ± 97	1 651 ± 26
		M.S.	22,67	29,93	32,63	42,78	46,38	49,73
		Z Eau	97,6	97,7	97,7	97,3	97,1	96,9

Les explantats cultivés à la lumière ont une callogenèse très supérieure (d'environ 40 %) à celle obtenue à l'obscurité (Tableau 14). Dans la suite de nos essais, nous avons donc cultivé les explantats à la lumière en absence de sucre.

3) Influence de la concentration en gélose

Afin de vérifier l'influence de l'état physique du milieu de culture sur la prolifération des explantats, nous les avons cultivé soit sur un milieu liquide selon le principe préconisé par HELLER (1953), soit sur un milieu gélosé dont nous avons fait varier la concentration d'agar.

Une concentration inférieure à 2 % est insuffisante pour solidifier le milieu de culture, aussi avons nous fait appel à un support de papier filtre (comme en milieu liquide) pour maintenir les explantats à la surface du milieu.

Pour des concentrations supérieures, nous avons supprimé le support de papier filtre. Toutefois entre 2 et 5 %, les tissus ont eu tendance à s'enfoncer dans le milieu, ce qui gêne leur prolifération et explique que c'est seulement à partir de 5 % que nous avons noté des effets bénéfiques du milieu gélosé (Figure 3). L'effet optimal de la gélose s'observe pour une concentration de 7 % où la prolifération moyenne des explantats est de 40 mg au lieu de 18 en milieu liquide. Des concentrations supérieures de gélose sont moins favorables et à partir de 12 %, la croissance est même très réduite.

4) Action des régulateurs de croissance

a) Action de l'acide gibbérellique et du lait de coco.

Le lait de coco (15 %) stimule fortement la prolifération cellulaire des fragments de racines.

L' AG_3 (10^{-7} et 10^{-6} M) augmente quelque peu la croissance des tissus, le cal néoformé est très chlorophyllien (Tableau 15); toutefois pour les doses plus fortes, il est inhibiteur. Associé au lait de coco, l' AG_3 inhibe la callogenèse provoquée par ce dernier, cette inhibition est d'autant plus nette que la concentration est plus élevée.

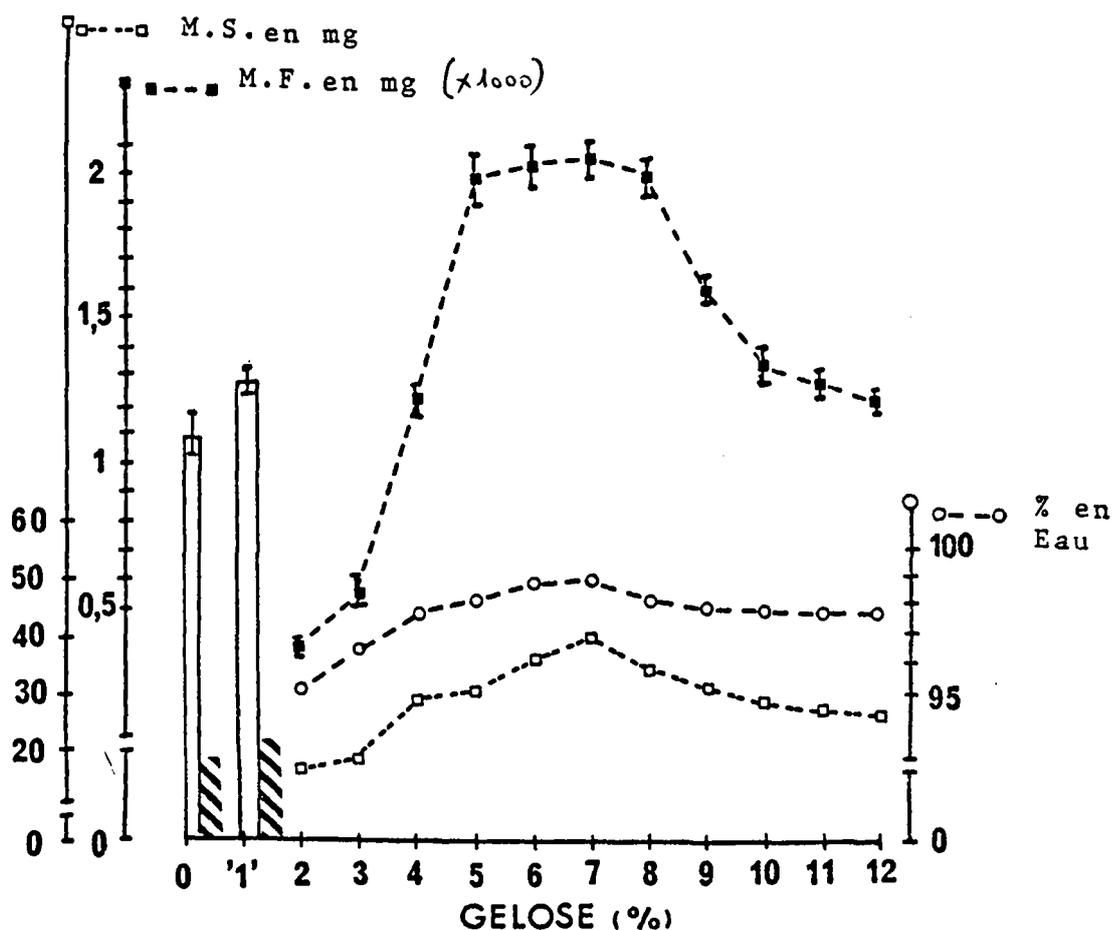


Figure 3 : Influence de la concentration en gélose sur la prolifération cellulaire de fragments de racines de *Cichorium Intybus L.* cultivés *in vitro* sur la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG additionnée de ANA $5 \cdot 10^{-5}$ M, de Kin 10^{-7} M, de vitamines et d'hydrolysate de caséine.
 Témoïn : milieu liquide avec support de papier filtre
 "1" : milieu contenant 1 % de gélose et surmonté d'un support de papier filtre (méthode de HELLER)



Tableau 15 : Influence de l'AG₃ et du lait de coco (15 %) sur les poids de matière fraîche et de matière sèche (en mg) d'explantats de racines de *Cichorium Intybus* cultivés sur un milieu renfermant la solution minérale de HELLER additionnée d'ANA 5.10⁻⁵M, de Kin.10⁻⁷ M de vitamines et d'hydrolysate de caséine.



(AG ₃ (M)	:	Matière fraîche	:	Matière sèche	:	% Eau	:	Couleur des cals
0	:	1 748	:	25	:	98,52	:	vert clair
	:	L. de coco: 1 958	:	58	:	97,00	:	vert
10 ⁻⁷	:	2 028	:	29	:	98,56	:	vert clair
	:	L. de coco: 1 416	:	45	:	96,80	:	vert
10 ⁻⁶	:	1 823	:	29	:	98,38	:	vert clair
	:	L. de coco: 1 306	:	42	:	96,74	:	vert
10 ⁻⁵	:	1 162	:	25	:	97,82	:	vert
	:	L. de coco: 1 182	:	40	:	96,53	:	vert

Des observations histologiques nous ont montré qu'en présence de ces facteurs, le nombre de zones méristématiques est fortement augmenté, elles apparaissent alors toujours au contact des trachéïdes.

b) Action des auxines et des cytokinines

En l'absence d'auxine et de cytokinine, les explantats produisent spontanément des bourgeons et pour 25 % d'entr'eux des racines (Tableau 16). Certes nous savions que les auxines (Tableau 3 et 4) stimulent la callogenèse mais il nous fallait vérifier l'effet de ces régulateurs de croissance en l'absence de sucre.

L'ANA inhibe le bourgeonnement, cette inhibition devient totale à partir de 10^{-6} M, par contre la prolifération cellulaire est fortement augmentée (Fig 4). La kinétine à 10^{-7} M stimule quelque peu la croissance et inhibe la rhizogenèse (Figure 5). Aux concentrations plus élevées, elle stimule le bourgeonnement.

La BAP favorise la croissance des explantats (Figure 6). Il semble néanmoins que le gain de matière sèche provienne de la stimulation du bourgeonnement observé à partir de 10^{-7} M de BAP et qui équivaut à 10^{-5} M à une augmentation de la caulogenèse correspondant au double de celle observée sur les explantats témoins.

L'association de faibles doses d'ANA (10^{-8} et 10^{-7} M) à 10^{-5} M de BAP (Tableau 17) se traduit par une exubérante production de bourgeons d'aspect charnu et translucides. Cette hyperhydricité est le signe de la toxicité qui est d'autant plus marquée que la dose de BAP est plus élevée.

Comme précédemment, on constate que la callogenèse est favorisée par la présence simultanée de fortes doses d'ANA et une concentration de cytokinine de l'ordre de 10^{-7} M. Toutefois à partir de 10^{-6} M, la BAP réduit considérablement la callogenèse.

Le 2,4D inhibe totalement l'organogenèse à des doses de l'ordre de 10^{-7} M (Figure 7). Mais c'est à la concentration

Tableau 16 : Action comparée de l'ANA et de la kinétine sur la prolifération d'explantats racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés *in vitro*. Le milieu renferme la solution minérale de HELLER additionnée de vitamines et de l'hydrolysate de caséine.



KINETINE (M)	ANA (M)		0	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁵
		M.F.	M.S.						
0	M.F.	M.S.	426 ± 66	433 ± 53	458 ± 152	888 ± 76	1 793 ± 170	2 017 ± 186	2 090 ± 228
	M.S.	Z Eau	29,16	28,62	31,00	36,00	36,20	36,32	37,25
	Z Eau		93,15	93,39	93,23	95,94	97,88	98,19	98,21
	Bourgeons	Racines	(100) 4,08 ***	(100) 2,85 ***	(100) 2,85 ***	0	0	0	0
			(25) 0,33	(20) 0,30	0	0	0	0	0
10 ⁻⁷	M.F.	M.S.	487 ± 90	525 ± 100	502 ± 69	1 079 ± 53	1 140 ± 191	1 550 ± 128	1 713 ± 250
	M.S.	Z Eau	31,97	33,16	34,96	30,32	31,57	33,70	35,00
	Z Eau		93,43	93,68	93,03	97,18	97,23	97,82	97,95
	Bourgeons	Racines	(100) 3,33 ***	(100) 3,50 ***	(100) 2,55 ***	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁶	M.F.	M.S.	508 ± 57	517 ± 46	653 ± 111	932 ± 91	1 437 ± 116	1 499 ± 120	1 369 ± 225
	M.S.	Z Eau	34,75	34,46	33,29	28,60	30,06	32,00	31,96
	Z Eau		93,15	93,33	94,90	96,93	97,90	97,86	97,66
	Bourgeons	Racines	(100) 3,33 **	(100) 3,66 **	(100) 3,60 **	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁵	M.F.	M.S.	567 ± 65	482 ± 61	649 ± 161	Conditions non envisagées			
	M.S.	Z Eau	34,15	30,84	31,17				
	Z Eau		93,97	93,60	95,19				
	Bourgeons	Racines	(100) 4,37 **	(100) 4,83 **	(100) 2,40 **				
			0	0	0				

M.F. : Poids de matière fraîche (mg) par explantat
M.S. : Poids de matière sèche (mg) par explantat
() : Pourcentage d'explantats présentant ce type d'organes

les astérisques rendent compte de la taille et de la vitrosité des bourgeons
* : < 1 cm (très vitreux)
** : 1 - 2 cm (moyennement vitreux)
*** : > 2 cm (bourgeons normaux)

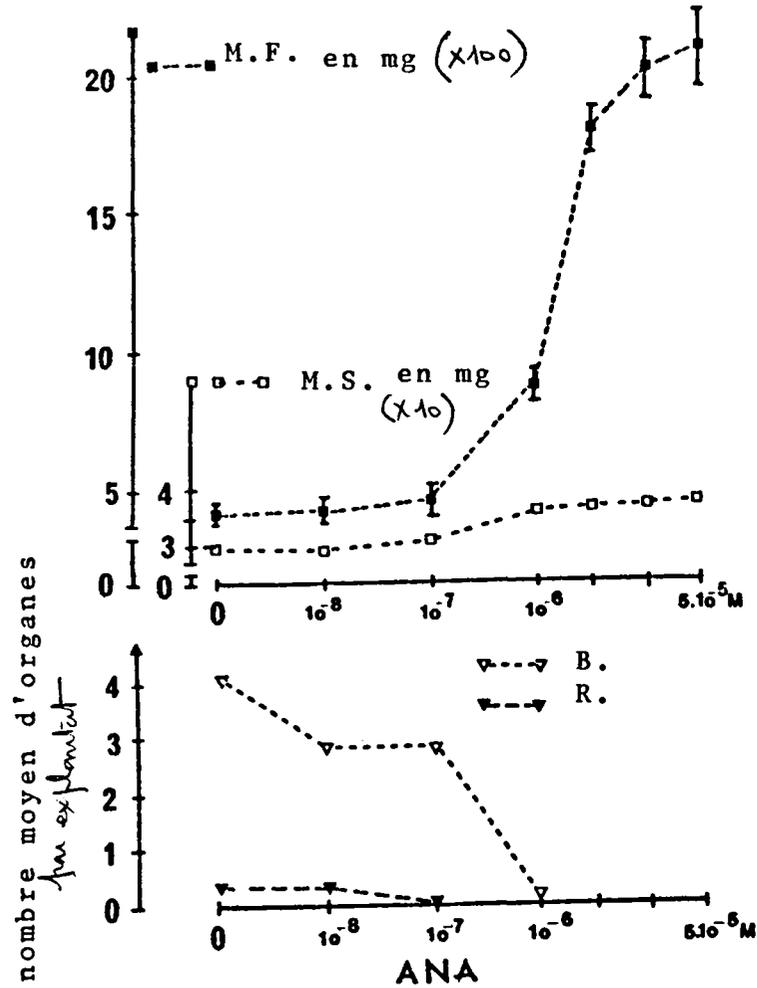


Figure 4 : Action de l'ANA sur la croissance et l'organogenèse d'explantats racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés à la lumière sur un milieu renfermant la solution minérale de HELLER additionnée de vitamines et d'hydrolysate de caséine.

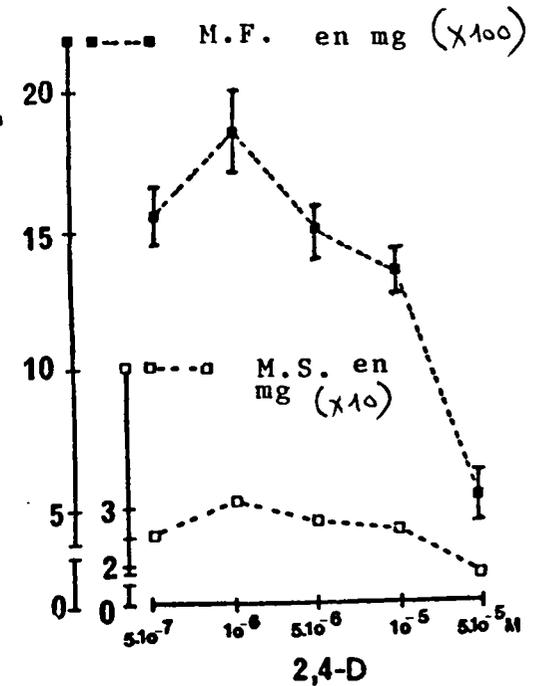


Figure 7 : Action du 2,4-D sur la croissance d'explantats racinaires cultivés sur un milieu renfermant la solution minérale de HELLER additionnée de vitamines et d'hydrolysate de caséine.

Tableau 17 : Action comparée de l'ANA et de la BAP sur la prolifération d'explantats racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés "in vitro" sur un milieu renfermant la solution de HELLER additionnée de vitamines et d'hydrolysat de caséine.



		ANA (M)						
BAP (M)		0	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁵
0	M.F.	426 ± 66	433 ± 53	458 ± 152	888 ± 76	1 793 ± 170	2 017 ± 186	2 090 ± 288
	M.S.	29,16	28,62	31,00	36,00	36,20	36,32	37,25
	% Eau	93,15	93,39	93,23	95,94	97,98	98,19	98,21
	Bourgeons	(100) 4,08 ***	(100) 2,85 ***	(100) 2,85 ***	0	0	0	0
	Racines	(25) 0,33	(20) 0,30	0	0	0	0	0
10 ⁻⁷	M.F.	539 ± 72	514 ± 87	535 ± 57	985 ± 100	1 510 ± 355	2 024 ± 283	2 180 ± 355
	M.S.	30,12	34,50	39,41	32,33	37,63	39,07	39,22
	% Eau	94,41	93,28	92,63	96,71	97,50	98,06	98,20
	Bourgeons	(100) 5,00 ***	(100) 3,20 ***	(100) 4,55 **	0	0	0	0
	Racines	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁶	M.F.	624 ± 83	632 ± 40	646 ± 81	1 063 ± 157	1 202 ± 362	1 131 ± 154	667 ± 254
	M.S.	34,35	38,01	37,61	29,16	32,98	32,20	24,22
	% Eau	94,49	93,98	94,17	97,25	97,25	97,71	96,36
	Bourgeons	(100) 7,00 ***	(100) 6,14 **	(100) 5,72 **	0	0	0	0
	Racines	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁵	M.F.	725 ± 85	671 ± 105	623 ± 56	conditions non considérées			
	M.S.	39,56	35,55	32,46				
	% Eau	94,54	94,70	94,78				
	Bourgeons	(100) 8,85 **	(100) 11,00 *	(100) 6,71 *				
	Racines	0	0	0				

N.B. M.F. : poids de matière fraîche (mg) par explantat
M.S. : poids de matière sèche (mg) par explantat
() : pourcentage d'explantats présentant ce type d'organes

les astérix rendent compte de la taille des bourgeons et de leur vitrosité.
* : < 1 cm (très vitreux)
** : 1 - 2 cm (moyennement vitreux)
*** : > 3 cm bourgeons normaux

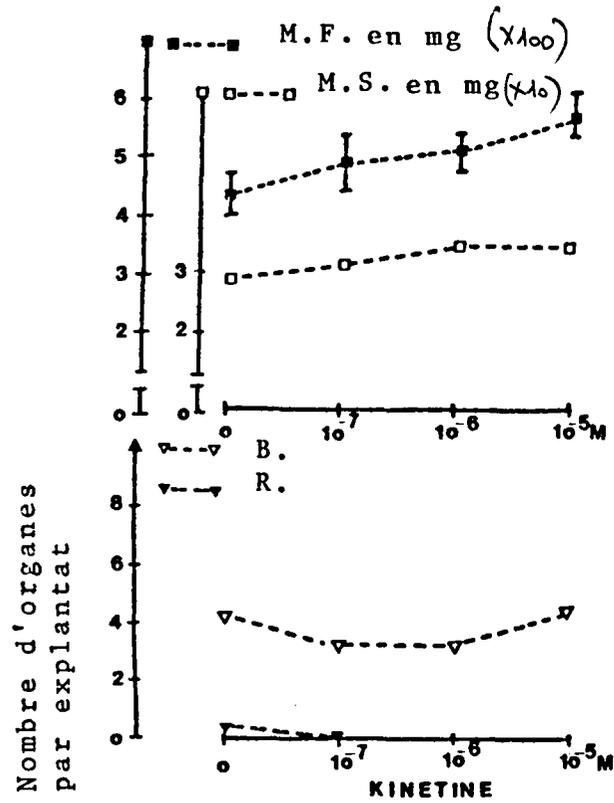


Figure 5 : Action de la kinétine sur la croissance et l'organogénèse d'explantats racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés à la lumière sur un milieu renfermant la solution minérale de HELLER additionnée de vitamines et d'hydrolysate de caséine.

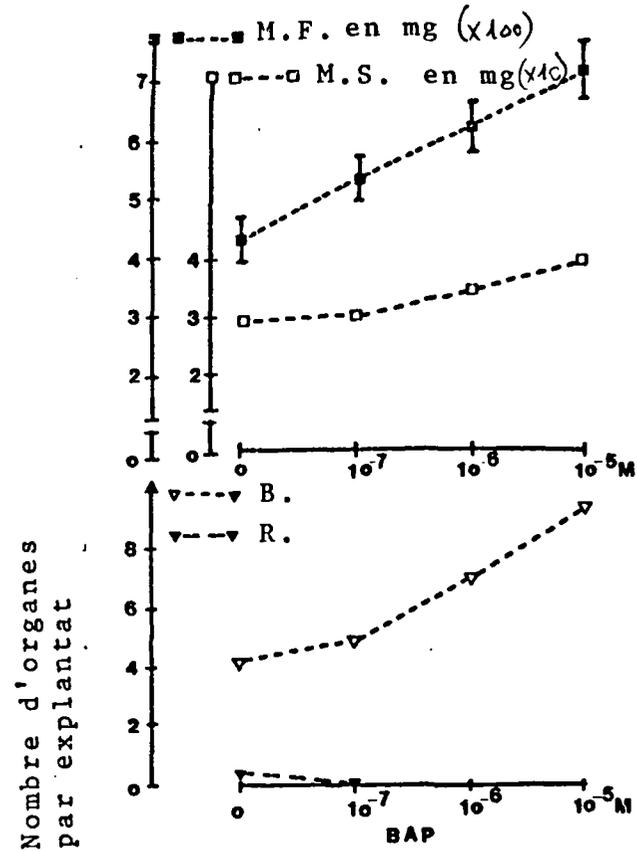


Figure 6 : Action de la BAP sur la croissance et l'organogénèse d'explantats racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés à la lumière sur un milieu renfermant la solution minérale de HELLER additionnée de vitamines et d'hydrolysate de caséine.



de 10^{-6} M que l'on observe la prolifération optimale des explantats.

La kinétine à 10^{-7} M associée au 2,4D s'est avérée plus efficace pour stimuler la callogenèse que la BAP (Tableau 18).

En comparant l'action exercée par les auxines, on constate que l'ANA stimule plus nettement la prolifération des explantats racinaires que le 2,4D. Pour cette raison, nous avons choisi d'ajouter systématiquement de l'ANA à $5 \cdot 10^{-5}$ M.

Le milieu "callogenèse" que nous utiliserons par la suite renferme donc de l'ANA ($5 \cdot 10^{-5}$ M), de la kinétine 10^{-7} M, des vitamines, de l'hydrolysate de caséine et de la gélose à 7 %.

5) Influence de l'origine et de la nature des tissus

A maturité, la racine de *Cichorium Intybus* mesure une vingtaine de centimètres de longueur. Le lieu de prélèvement des explantats pouvant être une source de variabilité des résultats, nous avons donc comparé les potentialités des tissus prélevés à différents niveaux de la racine (schéma 3) ;

- la région proximale (voisine du collet)
- la région médiane
- la région distale.

Nous avons également vérifié quelle pouvait être l'influence de la nature du tissu mis en culture. A chaque niveau, nous avons prélevé les tissus soit dans la zone corticale (phloème), soit dans la zone cambiale, soit dans le xylème (Schéma 4).

Tableau 18 : Action du 2,4D associé à la kinétine ou à la BAP, sur la prolifération d'explantats racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés sur un milieu renfermant la solution minérale de HELLER additionnée de vitamines et d'hydrolysate de caséine.



		2,4 D (M)					
(Cytokinine (M))		5.10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁵	
(0	: M.F.(mg)	1 556 ± 191	1 858 ± 265	1 489 ± 202	1 355 ± 179	542 ± 160)
(: M.S.(mg)	25,25	31,80	28,33	27,00	19,40)
(: % Eau	98,37	98,28	98,09	98,00	96,42)
(:	:	:	:	:	:)
(Kin10 ⁻⁷	: M.F.(mg)	1 396 ± 212	1 952 ± 362	1 936 ± 109	1 889 ± 197	913 ± 187)
(: M.S.(mg)	22,75	36,43	33,18	33,13	32,00)
(: % Eau	98,37	98,13	98,28	98,27	96,49)
(:	:	:	:	:	:)
(BAP 10 ⁻⁷	: M.F.(mg)	1 303 ± 178	1 929 ± 192	1 390 ± 295	1 227 ± 219	510 ± 158)
(: M.S.(mg)	22,21	34,80	27,16	23,80	19,50)
(: % Eau	98,29	98,19	98,04	98,06	96,17)

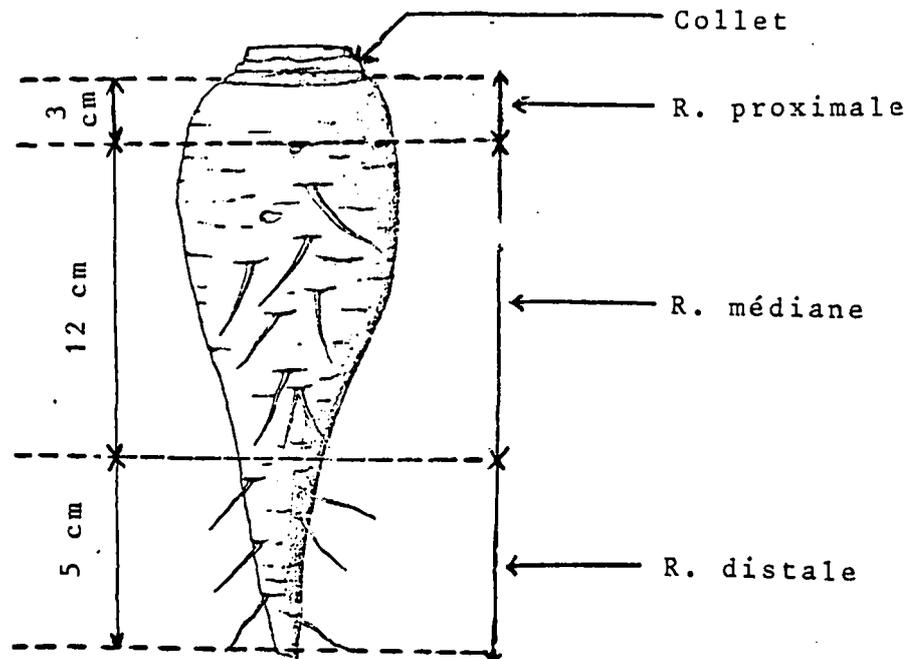


Schéma 3 : localisation des différentes régions de prélèvement.

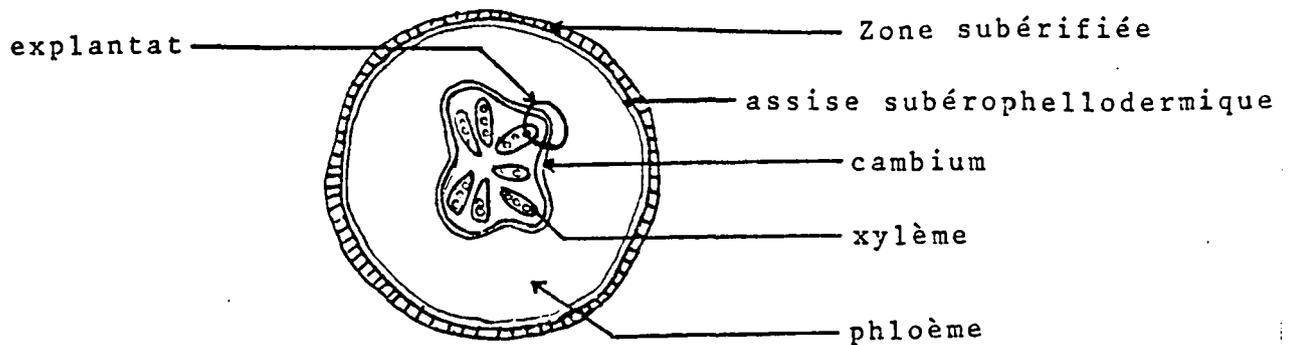


Schéma 4 : section transversale d'une racine de chicorée.



Les explantats cultivés sur le milieu de prolifération forment tous un cal quel que soit le lieu de prélèvement sur la racine. Les résultats de la figure 7 soulignent cependant des différences dans les capacités de prolifération. Ce sont les fragments provenant de la région médiane qui présentent dans l'ensemble, la meilleure croissance (Figure 8 A). Les proliférations les plus faibles sont observées sur les explantats prélevés dans la partie proximale de la racine, située au voisinage du collet. D'autre part, il apparaît que les différents tissus de la racine ne présentent pas les mêmes potentialités (Figure 8 B).

Les explantats prélevés au niveau du xylème produisent des cals plus réduits souvent brunâtres alors que ceux issus du phloème ont une prolifération plus intense et donnent des cals vert-clairs. Ce sont cependant, les tissus prélevés au niveau de la zone cambiale qui prolifèrent le plus intensément. Ceci est remarquable en particulier pour la partie médiane de la racine ; ces tissus présentent une prolifération qui est plus que doublée par rapport à celle observée sur les autres tissus. Il semble donc, que le choix de la zone où sont habituellement prélevés nos explantats soit ainsi justifié. Ces explantats renferment en effet du phloème et du xylème secondaires situés de part et d'autre de la zone génératrice libéroligneuse. De plus lors de nos expérimentations ultérieures, nous avons toujours pris la précaution d'éliminer la partie de la racine proche du collet ainsi que la portion distale. Seuls sont utilisés, les tissus de la région médiane.

6) Evolution de la croissance des explantats

Au cours des deux premiers jours de culture, on constate une importante entrée d'eau dans les tissus et le doublement de leur poids de matière fraîche. Le phénomène se ralentit ensuite et la teneur en eau des tissus devient pratiquement constante à partir du 5e jour de culture (Figure 9).

Le poids de matière sèche, après un léger fléchissement au cours de la première journée augmente, bien que faiblement, tout au long de la culture. Cette hausse est cependant sans

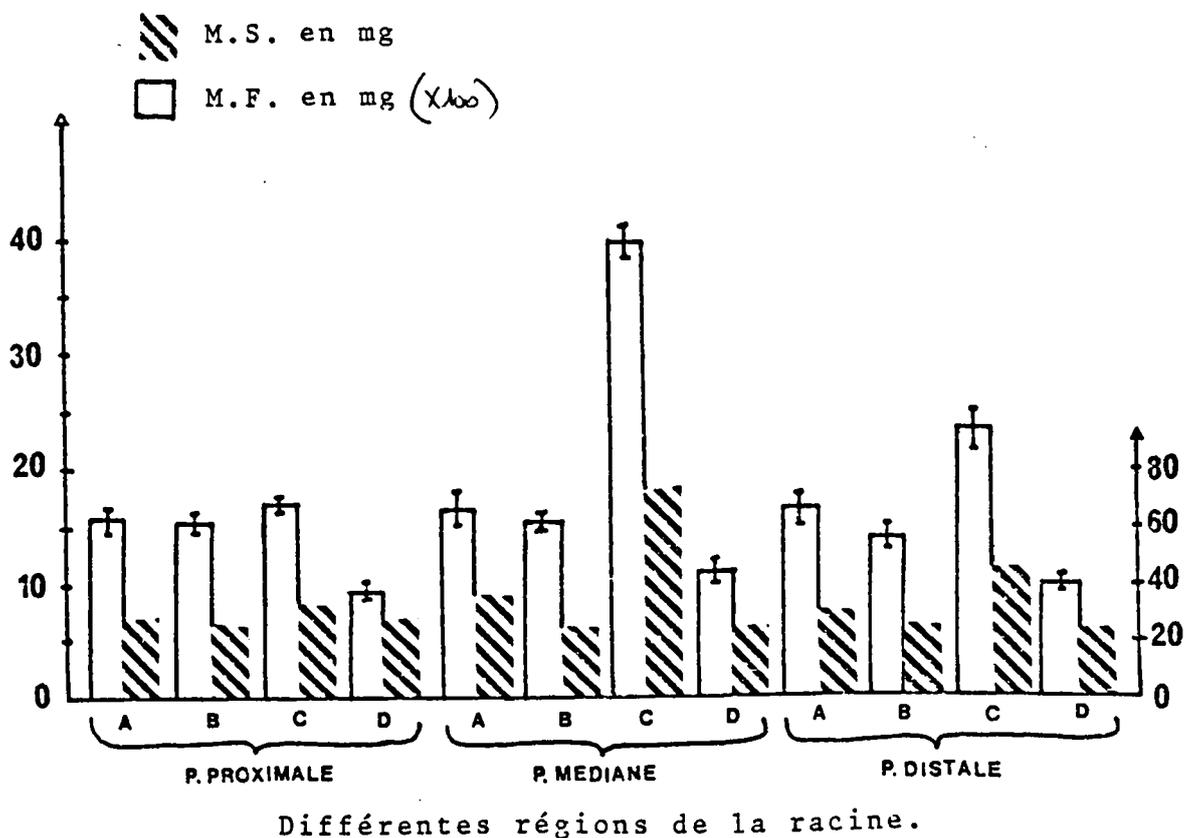


Figure 7 : Influence de la nature des tissus et de leur lieu de prélèvement sur le pouvoir callogène des explantats cultivés sur le "milieu cal".

- 1 A: Explantat "hétérogène" (phloème + cambium + xylème)
- B: phloème
- C = cambium
- D: xylème

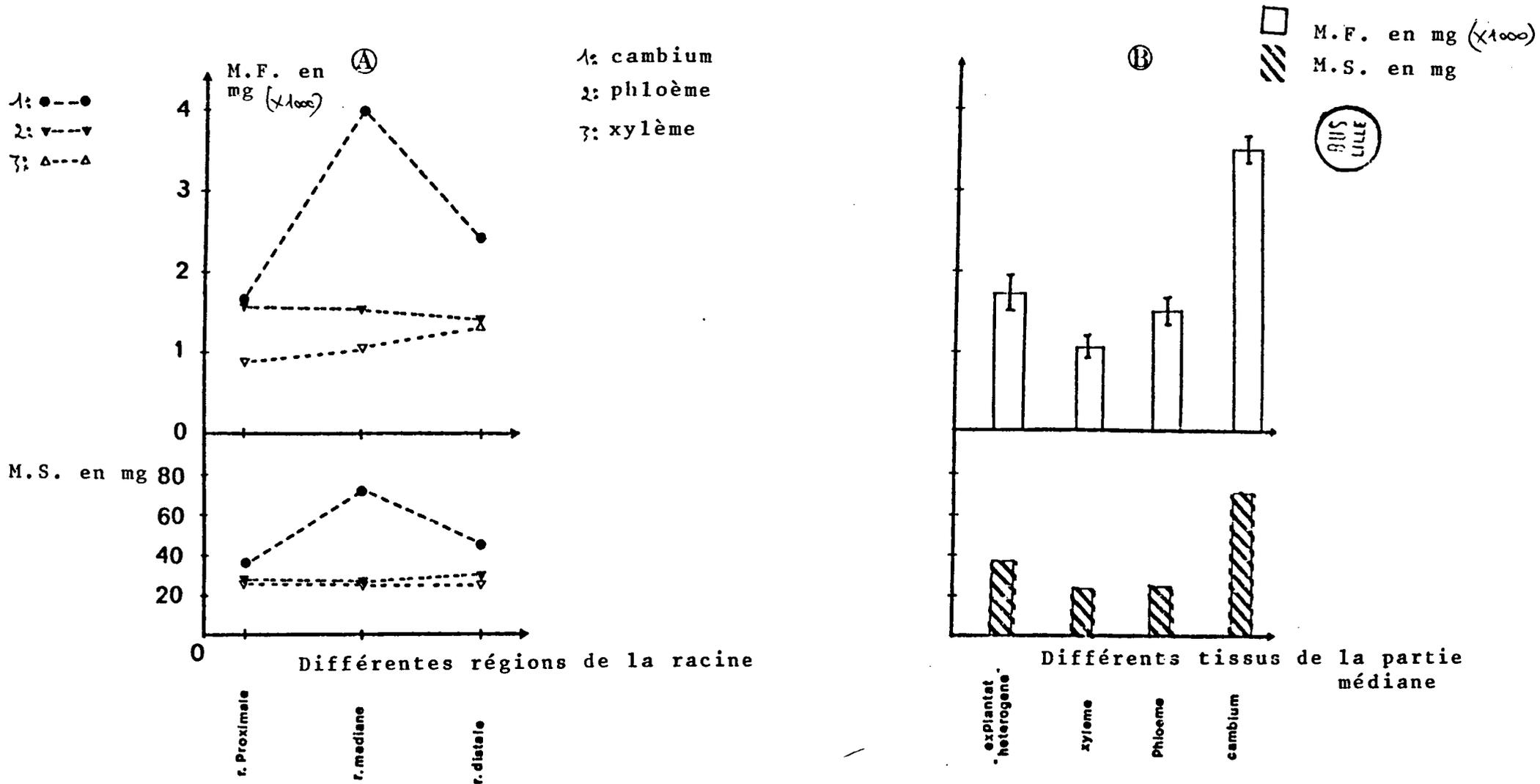


Figure 8 : Variation de l'intensité de la prolifération de fragments racinaires de *Cichorium Intybus* en fonction de :

- A : la nature des tissus et leurs lieux de prélèvement
- B : la nature des tissus de la partie médiane.

Le milieu renferme la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG additionnée d'ANA $5 \cdot 10^{-5}M$, de KIN $10^{-7}M$, de vitamines et d'hydrolysat de caséine.

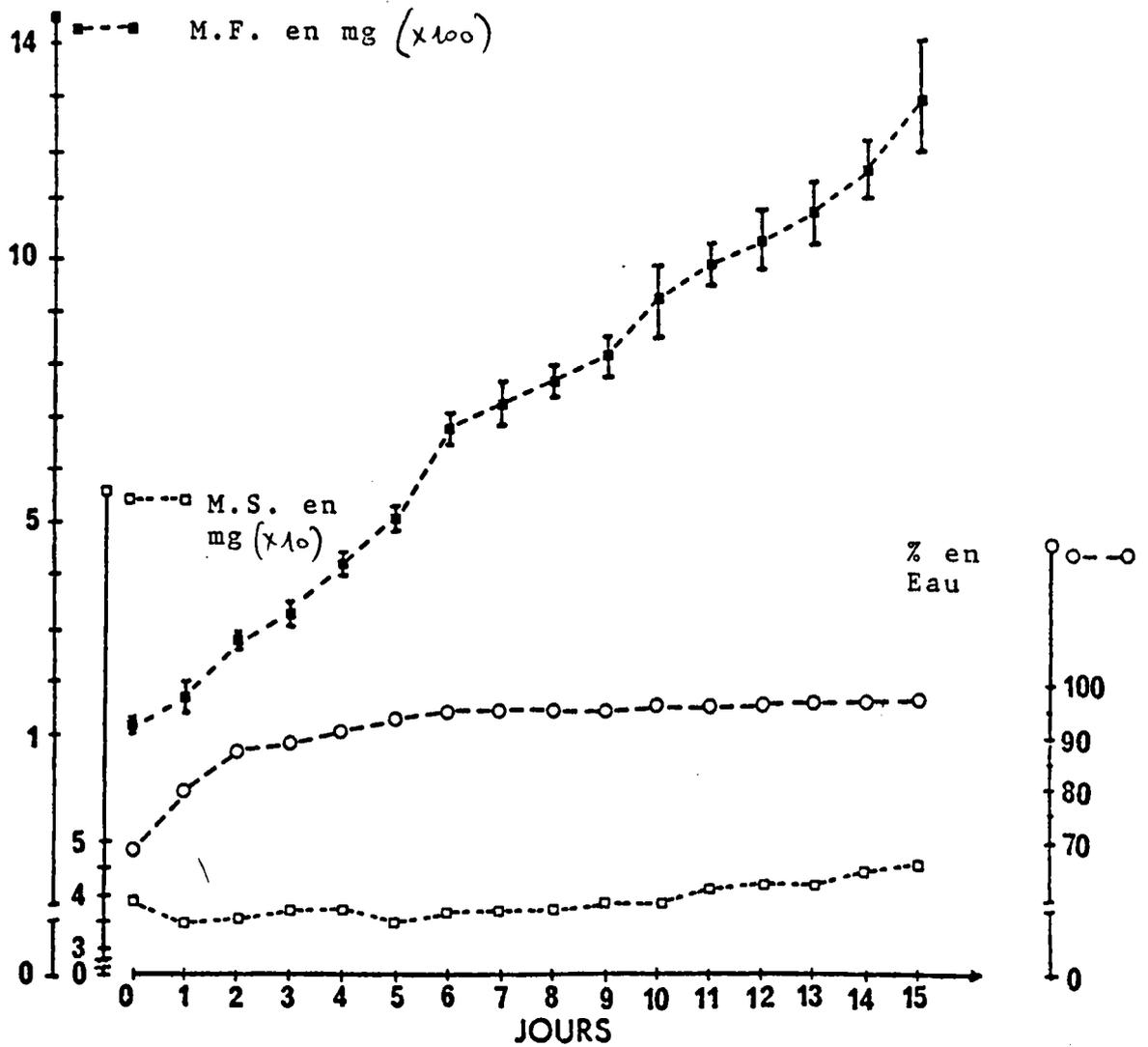


Figure 9 : Variation de la teneur en eau et des poids de matière fraîche et de matière sèche au cours de la culture *in vitro* de fragments racinaires de *Chicorium Intybus* sur le "milieu cal".



commune mesure avec l'accroissement de la matière fraîche qui correspond après 15 jours de culture à plus de 12 fois le poids des explantats initiaux.

Parallèlement, l'évolution de la teneur en protéines permet de distinguer deux étapes ; la première correspond à une stimulation importante au cours des 4 premiers jours de culture suivie d'une chute au 5e jour, la seconde augmentation qui débute au 6e jour est cependant nettement plus faible (Figure 10).

7) Analyse histologique des explantats au cours de la culture

Lors de leur mise en culture, les explantats renferment du phloème, du cambium et du xylème. Les noyaux de petite taille renferment plusieurs nucléoles de dimensions réduites et sont situés contre les parois des cellules.

Au cours des premières heures de culture, on note une réactivité nucléaire et nucléolaire caractérisée par la réduction du nombre des nucléoles par noyau ainsi que par l'augmentation de la taille de ces organites. Le noyau tend alors à prendre une position centrale dans la cellule.

Après 15 heures de culture, on observe les premiers recloisonnements des cellules cambiales (Planche II, Photo 1 et 2). Le phénomène s'intensifie ensuite s'accompagnant vers la 24e heure d'une néoformation importante de trachéïdes qui s'étalent en travées linéaires à proximité des vaisseaux préexistants. Au 22e jour se forment des îlots de petites cellules isodiamétriques présentant nettement un caractère de cellules méristématiques (noyaux et nucléoles volumineux et fortement colorables). Ces formations généralement localisées au contact des trachéïdes, évoluent en nodules méristématiques (Planche II, Photo 3 et 4).

Dans nos conditions expérimentales, ces nodules dont la différenciation ultérieure sera bloquée, deviendront le centre d'importants massifs de cellules en prolifération.

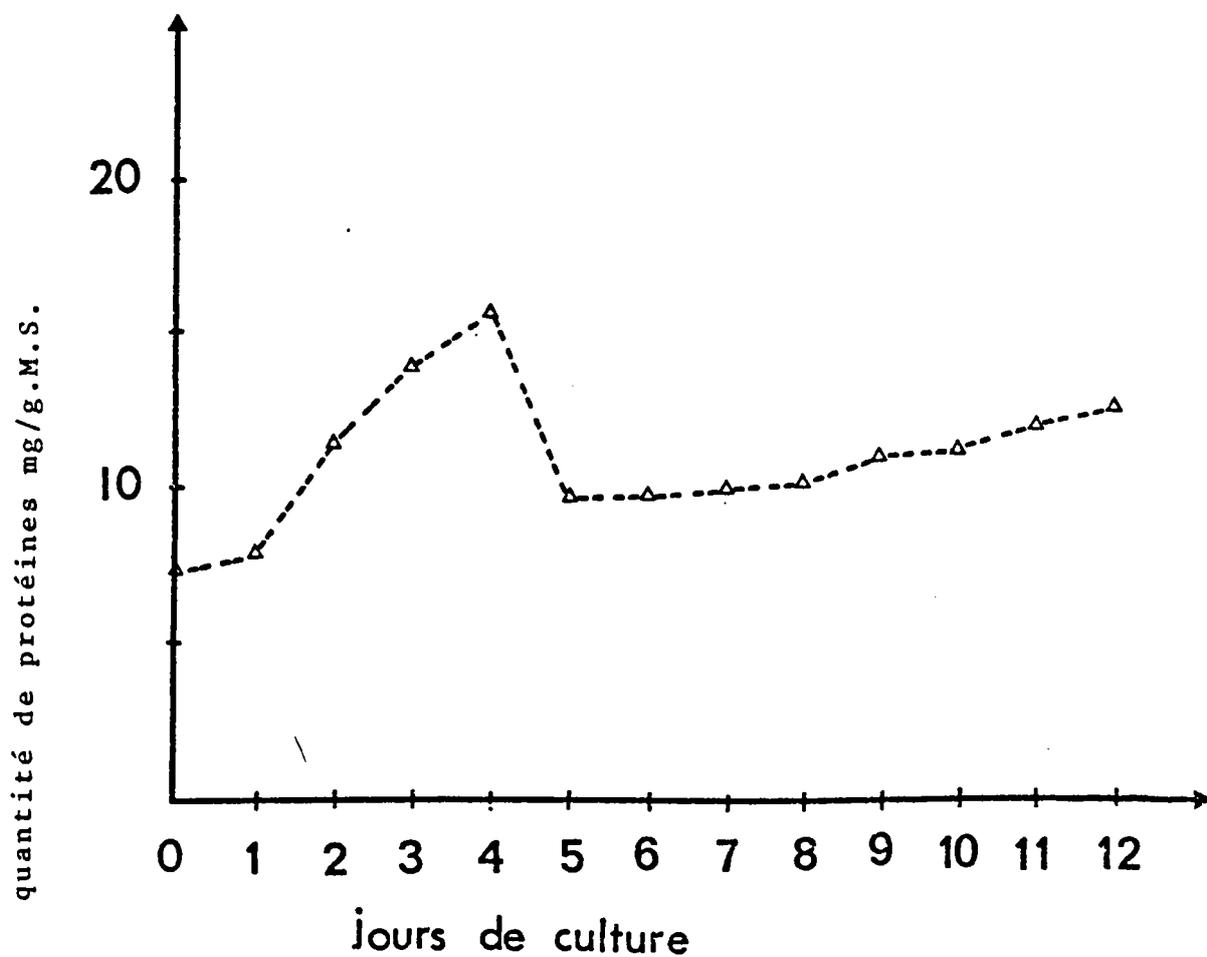


Figure 10 : Evolution de la teneur en protéines d'explantats racinaires de *Cichorium Intibus* cultivés *in vitro* sur le "milieu cal".

8) Expériences de transfert

Les fragments racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés sur un "milieu cal" prolifèrent abondamment sans organogénèse apparente. Nous nous sommes alors demandé, si à partir de cette masse cellulaire, il était encore possible d'induire des phénomènes d'organogénèse. De plus, afin de disposer de tissus à des stades différents de croissance, nous avons laissé séjourner des explantats sur le milieu initial pendant des durées variables. Les tissus sont alors transférés sur d'autres milieux pendant 30 jours.

a) Transfert des explantats cultivés initialement en présence du "milieu cal", sur des milieux inducteurs d'organes.

Les cals formés sur les fragments racinaires sont transférés sur des milieux nutritifs destinés à favoriser l'expression organogène des tissus. Les résultats de ces essais sont rassemblés dans le tableau 19.

α) Transfert sur un milieu sans hormones et sans glucides.

Lorsque les explantats sont transférés sur un milieu de base sans hormones et sans glucides, l'organogénèse est nulle et la prolifération très faible. La croissance des explantats se limite à l'épuisement de leurs propres réserves ainsi que des substances accumulées dans leurs tissus au cours de leur séjour sur le milieu de culture initial.

β) Transfert sur un milieu sans hormones mais additionné de glucose.

Si le transfert est effectué sur un milieu de base renfermant 1 % de glucose, il apparaît qu'un séjour d'une semaine sur le "milieu cal" suffit pour permettre la formation de nombreuses racines. Ces racines apparaissent sur toutes les cultures et leur nombre croît proportionnellement au temps de contact avec le milieu initial. Ainsi, le nombre d'organes néoformés sur les explantats ayant séjourné 4 semaines sur le "milieu cal" est plus que doublé par rapport à ceux qui sont restés seulement une semaine sur un milieu initial. Par ailleurs, la prolifération optimale nécessite un séjour de deux semaines sur le milieu initial.



Tableau 19 : Transfert après des temps variables (1, 2, 3 ou 4 semaines) des explantats racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés initialement en présence du "milieu cal" qui comprend le milieu de base = MB (solution minérale de M.S. + vitamines + hydrolysats de caséine) additionné d'ANA $5.10^{-5}M$ et de kinétine $10^{-7}M$, sur des milieux inducteurs d'organes. Les résultats sont exprimés en mg de matière fraîche (M.F.) ou de matière sèche (M.S.), en nombre moyen d'organes (racines ou bourgeons) et en pourcentage d'explantats porteurs de racines ou de bourgeons.

Transfert sur :	Milieu de base (MB)				MB + ANA $10^{-5}M$ + K $10^{-7}M$, glucose 1 g				MB + ANA $10^{-5}M$ + K $10^{-7}M$, glucose 1 g				MB + ANA $10^{-5}M$ + K $10^{-7}M$, glucose 1 g							
	1 s.	2 s.	3 s.	4 s.	1 s.	2 s.	3 s.	4 s.	1 s.	2 s.	3 s.	4 s.	1 s.	2 s.	3 s.	4 s.				
M.F. mg/explantat	227 ± 54	449 ± 77	657 ± 82	707 ± 60	1 354 ± 214	2 947 ± 387	2 306 ± 315	2 943 ± 227	2 470 ± 615	2 452 ± 278	2 001 ± 450	2 646 ± 267	497 ± 62	318 ± 64	253 ± 47	453 ± 54	2 721 ± 246	3 060 ± 359	2 503 ± 200	3 030 ± 613
M.S. mg/explantat	23,40	22,00	30,00	30,44	49,33	110,00	85,50	77,32	93,21	110,50	86,13	85,28	25,75	27,01	27,51	28,69	104,27	160,00	102,50	96,13
Nombre moyen racines/explantat	0	0	0	0	3,83	4,77	6,07	8,42	4,50	6,53	8,00	9,25	0	0	0	0	0	0	0,40	1,20
% d'explantats porteurs de racines	0	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	33	40
Nombre moyen de bourgeons/explantat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	> 20	> 20	> 20	> 20
% d'explantats porteurs de bourgeons	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100

γ) Transfert sur un "milieu inducteur de racines"

Ce milieu qui favorise la production de nombreuses racines (SENE et coll. 1983) a été mis au point lors d'essais sur la rhizogenèse de fragments racinaires. Le transfert des explantats sur un tel milieu (ANA 10^{-6} M + K 10^{-7} M + glucose 1%) permet d'observer une rhizogenèse généralisée des cultures quelle que soit la durée du séjour initial. La néoformation de racines augmente cependant en fonction de la durée du contact des fragments avec le "milieu cal" initial. De plus, on note que la prolifération est également optimale pour un séjour initial ne dépassant pas deux semaines.

λ) Transfert sur un "milieu inducteur de bourgeons"

Le repiquage des tissus sur un milieu qui renferme 10^{-6} M de BAP ne se traduit que par un faible accroissement de matière sèche. Cette cytokinine n'est pas capable à elle seule de déclencher l'apparition d'organes à la surface des tissus. On observe cependant, que les explantats présentent des nodules de couleur verte. Par contre, le transfert des explantats sur un milieu renfermant 10^{-6} M de BAP et 1 % de glucose provoque après une semaine de séjour sur le milieu initial, une abondante néoformation de bourgeons (plus de 20 bourgeons en moyenne par explantats). Les racines n'apparaissent que si le transfert est effectué après 3 semaines de contact avec le milieu initial, mais leur nombre reste relativement faible.

On peut également noter que les tissus acquièrent dans tous les cas, des capacités de proliférer abondamment au cours de la deuxième semaine sur le milieu initial. Des passages de longue durée sur le "milieu cal" ne sont donc pas nécessaires à la production des bourgeons puisque ceux-ci apparaissent en grand nombre après seulement une semaine de séjour sur le milieu initial.

De plus, ce transfert doit être effectué avant la deuxième semaine de séjour sur un milieu initial puisqu'au delà de ce délai, il y aura également apparition de racines.

b) Influence de la concentration auxinique du milieu initial sur l'organogenèse ultérieure.

α) Milieu renfermant 5.10^{-5} M d'ANA.

La culture primaire de fragments racinaires sur un milieu qui renferme 5.10^{-5} M d'ANA provoque la formation de cals chlorophylliens sans organe apparent.

Le repiquage de ces cultures sur un milieu minéral de HELLER n'a que peu d'effet sur leur croissance ultérieure sauf si le séjour sur le milieu initial a duré trois semaines (Tableau 20).

Lorsqu'on ajoute du glucose à 1 % au milieu de transfert, la prolifération cellulaire est maximale après un séjour initial d'une semaine, alors qu'un maintien prolongé des cultures sur le premier milieu ralentit fortement la croissance ultérieure.

A l'opposé, l'addition simultanée dans le milieu de repiquage de glucose à 1 % et d'une forte concentration d'auxine (ANA 5.10^{-5} M) stimule la prolifération cellulaire qui est très importante après un contact de deux semaines sur le milieu initial.

Il apparaît donc que lorsque le milieu initial ne renferme qu'une forte dose d'auxine (ANA 5.10^{-5} M), il a pour effet d'entraver l'organogenèse ultérieure des explantats.

β) Milieu renfermant 10^{-6} M d'ANA.

Ce milieu permet également la production de cals non organogènes qui sont cependant plus chlorophylliens que ceux obtenus en présence de 5.10^{-5} M d'ANA.

Le transfert des tissus sur un milieu nutritif comprenant simplement les éléments minéraux de la solution de HELLER, se traduit par un accroissement considérable de la prolifération (Tableau 21). Ainsi, les cultures qui ont séjourné trois semaines



Tableau 21 : Influence de la durée du séjour des explantats primaires sur un milieu initial comprenant la solution minérale de HELLER additionnée d'ANA 10⁻⁶M. Après 1, 2, 3 ou 4 semaines, les explantats sont transférés sur des milieux différents.

M.F. : poids moyen de matière fraîche par explantat (mg)
 M.S. : poids moyen de matière sèche par explantat (mg)
 r : nombre moyen de racines par explantat
 b : nombre moyen de bourgeons par explantat
 () : pourcentage des explantats porteurs de ce type d'organe.

Durée du séjour initial (semaines)	Composition du milieu de transfert											
	Heller				Heller + glucose 1 X				Heller + ANA 10 ⁻⁶ + glucose 1 X			
	1 s.	2 s.	3 s.	4 s.	1 s.	2 s.	3 s.	4 s.	1 s.	2 s.	3 s.	4 s.
M.F.	193 ± 33	489 ± 42	745 ± 45	626 ± 31	468 ± 57	682 ± 141	853 ± 120	772 ± 83	534 ± 102	956 ± 148	998 ± 152	1 075 ± 181
M.S.	7,39	27,25	30,40	22,86	33,05	53,68	58,70	44,07	34,03	59,27	60,23	62,10
Bourgeons	0	0	0	0	0	(80) 2,20	0	0	(16) 0,20	(60) 0,72	0	0
Racines	0	0	0	0	0	(60) 2,60	3,05 (72)	(60) 2,00	(50) 2,00	(66) 3,18	(75) 4,32	(50) 1,50

sur un milieu initial puis sont transférées, présentent un poids de matière fraîche multiplié par quatre par rapport à ceux des fragments cultivés durant seulement une semaine sur le milieu initial.

La néoformation d'organes nécessite cependant la présence de 1 % de glucose dans le milieu de repiquage. Dans ces conditions, un séjour de deux semaines sur le milieu suffit pour permettre à la fois, la production de racines et de bourgeons.

C'est cependant en associant le glucose (1 %) et l'ANA (10^{-6} M) que l'apparition des organes est la plus favorisée. Néanmoins, le bourgeonnement disparaît après un séjour supérieur à deux semaines sur le milieu initial et le maximum de racines est obtenu après un passage de trois semaines sur ce milieu.

La prolifération cellulaire des explantats est donc favorisée par un contact de 3 semaines avec le milieu initial suivi d'un transfert sur un milieu pourvu d'ANA (10^{-6} M) et de glucose (1 %).

9) La nutrition minérale.

Jusqu'à présent, nous avons arbitrairement employé la solution minérale de HELLER. Néanmoins, le fait qu'elle ait été élaborée pour des tissus autres que ceux de *Cichorium Intybus* pourrait impliquer que sa composition ne soit peut être pas optimale pour ces tissus.

C'est pourquoi, nous avons voulu comparer l'action exercée par quelques solutions minérales, employées couramment en culture des tissus.

a) Action de quelques solutions minérales.

A partir de milieux de culture renfermant de l'ANA $5 \cdot 10^{-5}$ M, de la kinétine à 10^{-7} M, des vitamines et de l'hydrolysate de caséine, nous avons comparé l'action de différentes solutions minérales (Figure 11).

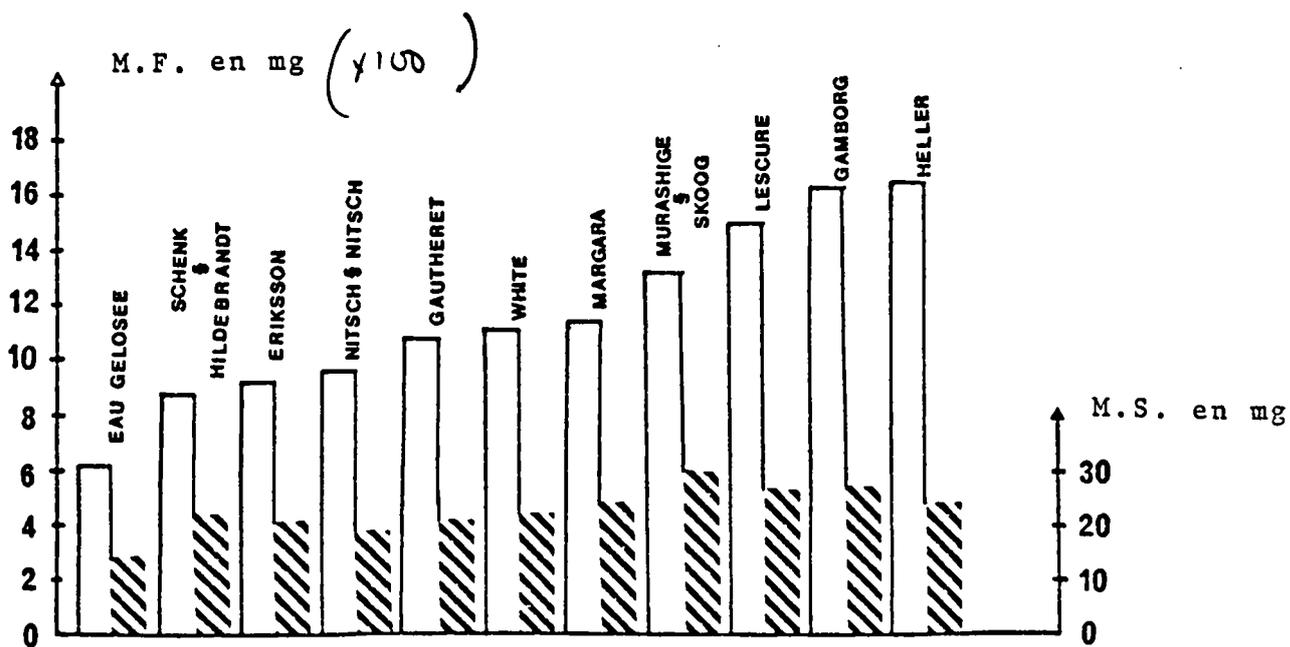


Figure 11 : Influence de différentes solutions minérales sur la prolifération cellulaire de fragments racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés sur des milieux renfermant de l'ANA $5.10^{-5}M$, de la kinétine $10^{-7}M$, des vitamines et de l'hydrolysate de caséine.



En l'absence de sels minéraux (eau gélosée), les explantats n'ont qu'une croissance très faible. A partir du 10^e jour de culture, les tissus se nécrosent progressivement en libérant dans le milieu nutritif des substances de teinte brune, sans doute de nature polyphénolique.

Les solutions minérales utilisées peuvent être rassemblées en deux groupes:

. Le premier groupe comprend les solutions proposées par WHITE (1943), SCHENK et HILDEBRANDT (1972), ERIKSSON (1965), NITSCH et NITSCH (1956), et GAUTHERET (1959). Les explantats après 30 jours de culture présentent une prolifération satisfaisante, caractérisée par une masse moyenne de 900 à 1 100 mg de matière fraîche et d'environ 20 mg de matière sèche par explantat.

. Le second groupe constitué des solutions de MURASHIGE et SKOOG (1962), de LESCURE (1969), de GAMBORG (1974), de HELLER (1953) et de MARGARA (1966) est nettement plus favorable à la croissance des explantats. Les valeurs moyennes des poids de matière fraîche varient entre 1 100 et 1 600 mg alors que les poids de matière sèche se situent entre 20 et 30 mg par explantat. Il faut cependant remarquer, que la solution minérale de HELLER que nous avons employée lors de nos essais antérieurs, se révèle avoir la même efficacité sur l'augmentation de matière sèche des explantats que celle de MARGARA (1966) mise au point lors d'études sur le bourgeonnement inflorescentiel des tissus de chicorée. Parmi toutes ces solutions, c'est celle de MURASHIGE et SKOOG (1962) qui s'est montrée la plus efficace puisqu'elle permet d'obtenir environ 30 mg de matière sèche par explantat. Nous avons donc choisi de l'utiliser pour la suite de nos essais.

On peut cependant penser que la concentration ionique totale ainsi que la nature et les proportions respectives en chacun des éléments minéraux sont autant de facteurs déterminant l'efficacité des solutions minérales. C'est pourquoi, dans un premier temps en utilisant les solutions de HELLER (1953) et de MURASHIGE & SKOOG (1962), nous avons recherché la concentration ionique totale la plus favorable à la croissance des tissus de *Cichorium Intybus*.

b) Influence de la concentration ionique totale.

La concentration ionique totale de la solution de MURASHIGE & SKOOG (1962) (93,3 mg/l) étant supérieure à celle du milieu de HELLER (39,8 mg/l), nous avons étudié les effets de différentes concentrations de ces solutions ; soit respectivement 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150 et 200 (Tableau 22). On observe une augmentation de la formation de matière sèche lorsqu'on multiplie la concentration ionique totale de la solution minérale de HELLER par un facteur multiplicateur de 1,5, 2 et 2,5. C'est cette dernière condition qui provoque la prolifération la plus importante des tissus. Au delà, la callogenèse est fortement inhibée. La solution préconisée par MURASHIGE & SKOOG (1962) s'est par contre avérée meilleure pour une concentration ionique totale de 100 meq/l ce qui correspond approximativement à sa composition normale. Les valeurs supérieures marquent une diminution sensible de la croissance des tissus.

De ces résultats, il ressort que la concentration ionique totale la plus favorable à la prolifération des explantats de *Cichorium Intybus* est voisine de 100 meq/l. De plus, puisque ces essais confirment la supériorité de la solution de MURASHIGE & SKOOG (1962), nous l'avons sélectionnée pour réaliser quelques essais sur l'action exercée par certains des ions qui la constituent.

Une telle expérimentation peut être controversée en raison notamment de l'influence de la composition minérale initiale des tissus et de la nature de leur nutrition antérieure. Il semble cependant que les réserves stockées sont nettement insuffisantes. En effet, lorsque les explantats sont cultivés sur un milieu ne contenant aucun élément minéral (eau gélosée) (Tableau 22), ils présentent une croissance réduite et se nécrosent rapidement. Il suffit alors d'un faible apport d'éléments minéraux (20 mg/l) pour augmenter le poids de matière sèche de plus de 60 %. Nous n'avons cependant pas procédé à une analyse systématique de tous les éléments minéraux. Notre choix s'est limité à certains ions de la solution de MURASHIGE & SKOOG (1962) en particulier : NO_3^- , NH_4^+ , H_2PO_4^- , K^+ et Ca^{++} .

Tableau 22 : Influence de la concentration ionique totale sur la prolifération cellulaire d'explantats racinaires de *Cichorium Intybus* L. cultivés *in vitro* pendant 30 jours sur un milieu renfermant de l'ANA, $5.10^{-5}M$, de la kinétine à $10^{-7}M$, des vitamines et de l'hydrolysate de caséine.



concentration ionique totale solution minérale (meq/l)		0	20	40	60	80	100	120	150	200
Témoins : Eau gélosée										
Facteur multiplicateur			1/2	1	1,5	2	2,5	3	3,75	5
HELLER (1953)	M.F. (mg)	627 ± 101	1 366 ± 96	1 564 ± 194	1 917 ± 222	1791 ± 269	1 776 ± 225	1 231 ± 150	1 039 ± 247	919 ± 87
	M.S. (mg)	14,09	23,41	27,63	34,82	35,10	37,71	31,06	29,61	25,33
	% Eau	97,75	98,28	98,23	98,18	98,04	97,87	97,47	97,15	97,24
	calcs	bruns	vert clair et léger brunissement au contact du milieu	vert-clair	vert-clair	vert-clair	vert-clair	vert-clair	vert en surface mais nécrosé au contact du milieu	vert en surface mais des tissus
Facteur multiplicateur			1/5	2/5	3/5	4/5	1	1,2	1,5	2
MURASHIGE & SKOOG (1962)	M.F. (mg)		1 333 ± 101	1 446 ± 151	1 486 ± 156	1 328 ± 103	1 304 ± 113	1 145 ± 129	999 ± 95	809 ± 80
	M.S. (mg)		25,16	27,62	28,83	28,89	39,83	36,51	31,28	29,40
	% Eau		98,11	98,08	98,05	97,82	96,94	96,81	96,86	96,36
	Observations		vert clair et léger brunissement au contact du milieu	vert-clair	vert-clair	vert-clair	vert-clair	vert-clair	vert en surface et brunissement au contact du milieu	vert en surface et brunissement au contact du milieu

c) Influence de la nutrition azotée.

Nous avons étudié l'importance de la nature de la source azotée (nitrique ou ammoniacale) et déterminé les concentrations ioniques optimales (Tableau 23).

α) Influence de l'ion NO_3^-

Lorsque le milieu est dépourvu de source d'azote minéral, les explantats forment des cals massifs et chlorophylliens. On remarque cependant, que l'addition de nitrates n'améliore guère la croissance (Figure 12a). Tout au plus observe-t-on pour des doses de 40 à 80 mg/l de NO_3^- une légère augmentation du poids de matière sèche.

β) Influence de l'ion NH_4^+

L'azote minéral, fourni exclusivement sous forme ammoniacale, s'est avéré très toxique (Figure 12 b). En particulier, une concentration de 20 mg/l de NH_4^+ (teneur normale dans la solution de MURASHIGE & SKOOG (1962), réduit pratiquement de moitié l'intensité de la prolifération observée sur les cultures témoins cultivées sans sels ammoniacaux.

d) Action conjuguée des ions NO_3^- et H_2PO_4^-

Afin de cerner l'action effective de chacun de ces ions, nous avons maintenu les teneurs respectives de tous les autres éléments minéraux de la solution de MURASHIGE & SKOOG (1962) et fait varier les nitrates et les phosphates.

La figure 13 montre que l'ion H_2PO_4^- ne semble pas présenter d'effet très net sur la croissance des explantats si ce n'est une légère inhibition.

En l'absence de phosphates, l'addition de l'ion NO_3^- provoque une importante stimulation de la prolifération des tissus qui se traduit par une croissance deux fois supérieure à celle présente dans la solution de MURASHIGE & SKOOG (1962) (Tableau 24).

Associés aux nitrates, les phosphates employés à 1,5 mg/l (ce qui correspond à la quantité présente dans le milieu

Tableau 23 : Action conjuguée du NO₃⁻ et du NH₄⁺ (en meq/l) sur la croissance des explantats racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés sur le "milieu cal".



NH ₄ ⁺ (M)	NO ₃ ⁻ (M)	Concentration de la solution de MURASHIGE & SKOOG normale				
		0	40	80	120	160
0	M.F. (م.ف.)	1 621 ± 231	1 486 ± 256	1 096 ± 217	635 ± 103	433 ± 92
	M.S. (م.س.)	34,96	39,45	38,33	30,37	37,61
	X Eau (م.ع.)	97,84	97,34	96,50	95,21	93,62
	cal	vert-clair	vert-clair	vert-clair	vert-clair	vert-clair
10	M.F. (م.ف.)	883 ± 196	898 ± 135	538 ± 103	341 ± 74	298 ± 27
	M.S. (م.س.)	23,20	35,25	27,62	27,07	25,36
	X Eau (م.ع.)	97,37	96,07	94,86	92,06	91,48
	cal	vert-clair	vert-clair	vert-clair	vert-clair mais très léger brunissement au contact du milieu	vert-clair mais léger brunissement au contact du milieu
20	M.F. (م.ف.)	502 ± 109	558 ± 125	336 ± 112	283 ± 28	152 ± 17
	M.S. (م.س.)	18,98	27,49	26,39	23,32	17,50
	X Eau (م.ع.)	96,21	95,07	92,14	91,75	88,48
	cal	vert en surface mais légèrement brun au contact du milieu	vert-clair	vert en surface mais léger brunissement au contact du milieu	vert en surface mais léger brunissement au contact du milieu	vert clair mais léger brunissement au contact du milieu
40	M.F. (م.ف.)	445 ± 98	450 ± 107	304 ± 91	256 ± 28	144 ± 21
	M.S. (م.س.)	18,41	24,21	23,78	21,97	17,36
	X Eau (م.ع.)	95,86	94,62	92,17	91,41	87,94
	cal	vert en surface et léger brunissement au contact du milieu	vert-clair	vert en surface mais léger brunissement au contact du milieu	vert en surface mais léger brunissement au contact du milieu	vert en surface mais léger brunissement au contact du milieu
60	M.F. (م.ف.)	340 ± 29	370 ± 106	193 ± 23	167 ± 10	164 ± 27
	M.S. (م.س.)	18,30	19,90	19,84	18,20	15,35
	X Eau (م.ع.)	94,61	94,62	89,72	89,10	90,64
	cal	vert-clair	vert en surface et légèrement brun au contact du milieu	vert en surface et léger brunissement au contact du milieu	compact et brun	compact et brun

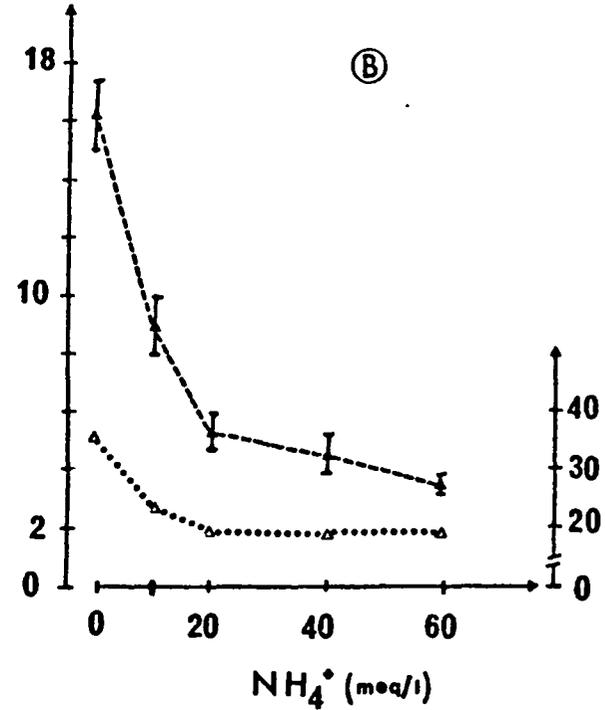
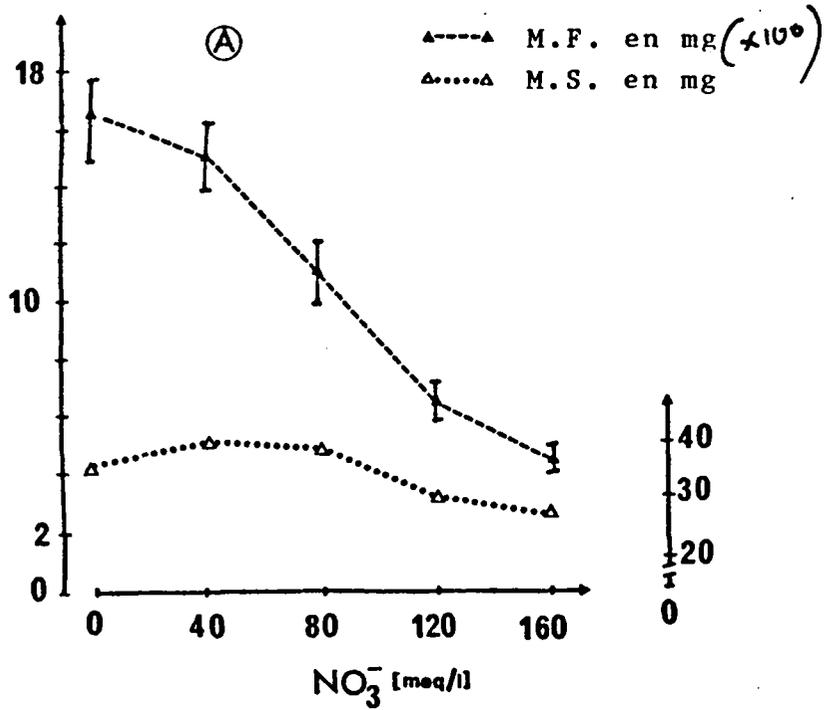


Figure 12 : Influence de la nutrition azotée sur la prolifération de fragments racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés *in vitro* pendant 30 jours. Le milieu utilisé renferme la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG privée de ses constituants azotés (NH_4NO_3 et KNO_3 sont supprimés et l'ion K^+ est remplacé par son équivalent à partir d'une solution de KCl) et additionnée d'ANA $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$, de Kin 10^{-7}M , de vitamines et d'hydrolysate de caséine.

A : l'ion NO_3^- est apporté sous forme de NaNO_3
 B : l'ion NH_4^+ est apporté sous la forme de NH_4Cl

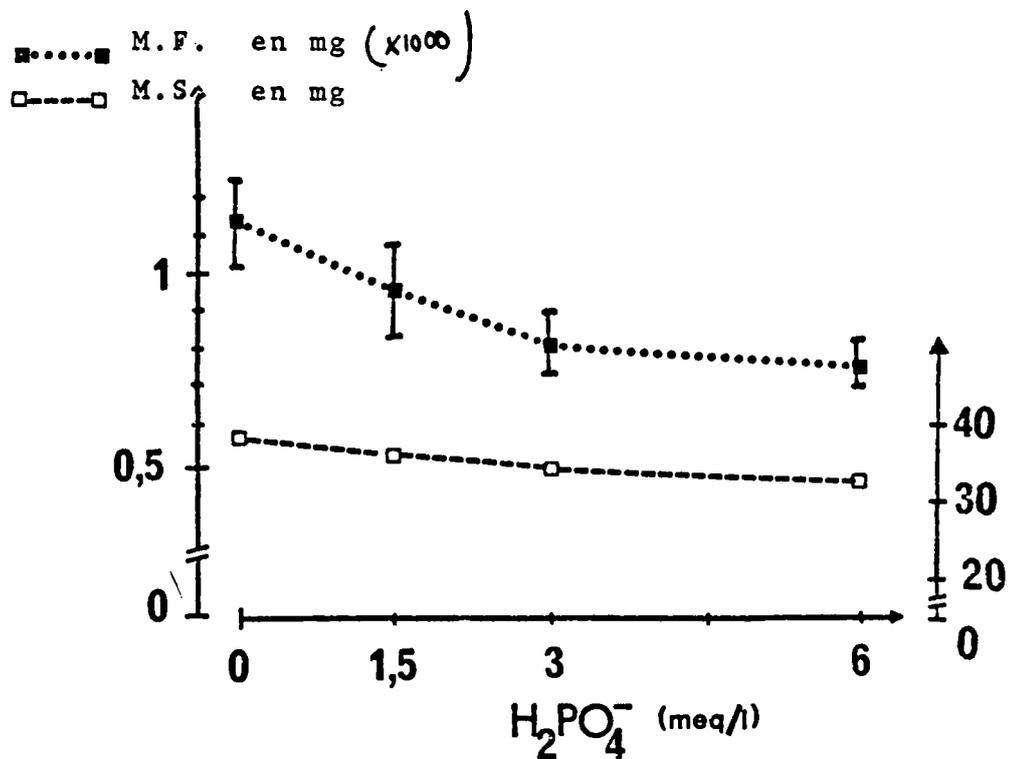


Figure 13 : Action de l'ion $H_2PO_4^-$ sur la prolifération de fragments racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés sur un milieu renfermant la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG additionnée d'ANA $5.10^{-5}M$ de KIN $10^{-7}M$, de vitamines et d'hydrolysate de caséine.
L'ion $H_2PO_4^-$ est fourni sous forme de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; le K^+ du KH_2PO_4 est remplacé par son équivalent d'une solution de KCl.





Tableau 24 : Action conjuguée du NO₃⁻ et du H₂PO₄⁻ sur la croissance d'explantats racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés sur le "milieu cal".

H ₂ PO ₄ ⁻	NO ₃ ⁻	Concentration de la solution de MURASHIGE & SKOOG normale			
		0	40	80	120
0	M.F.	1 466 ± 191	1 139 ± 209	1 183 ± 213	1 114
	M.S.	34,17	38,17	43,57	41,95
	% Eau	97,66	96,64	96,31	96,23
	cal	vert en surface mais brunissement au contact du milieu	vert-clair	vert-clair	vert en surface léger brunissement au contact du milieu
1,5 concentration de la solution de MURASHIGE & SKOOG normale	M.F.	1 450 ± 217	952 ± 181	1 089 ± 142	961 ± 160
	M.S.	34,51	36,22	42,95	39,02
	% Eau	97,62	96,19	96,05	95,93
	cal	vert en surface mais brunissement au contact du milieu	vert-clair	vert-clair	vert en surface et léger brunissement au contact du milieu
3	M.F.	1 268 ± 161	813 ± 115	947 ± 88	967 ± 142
	M.S.	34,24	29,08	39,31	35,01
	% Eau	97,29	96,42	95,84	95,96
	cal	vert en surface mais brun au contact du milieu	vert en surface mais brun au contact du milieu	vert en surface mais brun au contact du milieu	vert en surface mais brun au contact du milieu
6	M.F.	1 039 ± 102	757 ± 150	790 ± 156	606 ± 149
	M.S.	32,31	27,81	28,44	26,48
	% Eau	96,89	96,32	96,40	95,63
	cal	vert clair mais brun au contact du milieu	vert en surface mais brun au contact du milieu	vert en surface mais brun au contact du milieu	vert en surface mais brun au contact du milieu

N.B. : M.F. : Poids moyen de matière fraîche par explantat (mg)
M.S. : Poids moyen de matière sèche par explantat (mg)

de MURASHIGE & SKOOG (1962), ne modifient pas l'effet des nitrates, alors qu'à des doses plus élevées, ils réduisent nettement la callogénèse.

e) Action conjuguée du Ca^{++} et du K^+ .

Le calcium est favorable à la croissance jusqu'à la concentration de 18 meq/l (figure 14a). De même l'apport de potassium stimule le développement des explantats pour des teneurs égales ou inférieures à 40 meq/l (Figure 14b).

L'association du Ca^{++} et du K^+ dans le milieu présente des effets bénéfiques évidents en particulier lorsqu'ils sont employés aux concentrations respectives de 18 et 40 meq/l. Cette condition provoque une prolifération qui correspond au double de celle observée sur des cultures témoins (Tableau 25). Ces résultats font ressortir, que les tissus de la chiorée Witloof présentent des besoins très largement supérieures aux doses de Ca^{++} et de K^+ contenues dans la solution de MURASHIGE & SKOOG (1962) ; ces besoins correspondent respectivement au triple et au double de leurs concentrations.

f) Conclusions

Afin de vérifier nos observations précédentes, nous avons cultivé des fragments sur un milieu de prolifération renfermant la solution de MURASHIGE & SKOOG (1962) modifiée en certains de ses constituants. Les résultats du tableau 25bis confirment bien la nécessité d'augmenter la teneur en K^+ et en Ca^{++} et de supprimer complètement l'azote minéral de la solution de MURASHIGE & SKOOG (1962) pour améliorer la prolifération des explantats. Les tissus de *Cichorium Intybus* utilisent donc préférentiellement l'azote sous forme organique.

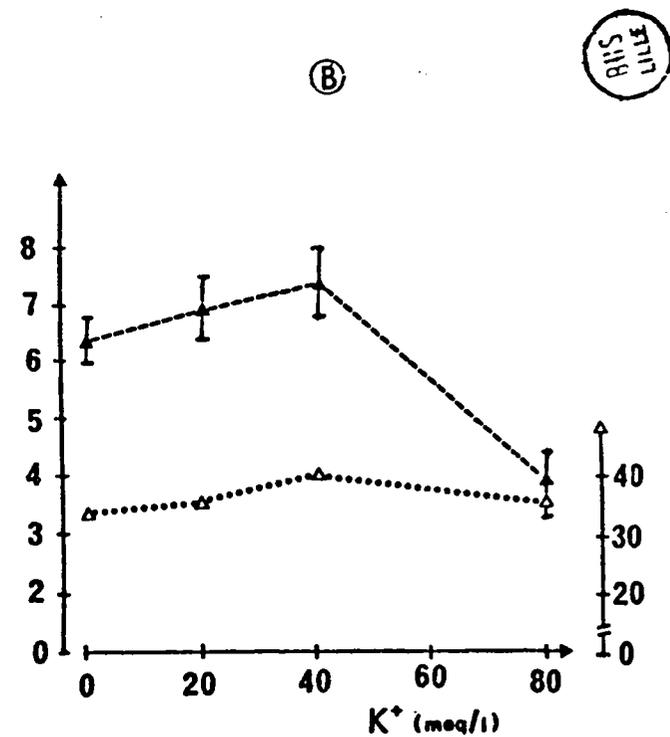
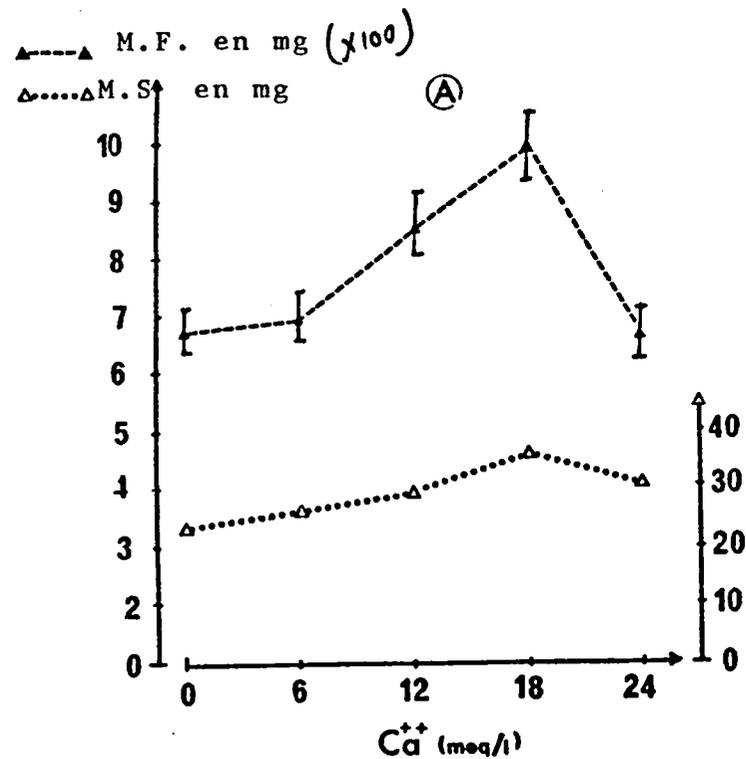


Figure 14 : Action du calcium (Ca) et du potassium (K)

Le milieu renferme la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG additionnée d'ANA $5 \cdot 10^{-5}M$, de KIN $10^{-7}M$, de vitamines et d'hydrolysate de caséine.

A : le calcium est fourni sous forme de $CaCl_2$

B : le potassium est fourni de deux manières :

- les concentrations normales en KNO_3 et KH_2PO_4 sont maintenues
- le reste est apporté sous forme de KCl .





Tableau 25 : Action conjuguée du Calcium et du Potassium (en meq/l) sur la croissance des fragments racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés sur le "milieu cal".

K ⁺	Ca ⁺⁺	Concentration de la solution de MURASHIGE & SKOOG normale					
		0	6	12	18	24	
20 concentration de la solution de MURASHIGE & SKOOG normale	0	M.F.	577 ± 95	637 ± 78	722 ± 92	771 ± 92	594 ± 103
		M.S.	21,80	23,30	28,32	35,26	24,90
		% Eau	96,22	96,34	96,07	95,42	95,80
		cal	vert-clair	vert-clair	vert-clair	vert-clair	vert-clair
	40	M.F.	668 ± 82	680 ± 86	855 ± 107	983 ± 103	665 ± 105
		M.S.	27,33	25,61	28,85	36,50	31,20
		% Eau	96,51	96,23	96,62	96,28	95,30
		cal	vert-clair	vert-clair	vert-clair	vert-clair	vert-clair
	80	M.F.	710 ± 97	732 ± 94	1 080 ± 118	1 122 ± 177	922 ± 112
		M.S.	29,42	30,22	31,88	43,82	38,79
		% Eau	95,85	95,87	97,04	96,09	95,79
		cal	vert-clair	vert-clair	vert-clair	vert-clair	vert-clair
80	M.F.	NECROSE	387 ± 87	597 ± 89	574 ± 78	320 ± 98	
	M.S.	DES	26,63	27,45	23,94	22,20	
	% Eau		93,11	95,40	95,82	93,06	
	cal	TISSUS	vert-clair	vert-clair	vert-clair	vert-clair	

N.B. : M.F. : Poids moyen de matière fraîche par explantats (mg)

M.S. : Poids moyen de matière sèche par explantat (mg)



Tableau 25 bis : Croissance des explantats racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés sur un "milieu de prolifération" contenant de l'ANA à $5 \cdot 10^{-5}$ M, de la kinétine à 10^{-7} M, de l'hydrolysate de caséine, des vitamines et de la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG (1962) modifiée ou non.

(solution minérale de MURASHIGE & SKOOG	(normale	(sans NH_4^+ $\text{Ca}^{++} \times 3$ $\text{K}^+ \times 2$	(sans NH_4^+ sans NO_3^- $\text{Ca}^{++} \times 3$ $\text{K}^+ \times 2$
(Matière fraîche par explantat (mg)	(675,0	(836,3	(1 183,9
(Matière sèche par explantat (mg)	(21,3	(24,9	(27,4
(% Eau	(96,84	(97,02	(97,68

DEUXIEME PARTIE

COLONIES TISSULAIRES

COLONIES TISSULAIRES

I - ETABLISSEMENT D'UNE COLONIE TISSULAIRE A PARTIR D'EXPLANTATS RACINAIRES.

Les explantats racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés sur le "milieu cal" se développent de manière exubérante pendant 4 à 6 semaines. Après deux mois, la prolifération diminue ; les tissus prennent progressivement un aspect spongieux par suite de leur vieillissement. Des zones brunes, nécrotiques, apparaissent alors par endroit et envahissent peu à peu l'ensemble des cals. Cette évolution est caractéristique des tissus végétaux cultivés *in vitro* quelle que soit leur origine (GAUTHERET, 1959). Elle a généralement pour cause l'épuisement des substances nutritives contenues dans le milieu de culture mais aussi des conditions particulières de croissance telles que :

- la lignification ou la subérification des cellules périphériques, ce qui gêne la nutrition des régions en prolifération.
- la compacité des tissus néoformés qui entraîne une asphyxie des régions internes.
- l'inanition des portions les plus éloignées du milieu lorsque la prolifération est abondante.

Il est donc nécessaire pour entretenir la croissance des tissus, de transférer périodiquement les zones en croissance active sur des milieux nutritifs, de composition adéquate.

Dans les essais qui suivent, nous avons tenté de prolonger la croissance des cals primitifs en procédant à des repiquages sur des milieux nutritifs qui contiennent la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG (1962) additionnée de 10^{-7} M de kinétine, de vitamines, d'hydrolysate de caséine et pourvus en outre d'ANA et de 2,4-D, substances employées seules ou associées. La présence de sucre nous ayant semblé indispensable à l'établissement d'une colonie tissulaire, nous avons utilisé une dose de 2 % de saccharose. Les cultures sont alors placées soit à la lumière, soit à l'obscurité pendant un mois.

1) Composition hormonale du milieu de culture.

Les cals formés à partir d'explantats racinaires se présentent d'abord sous forme de protubérances dont les cellules superficielles prolifèrent et recouvrent progressivement l'ensemble de l'explantat. Après 15 jours, on transfère ces cals sur des milieux nouvellement préparés. Un séjour de quelques jours à la lumière, permet aux tissus repiqués de manifester à nouveau une activité de prolifération. Vers le 10^e jour, les cultures sont alors en phase de croissance très active ; laquelle se manifeste par la présence de zones fortement chlorophylliennes qui s'agglomèrent entre elles et forment une colonie qui se développent en tout sens. Après un mois de culture, la croissance de ces colonies s'atténue. Les tissus évoluent cependant de manière différente selon la composition hormonale du milieu de repiquage (Tableau 26). Ainsi l'ANA à forte dose (10^{-5} et $5 \cdot 10^{-5}$ M) stimule puissamment la croissance des colonies tissulaires tandis qu'à $5 \cdot 10^{-6}$ M, on observe la production de racines. Après avoir choisi la dose de $5 \cdot 10^{-5}$ M d'ANA qui est la plus favorable à la prolifération cellulaire, nous nous sommes demandé, s'il n'était pas possible d'améliorer la croissance des colonies en faisant agir simultanément un facteur auxinique puissant tel que : le 2,4-D. Compte tenu des expériences antérieures, nous avons choisi d'utiliser cette substance à la dose de 10^{-7} et 10^{-6} M. Les résultats du tableau 26 montrent qu'en association avec des doses de $5 \cdot 10^{-5}$ M d'ANA, le 2,4-D inhibe la croissance des colonies tissulaires. Une prolifération intéressante peut être cependant observée pour des doses de 10^{-5} M d'ANA et de 10^{-7} M de 2,4-D. Ces résultats concernent les cultures exposées en permanence à la lumière, car à l'obscurité, la croissance des tissus s'est limitée à la formation des petites masses cellulaires brunâtres plus ou moins nécrosées. L'ampleur de la prolifération obtenue lors du repiquage des cultures primaires permet maintenant d'envisager l'entretien indéfini, à la lumière, de souches tissulaires de *Cichorium Intybus*. Le milieu de culture retenu comprend la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG (1962) additionnée de 10^{-5} M d'ANA, de 10^{-7} M de 2,4-D, de 10^{-7} M de kinétine, des vitamines, de l'hydrolysate de caséine et du saccharose à 2 % (Planche V, Photo 1B et 2 B).

Tableau 26 : Action conjuguée du 2,4-D et de l'ANA sur la croissance de colonies tissulaires de *Cichorium Intybus* cultivés à la lumière sur un milieu de culture renfermant la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG (1962) additionnée de KIN 10^{-7} M, de vitamines, d'hydrolysate de caséine et de saccharose à 2 %, pour une durée d'un mois.



		ANA (M)		10 ⁻⁵		5 10 ⁻⁵	
(2,4-D (M)		5 10 ⁻⁶		10 ⁻⁵		5 10 ⁻⁵	
0	M.F.	1 694	± 352	2 585	± 424	3 027	± 272
	M.S.	77		107		121	
	% Eau	95,45		95,86		96,00	
		présence de quel-					
		ques racines					
10 ⁻⁷	M.F.	1 913	± 322	3 281	± 144	1 551	± 290
	M.S.	79		133		72	
	% Eau	95,87		95,94		95,35	
		présence de quel-					
		ques racines					
10 ⁻⁶	M.F.	2 129	± 201	1 623	± 98	1 507	± 175
	M.S.	97		76		70	
	% Eau	95,44		95,31		95,35	
		présence de quel-					
		ques racines					

M.F. : poids moyen de matière fraîche des cultures par colonie (mg)
M.S. : poids moyen de matière sèche des cultures par colonie (mg)
poids moyen de matière fraîche de l'inoculum = 400 mg

2) Choix de la concentration en saccharose

La prolifération des fragments racinaires ne nécessite pas la présence de glucide exogène. Pour couvrir leurs besoins, les tissus puisent dans leurs réserves, constituées essentiellement par de l'inuline. L'épuisement de la plus grande partie de ces réserves au cours de la culture primaire (BACKOULA, 1983) doit donc créer lors des transferts ultérieurs, des besoins en glucides qu'il est alors nécessaire de satisfaire par des apports exogènes. C'est pourquoi, il nous a paru intéressant de rechercher la concentration optimale en saccharose nécessaire aux besoins des tissus à ce stade de la culture.

Nous constatons que le repiquage des cultures primaires sur un milieu dépourvu de glucides, se traduit pas une nécrose rapide des tissus ; alors qu'un apport très faible en saccharose (0,25 %) leur suffit pour proliférer (Figure 18).

La croissance s'accroît d'ailleurs à mesure que les doses augmentent, l'optimum étant atteint pour une concentration de saccharose de 1 %. Après un mois de culture, on obtient alors environ 8 fois le poids de matière fraîche de l'inoculum. Parallèlement, on observe une diminution de la teneur en eau des tissus lorsque le milieu de culture renferme une concentration de saccharose supérieure à 1 %. L'évolution de la masse de matière sèche semble alors traduire plus fidèlement l'activité cellulaire car elle présente pratiquement un palier au delà d'une teneur de 1 % en saccharose c'est-à-dire au moment où la production de matière fraîche accuse une réduction notable. Nous avons donc retenu d'utiliser le saccharose à la dose de 10g/l dans les milieux de culture nécessaires au transfert des cals formés sur les explantats racinaires.

3) Choix de l'âge de la culture primaire.

Le transfert des cultures primaires doit intervenir à un moment où les cultures possèdent une capacité importante à se diviser. Or nous avons pu constater, que la croissance des cals formés à partir de fragments racinaires de *Cichorium Intybus* atteignait un palier après 6 semaines. Nous nous sommes alors demandé, si tout au long de cette période, les tissus gardaient les mêmes capacités à proliférer après leur repiquage.

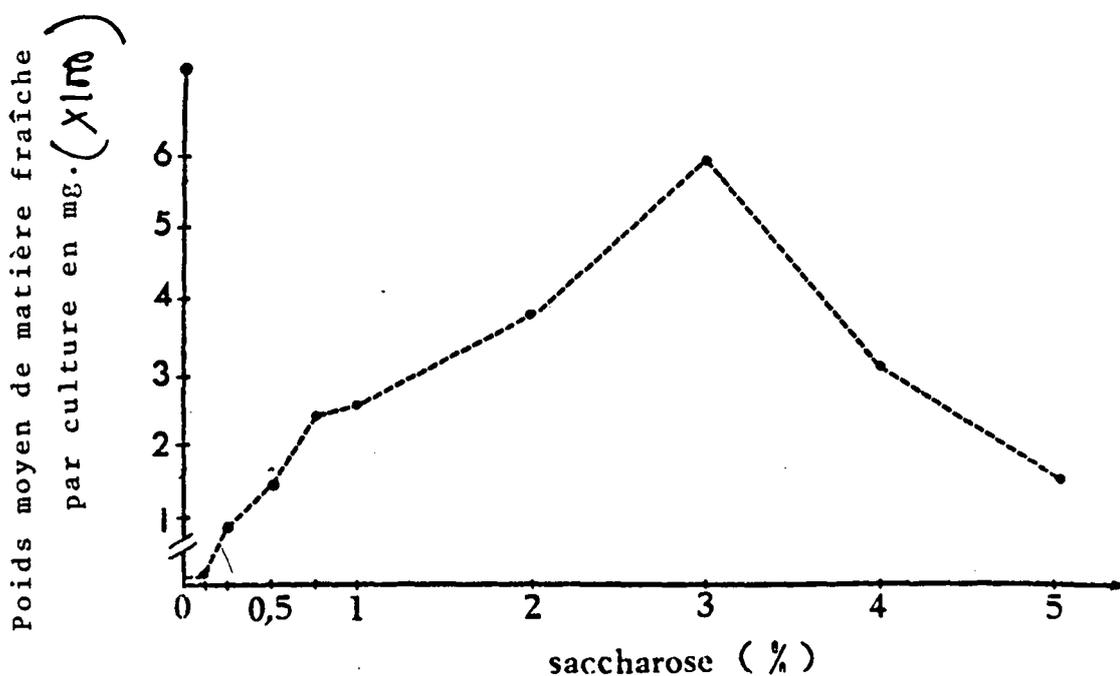


Figure 15 : Influence de différentes concentrations de saccharose sur la croissance des colonies tissulaires de *Cichorium Intybus*.
Les milieux renferment la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG additionnée de $5 \cdot 10^{-6}$ M d'ANA, de KIN 10^{-7} M, de 2,4-D 10^{-7} M, de vitamines et d'hydrolysate de caséine.
l'inoculum pèse environ 400 mg de matière fraîche.

Nous avons donc envisagé des transferts de cals issus de cultures primaires d'âge différent. Les cals sont débités en fragments d'environ 400 mg de matière fraîche, puis repiqués sur un milieu neuf. Seuls les cals ayant un certain volume sont donc susceptibles d'être repiqués. C'est pourquoi, nous avons choisi d'utiliser des tissus ayant séjourné au moins dix jours sur le milieu initial.

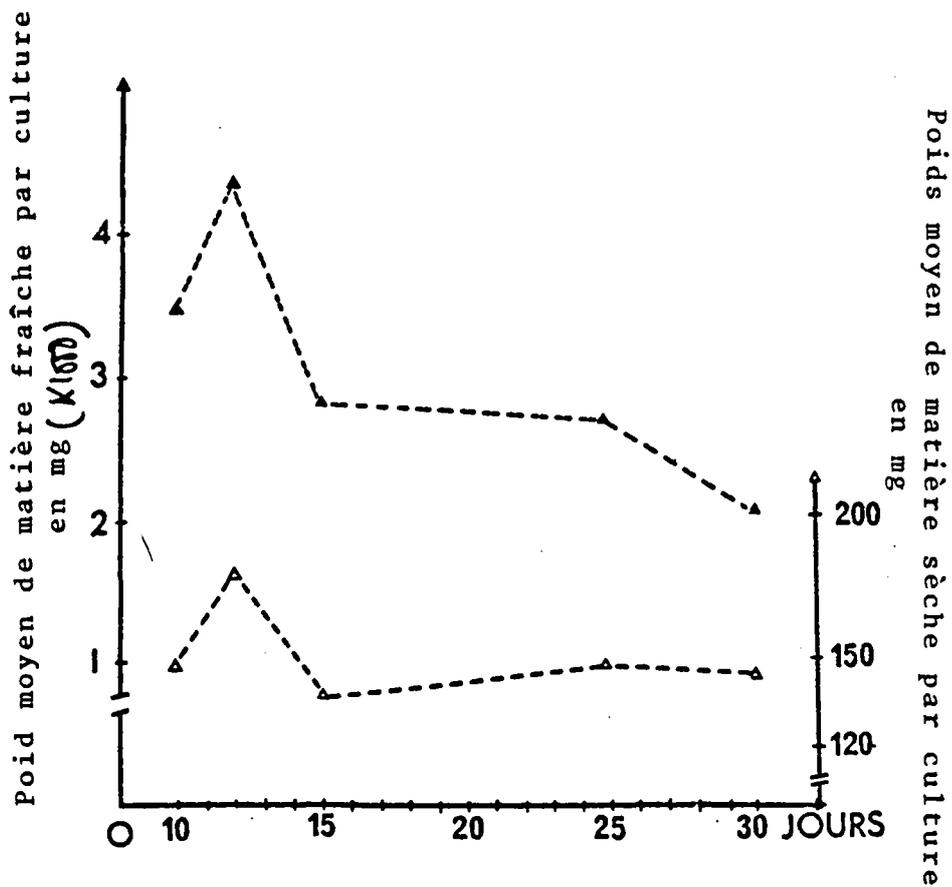
La figure 16 montre que les tissus même après un mois de culture sont aptes à proliférer lorsqu'ils sont repiqués. Cependant, on constate que la croissance des tissus repiqués est optimale lorsque le transfert est effectué après 12 jours de culture sur le milieu initial. A ce stade, le poids de matière fraîche de l'inoculum est multiplié par dix environ au bout de deux mois de culture. Les cals racinaires ayant séjourné plus de deux semaines sur le milieu initial manifestent au contraire, une prolifération très réduite après leur transfert sur un milieu neuf.

Ces résultats font ressortir, que la prolifération cellulaire ultérieure est conditionnée de manière importante par l'âge des cals initiaux. Le moment le plus propice au transfert se situe aux environs du 12^e jour de la culture des explantats primaires.

II - ETABLISSEMENT D'UNE COLONIE TISSULAIRE A PARTIR DE PLANTULES ASEPTIQUES

Théoriquement, tout organe végétal peut-être amené à produire un cal en culture *in vitro*. La période qui précède la phase de croissance active est cependant très variable selon le matériel utilisé. Actuellement, des souches tissulaires ont été obtenues pour de nombreuses espèces végétales à partir d'organes divers : graines, embryons, fragments d'entre-nœuds, feuilles, racines et récemment anthères et ovules.

Dans le cas de la chicorée Witloof, nous avons envisagé d'induire la callogenèse à partir de feuilles isolées, de rosettes de feuilles, de fragments d'hypocotyle ou de racines provenant de plantules cultivées *in vitro* (Schéma 5). Ces différentes parties de la plantule ont été ensemencées sur le "milieu de prolifération" comprenant la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG (1962)



AGE DES CALS INITIAUX AVANT TRANSFERT

Figure 16 : Influence de l'âge des cultures sur la croissance ultérieure des tissus repiqués. Celle-ci est évaluée après 2 mois de culture. Le milieu de repiquage comporte la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG additionnée d'ANA $5 \cdot 10^{-6}$ M, de 2,4-D 10^{-7} M, de KIN 10^{-7} M, de vitamines, d'hydrolysate de caséine et de saccharose 1 %.



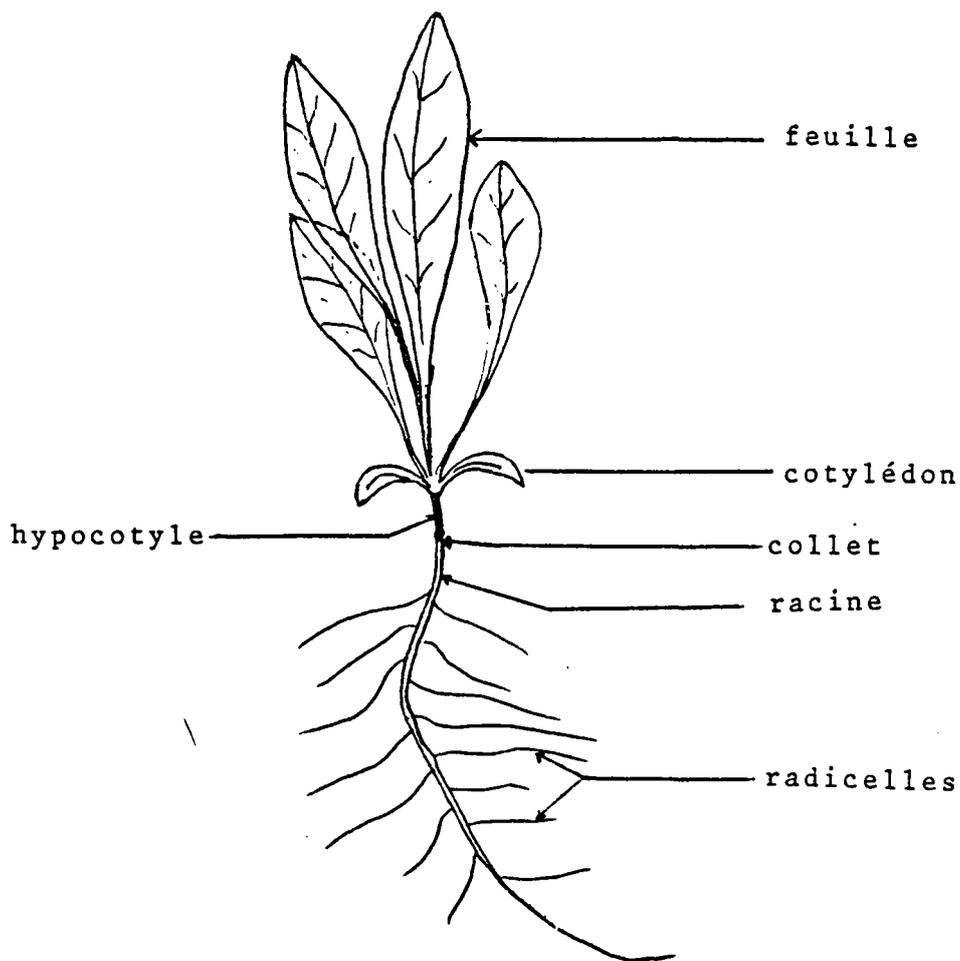


Schéma 5 : Plantule âgée de 15 jours



additionnée de 10^{-5} M d'ANA, de 10^{-7} M de 2,4-D, de 10^{-7} M de kinétine, de vitamines, d'hydrolysate de caséine et de saccharose 1 %. Parallèlement, nous avons ensemencé sur ce milieu des graines prises avant leur germination ou ayant germé jusqu'à l'éclatement des téguments et l'émergence des cotylédons.

1) La germination des graines.

Lors de ces essais, nous avons utilisé deux types de substrat. Le premier est composé de vermiculite alors que le second est solidifié par de la gélose à la concentration de 7 %. Le tableau 27 rend compte des résultats obtenus au bout de 15 jours de culture.

Le milieu qui renferme la vermiculite s'est avéré le plus favorable à la germination. Il permet à la lumière, la production de plantules qui portent 4 à 5 feuilles chlorophylliennes d'environ 8 cm de haut et une racine pivotante à très nombreuses radicelles (Planche IV, Photo 1A). A l'obscurité, on obtient des plantules qui présentent de petites feuilles étiolées et rarement des racines (Planche IV, Photo 1B).

Le milieu gélosé outre son effet inhibiteur présente l'inconvénient d'adhérer au système racinaire et rend le prélèvement ultérieur très délicat. Nous avons donc choisi d'utiliser la vermiculite comme substrat de germination.

2) La culture *in vitro*

a) culture de graines

α) Avant germination

La lumière induit la callogenèse des cotylédons, qui sont en général légèrement bruns. Quand ils sont chlorophylliens, ils portent alors deux minuscules bourgeons et de rares racines (Tableau 28). A l'obscurité, les cotylédons se gonflent, ils sont brûnâtres et donnent naissance à de petites feuilles étiolées ; leur croissance est médiocre et ils se nécrosent assez rapidement.

β) En début de germination

Après 3 jours, les téguments des graines éclatent et les cotylédons émergent ; ils sont alors repiqués sur le milieu de prolifération. A la lumière, ils développent des plantules qui portent de grandes feuilles chlorophylliennes (en moyenne 5 cm de longueur).

Tableau 27 : Influence du substrat (vermiculite ou gélose) et de l'éclaircissement sur la germination de graines de *Cichorium Intybus* var. Witloof, cv "Zoom" en conditions aseptiques. Les graines sont cultivées sur un milieu de germination renfermant la solution minérale de Heller additionnée de saccharose 1 % ; durée : 15 jours.



	SUBSTRAT		
	GELOSE	VERMICULITE	
	LUMIERE		OBSCURITE
(% Germination	40	95	59
(Hauteur moyenne (des plantules (cm):	5	8	2-4
(Observations	2 feuilles vertes et nombreuses racines	4 à 5 feuilles vertes Enracinement très dense	2 feuilles étiolées et peu de racines

Tableau 28 : Graines de *Cichorium Intybus*, var. Witloof, cv "Zoom" placées sur un milieu de prolifération renfermant la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG (1962) additionnée d'ANA 10^{-5} M, de 2,4-D 10^{-7} M, de Kin. 10^{-7} M, de vitamines, d'hydrolysats de caséine et de saccharose 1 % pendant 30 jours.



	LUMIERE	OBSCURITE
(% de graines ayant produit un cal de prolifération	70,80	62,50
(hauteur moyenne des plantules (cm)	1	1 - 1,5
(Observations	cal issu de l'hypertrophie des cotylédons. Quelques fois vert avec de minuscules bourgeons et de rares racines	cals bruns issus du gonflement des cotylédons

b) Culture des racines

Sur les plantules, nous avons prélevé la racine par une section au niveau du collet. Celle-ci est déposée soit horizontalement soit légèrement enfoncée par sa partie proximale proche du collet dans le milieu nutritif gélosé.

Dans un premier temps, l'extrémité distale de la racine et les nombreuses radicelles qu'elle porte se nécrosent progressivement. Seul demeure vivant le tiers proximal qui, assez rapidement, produit un cal à la partie normalement orientée vers le collet. Le fragment de racine se gonfle et présente alors des pustules blanchâtres constituant des massifs cellulaires qui fusionneront pour former un cal volumineux (Planche IV, Photo 3).

Un fragment de racine de quelques milligrammes peut ainsi donner naissance après 3 mois de culture sur le milieu de prolifération, à un cal de plus de 2 grammes de matière fraîche.

c) Culture de feuilles

α) Feuilles isolées

Lorsque les plantules sont au stade 2 feuilles vraies, les feuilles sont prélevées et déposées sur le milieu de prolifération soit horizontalement, soit verticalement par leur partie pétiole. Les portions immergées produisent une ou plusieurs racines pivotantes portant de nombreuses radicelles. Lorsque les feuilles sont déposées horizontalement sur le milieu, un cal se forme à la base du pétiole, et il ne tarde pas à recouvrir entièrement les tissus initiaux.

β) Rosettes de feuilles

Sur des plantules d'environ 3 à 4 cm de hauteur et portant au moins 4 feuilles, on prélève la rosette de feuilles qui est repiquée dans le milieu nutritif. Les feuilles s'accroissent considérablement (en longueur et en largeur) et forment à la base de leurs pétioles des cals (Planche IV, Photo 2).

d) Culture de fragment d'hypocotyle

Sur des plantules au stade 4 feuilles, nous avons opéré deux sections : l'une au niveau du collet et la seconde à la base de la rosette des feuilles. Les fragments d'hypocotyle ainsi obtenus qui mesurent environ 5 mm de long sont déposés sur le milieu de

prolifération. Ces tissus n'ont manifesté aucune croissance.

e) Conclusions

Des différents organes utilisés, seuls les fragments de racine et dans une moindre mesure les pétioles des feuilles ont donné des cals. Toutefois, la prolifération cellulaire est encore nettement inférieure à celle observée à partir des explantats racinaires que nous utilisons habituellement. C'est pourquoi, après avoir vérifié que les colonies issues de ces plantules pouvaient être repiquées sans problème apparent, nous avons continué ce travail avec des racines provenant de la culture au champ.

III - RECHERCHE D'UN MILIEU NUTRITIF POUR L'ENTRETIEN DES COLONIES TISSULAIRES

1) Les substances auxiniques

L'établissement d'une colonie tissulaire nécessite lors du premier repiquage, l'élimination des parties différenciées des cultures primaires pour ne conserver que celles capables de proliférer activement. Les transferts ultérieurs réalisés à intervalles réguliers ayant pour but d'entretenir la croissance de masses tissulaires.

Au cours de cette phase les milieux nutritifs doivent renfermer tous les éléments nécessaires à la prolifération des tissus. C'est pourquoi, nous avons vérifié à partir d'une colonie tissulaire ayant déjà subi cinq repiquages, si les conditions de culture définies antérieurement étaient optimales pour l'entretien indéfini de ces tissus. Pour cela, nous avons éprouvé l'action de trois concentrations d'ANA associées ou non à différentes doses de 2,4-D. Les milieux nutritifs renferment en outre la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG (1962) additionnée de vitamines, d'hydrolysate de caséine, de 10^{-7} M de kinétine et de saccharose à 1 %. Les tissus repiqués sur un milieu dépourvu d'auxines ne prolifèrent que faiblement mais produisent par contre de très nombreuses racines (Tableau 29) dont la plupart sont de couleur verte.

L'addition de 2,4-D diminue la rhizogenèse mais augmente le poids de matière fraîche et de matière sèche ; l'optimum de la prolifération se situant vers $5 \cdot 10^{-7}$ M.



Tableau 29 : Recherche des concentrations d'auxines les plus favorables à l'entretien des colonies tissulaires. Le milieu contient la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG (1962) additionnée de $Kin.10^{-7}$ M, de vitamines, d'hydrolysate de caséine et du saccharose 1 %.

M.F. : poids moyen de matière fraîche (mg) par culture

M.S. : poids moyen de matière sèche (mg) par culture

r : nombre moyen de racines par culture

() : pourcentage des cultures rhizogènes

(ANA (M) \ 2,4-D (M) :	0	5.10^{-8}	10^{-7}	5.10^{-7}	10^{-6}
(: M.F. :	856,66	878,21	1 432,78	2 686,90	1 270,81
(0 : M.S. :	34,75	39,50	49,34	68,48	39,88
(: r. :	(100) 12,58 (1-2 cm)	(100) 12,30 (1-2 cm)	(100) 6,55 (0,5-1 cm)	0	0
(: M.F. :	2 236,38	2 875,01	3 205,26	3 504,93	2 951,73
(5.10^{-6} : M.S. :	57,55	64,56	76,26	83,64	60,92
(: r. :	(100) 11,90 (<0,5 cm)	(100) 9,85 (< 0,5 cm)	0	0	0
(: M.F. :	1 630,82	1 621,30	2 842,66	2 947,85	1 936,95
(10^{-5} : M.S. :	38,77	43,90	54,60	57,76	49,49
(: r. :	0	0	0	0	0
(: M.F. :	1 074,71	1 116,57	1 129,48	1 494,49	1 437,30
(5.10^{-5} : M.S. :	28,43	29,69	32,85	36,75	35,10
(: r. :	0	0	0	0	0

La présence de doses élevées d'ANA provoque également la réduction des capacités rhizogènes. Au delà de 10^{-5} M, on observe toutefois une diminution de l'intensité de la prolifération cellulaire.

L'association de ces deux substances s'est cependant avérée favorable à la prolifération cellulaire. On observe en effet que l'emploi simultané d'ANA à 5.10^{-6} M et de 2,4-D à 10^{-7} ou 5.10^{-7} M quadruple la masse de matière fraîche et permet l'obtention d'un poids moyen de matière sèche de l'ordre de 80 mg par culture.

Les tissus de *Cichorium Intybus*, après plusieurs transferts, ont des besoins en auxine sensiblement réduits et possèdent encore des potentialités organogènes élevées.

Afin d'assurer l'entretien indéfini des colonies tissulaires, nous avons finalement choisi le milieu nutritif qui renferme des concentrations auxiniques aussi faibles que possible et qui permettent d'obtenir une importante prolifération cellulaire sans manifestation organogène. La composition auxinique que nous retiendrons pour ce "milieu d'entretien" est ANA 5.10^{-6} M et 2,4-D 10^{-7} M.

2) La nutrition carbonée

a) Influence de la nature des glucides

Les souches installées nécessitant par contre la présence d'une source carbonée, nous avons recherché si l'influence exercée pouvait dépendre de la nature du glucide utilisé. Parmi les glucides incorporés dans le milieu de culture à raison de 10g/l, c'est le saccharose qui s'est révélé la plus favorable à la croissance des tissus, suivi par le glucose (Figure 17). Le maltose, le xylose, le lactose et le raffinose ont provoqué une prolifération nettement plus faible.

b) Influence de la teneur en glucide

Les essais relatifs à la nutrition carbonée des cultures primaires avaient permis de montrer la grande sensibilité des explantats aux glucides exogènes. Ainsi, les cals formés en présence de saccharose à 10g/l, présentent sur toute leur surface une teinte brune, signe d'un début de toxicité. Les colonies tissulaires ont par contre besoin de sucres pour proliférer et aucun brunisse-

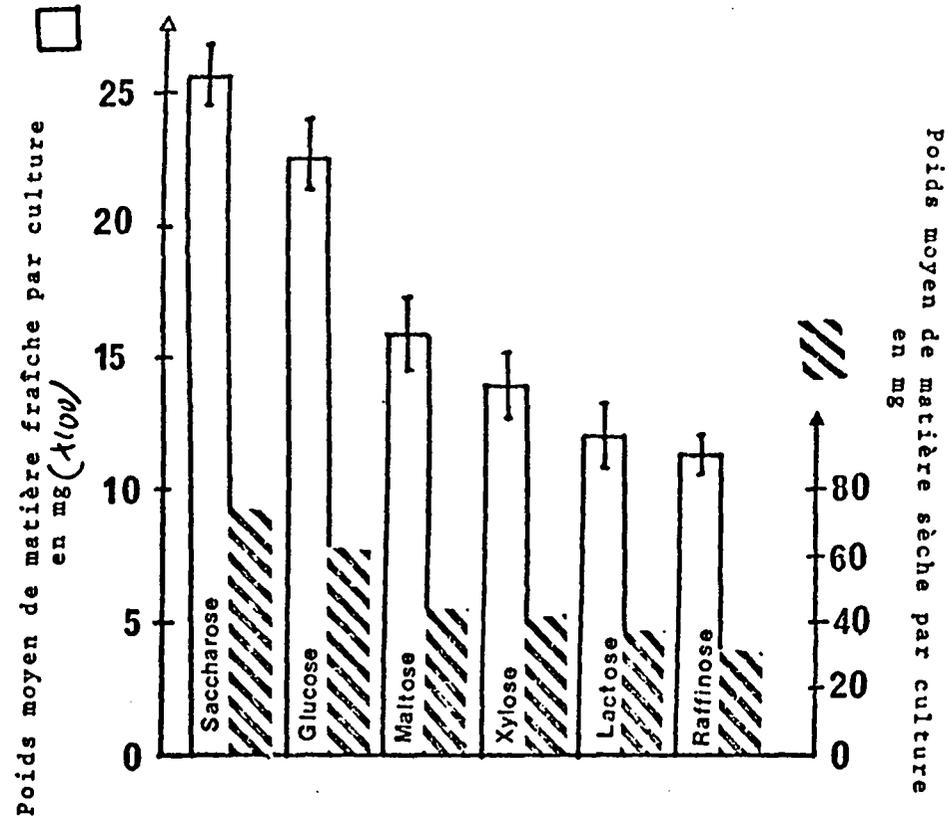


Figure 17 : Influence de différents glucides sur la croissance des colonies tissulaires de *Cichorium Intybus* cultivés sur un milieu renfermant la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG additionnée d'ANA $5 \cdot 10^{-6}M$, de $10^{-7}M$ de 2,4-D, de $10^{-7}M$ de kiné- tine, de vitamines et d'hydrolysate de caséine. Tous les glucides sont utilisés à la concentra- tion de 10g/l. L'inoculum pèse environ 400 mg de matière fraîche.

ment n'est observé en présence de 10g/l de saccharose ou de glucose. Cela nous a donc conduit à essayer de préciser la quantité de glucides nécessaire pour obtenir une croissance optimale des colonies tissulaires.

Pour des doses inférieures à 0,25 % de saccharose, la croissance des cultures s'arrête après deux semaines et les tissus meurent (Figure 18).

Des concentrations plus élevées stimulent puissamment la prolifération et les tissus présentent alors une croissance optimale pour une dose de saccharose de 3 %. Au delà, la croissance accuse un net fléchissement qui se manifeste parallèlement par un brunissement des tissus.

3) La nutrition azotée

Les essais antérieurs sur la nutrition minérale des fragments racinaires ont montré que les tissus pouvaient proliférer abondamment en l'absence de toute source d'azote minéral dans le milieu nutritif.

On pouvait penser que les cultures trouvaient dans leurs réserves propres, les éléments nutritifs nécessaires. Nous avons alors étudié le comportement des souches installées à l'égard de trois solutions de macroéléments dérivées de la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG (1962). Elles diffèrent par la nature de leur source azotée (Tableau 30). La première renferme uniquement de l'azote nitrique, l'azote de la seconde est apportée sous forme ammoniacale et la troisième solution ne contient aucun élément azoté minéral.

Il faut cependant rappeler que ces milieux de culture renferment de l'hydrolysate de caséine qui s'est avéré nécessaire à la croissance des tissus.

La figure 19 montre que la croissance maximale est obtenue sur le milieu totalement dépourvu d'azote minéral (milieu 3). L'ion NO_3^- (milieu 1) permet une prolifération légèrement supérieure à celle observée en présence de la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG (1962) qui sert de témoin et qui comprend à la fois des ions NO_3^- et NH_4^+ . Les tissus prolifèrent cependant avec une intensité

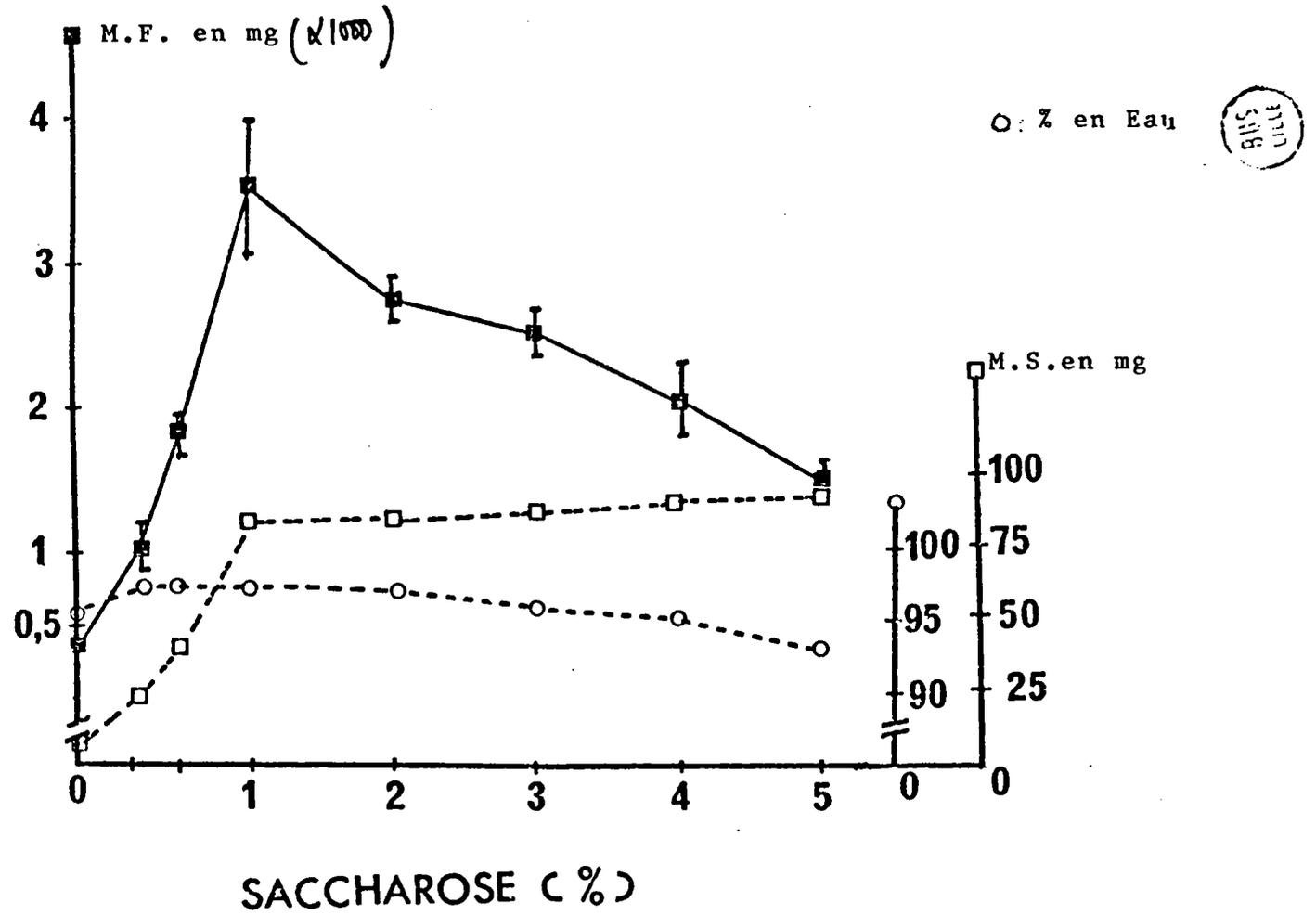


Figure 18 : Influence de la concentration en saccharose sur la croissance des cals primaires repiqués sur un "milieu colonie tissulaire" pendant un mois.
L'inoculum pèse environ 400 mg de poids de matière fraîche soit environ 16 mg de matière sèche.

Solution minérale (meq/l.)				
	T	1	2	3
Sels minéraux : $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$		NO_3^-	NH_4^+	0
NH_4NO_3	1 650	0	0	0
NH_4Cl	0	0	1 000	0
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0	0	140	0
KNO_3	1 900	1 900	0	0
KCl	0	0	1 500	1 400
NaNO_3	0	1 750	0	0

Tableau 30 : Composition en azote minéral des quatre solutions nutritives utilisées dans l'expérience de la figure 19.

Le milieu témoin (T) comporte les éléments minéraux complets de la solution de MURASHIGE & SKOOG. On supprime alors simultanément (3) ou séparément (1,2) les formes d'azote ammoniacale (1) ou nitrique (2).



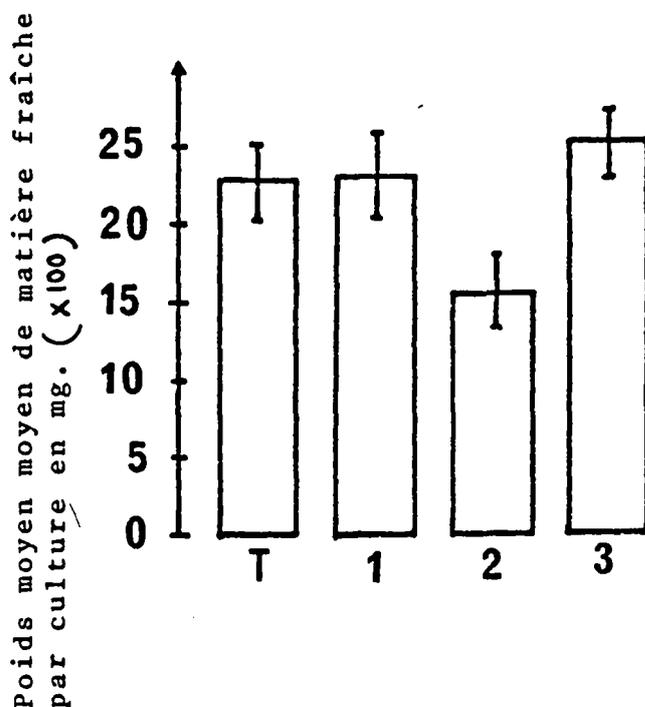


Figure 19 : Influence de la nature de la source azote minéral sur la croissance de colonies tissulaires de *Cichorium Intybus* cultivées sur un milieu nutritif renfermant la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG modifiée ou non dans sa composition en azote minéral (Tableau 30) et additionné d'ANA $5 \cdot 10^{-6}$ M, de 2,4-D 10^{-7} M, de KIN 10^{-7} M, de vitamines, d'hydrolysate de caséine et de saccharose à 1 %.



moindre lorsqu' on les cultive sur un milieu ne renfermant l'azote minéral que sous la forme ammoniacale (milieu 2). Ces résultats indiquent que les tissus de *Cichorium Intybus* peuvent croître sur un milieu nutritif ne comportant que de l'azote organique, fourni ici sous forme d'hydrolysate de caséine.

Nous avons alors vérifié si l'on pouvait remplacer l'hydrolysate de caséine par la L- glutamine (Figure 20). Celle-ci est inhibitrice. L'inhibition de la croissance déjà perceptible à 5 mM (= 0,730 g/l) est totale à la concentration de 20 mM.

4) Conclusions

A la lumière de ces résultats, il apparaît que le milieu de culture qui provoque la croissance optimale des tissus devrait renfermer la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG (1962) privée de NO_3^- et NH_4^+ et additionnée de $5 \cdot 10^{-6}$ M d'ANA, de 10^{-7} M de 2,4-D, de 10^{-7} M de kinétine, de vitamines, d'hydrolysate de caséine et de saccharose 1%. Ce "milieu d'entretien" des colonies tissulaires permet la prolifération cellulaire sans manifestation organogène et renferme des quantités aussi faibles que possible de régulateurs de croissance.

IV - CAPACITES ORGANOGENES DES COLONIES TISSULAIRES

Dans la plupart des cas et pour de nombreuses espèces végétales, on observe un déclin du pouvoir organogène des colonies tissulaires au cours des repiquages successifs (HALPERIN, 1964 ; JULIEN, 1974 ; MARETZKI et THOM, 1978). Nous nous sommes alors demandé, s'il était encore possible de provoquer la formation d'organes à partir de colonies tissulaires de *Cichorium Intybus* ayant subi 8 passages et qui sont âgées d'environ un an.

Dans un premier temps, nous avons vérifié la structure histologique de ces colonies et nous avons noté la présence d'éléments différenciés, présents sous la forme de nombreuses trachéides d'une part et de nodules méristématiques d'autre part. Il semble cependant que dans nos conditions expérimentales, l'évolution de ces méristèmes soit bloquée et que leur organisation et leur développement se soient arrêtés très tôt (Planche III, Photo 1, 2 et 3).

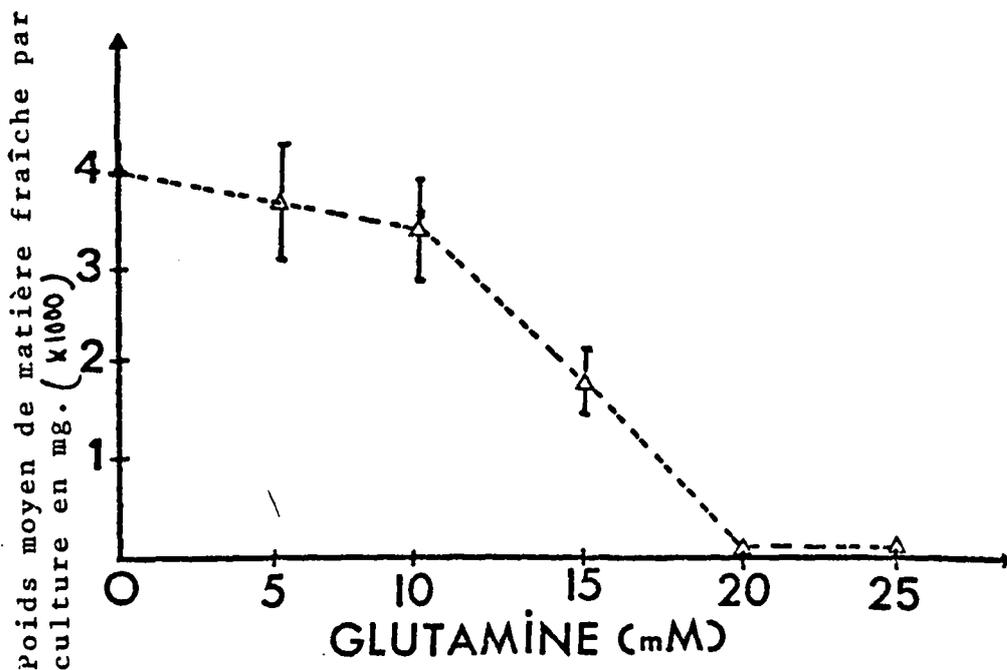


Figure 20 : Influence de la L-glutamine sur la croissance des colonies tissulaires de *Cichorium Intybus*. Le milieu renferme la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG additionnée de $5 \cdot 10^{-6}$ M d'ANA, de 10^{-7} M de Kinétine, de 10^{-7} M de 2,4-D, de vitamines et de saccharose 1 %. L'hydrolysate de caséine est soustrait du milieu de culture.

Nous avons ensuite procédé à des transferts de ces colonies sur des milieux de culture susceptibles d'initier la formation d'organes.

1) Transfert sur un "milieu entretien" dépourvu de substances hormonales

Les tissus placés sur un milieu de culture renfermant la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG (1962) additionnée de vitamines, d'hydrolysate de caséine sans substances hormonales manifestent une légère croissance pendant la première semaine de culture. Des phénomènes de nécrose apparaissent ensuite et envahissent progressivement la totalité des cultures. La présence de saccharose (1 %) entraîne la formation de nombreuses racines (5 en moyenne par culture après un mois) dont certaines sont chlorophylliennes.

2) Transfert sur un "milieu inducteur de racines" (ANA 10^{-6} M, Kin 10^{-7} M, saccharose 1%)

Les cals repiqués sur ce milieu prolifèrent intensément et développent une abondante rhizogénèse. Par culture, on observe 21 racines en moyenne d'environ 1 cm de longueur (Planche III, Photo 4 et Planche V, Photo 1A).

Nous n'avons observé aucune formation de bourgeons même après deux mois de culture.

3) Transfert sur des "milieux inducteurs de bourgeons" (BAP associée ou non à l'AIA),

Aux doses de $5 \cdot 10^{-6}$ M, l'auxine ne permet qu'une faible croissance des tissus. Seules de rares racines sont visibles (Tableau 31).

L'apport de concentrations croissantes de BAP provoque une intense prolifération et la formation simultanée de bourgeons et de racines. Les résultats les plus importants sont obtenus avec la dose de 10^{-6} M de BAP qui induit sur les cals, la production d'une multitude de bourgeons de grande taille (3 cm), bien individualisés et pourvus de racines à leur base (Planche V, photo 2B). Des teneurs plus élevées en cytokinine réduisent la taille des bourgeons, qui prennent un aspect vitreux et inhibent la rhizogénèse.



Tableau 31 : Capacité organogène des colonies tissulaires de *Cichorium Intybus*.

Les tissus sont d'abord cultivés sur un "milieu d'entretien" renfermant la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG (1962) additionnée de $5 \cdot 10^{-6} M$ d'ANA, de $10^{-7} M$ de 2,4-D, de $10^{-7} M$ de kinétine, de vitamines, d'hydrolysats de caséine et de saccharose à 1 %.

Ils sont ensuite transférés sur un second milieu contenant la solution de MURASHIGE & SKOOG (1962) additionnée de vitamines, d'hydrolysats de caséine et de saccharose à 1 % pendant 2 mois. On ajoute alors des doses variables d'acide indolylacétique (AIA) et de 6-Benzylaminopurine (BAP).

		BAP (M)			
		10^{-7}	10^{-6}	$5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}
AIA (M)					
0	Croissance	+	++++	++++	++++
	Bourgeonnement	0	nombreux bourgeons bien individualisés (3 cm)	nombreux bourgeons de petite taille (< 1 cm) et vitreux	nombreux bourgeons de petite taille (< 1 cm) et vitreux
	Rhizogénèse	quelques racines (< 0,5 cm)	quelques racines (1cm)	quelques racines (1 cm)	0
$5 \cdot 10^{-6}$	Croissance	+	+++	++++	++++
	Bourgeonnement	0	nombreux bourgeons légèrement vitreux (2 cm)	nombreux bourgeons bien individualisés (2 cm)	nombreux bourgeons de petite taille et vitreux (1 cm)
	Rhizogénèse	quelques racines (2 cm)	0	0	0
10^{-5}	Croissance	+	+++	++++	++++
	Bourgeonnement	0	nombreux bourgeons mais légèrement vitreux (2 cm)	nombreux bourgeons légèrement vitreux (2 cm)	nombreux bourgeons de petite taille (< 1 cm) et vitreux
	Rhizogénèse	quelques racines (2 cm)	0	0	0

vitreux et inhibent la rhizogenèse.

De ces essais, il ressort que les colonies tissulaires de *Cichorium Intybus* âgées d'environ un an, possèdent encore l'aptitude à former des organes (bourgeons et/ou racines). Cela nous a amené pour terminer le cycle de propagation végétative de la plante, à essayer d'enraciner les bourgeons néoformés et d'obtenir ainsi des plantes entières.

4) Obtention de boutures enracinées

Les bourgeons néoformés sur le milieu renfermant la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG (1962) additionnée de 10^{-6} de BAP, de vitamines, d'hydrolysate de caséine et de saccharose 1%, sont isolés puis placés sur un milieu favorable à l'expression rhizogène des tissus, c'est à dire pourvu d'ANA à 10^{-6} M, de kinétine à 10^{-7} M et de saccharose à 1 %. Dans ces conditions, l'enracinement survient au bout de 3 semaines. Les boutures ainsi obtenues développent alors un système racinaire important et présentent une morphologie tout à fait analogue à celles des plantes normales (Planche VI).

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

Si les tissus de chicorée Witloof constituent un matériel de choix qui a été souvent utilisé pour analyser les phénomènes de bourgeonnement végétatif ou inflorescentiel, il n'en est pas de même pour les processus de prolifération ou de rhizogenèse qui n'ont suscité que fort peu d'intérêt. Ce travail a donc été une exploration des possibilités offertes par ce matériel dans le domaine de la division cellulaire et de la différenciation organogène.

I - RHIZOGENESE

La rhizogenèse de petits explantats racinaires de chicorée Witloof dépend de la présence d'une auxine (ANA), d'une cytokinine, de glucides (glucose) dans le milieu de culture ainsi que de la taille des explantats. De plus elle nécessite que les cultures soient placées à la lumière.

C'est GAUTHERET qui le premier (1941) signale la production spontanée d'organes à partir de fragments racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés in vitro sur des milieux nutritifs additionnés de glucose. Des teneurs élevées en auxines et cytokinines endogènes (WARMKE et WARMKE, 1950 ; VARDJAN et NITSCH, 1961) sont vraisemblablement à l'origine de ce comportement.

Dans des travaux ultérieurs, GAUTHERET trouve que l'on peut modifier les capacités organogènes de ces tissus par des apports d'auxines exogènes (1947, 1959). L'effet observé varie alors selon la nature et la concentration du composé auxinique utilisé tout autant qu'en fonction de l'orientation de l'explantat sur le milieu de culture. Ces résultats ont été confirmés sur le même matériel par GWOZDZ et SWEYKOWSKA (1967), qui observent que des doses d'AIA comprises entre 1 et 10 mg/l stimulent à la fois la callogenèse et la rhizogenèse tout en réduisant la production de bourgeons ; ceci jusqu'à une concentration de 100 mg/l qui empêche toute formation d'organes. Nous remarquons cependant, que les explantats utilisés dans les travaux précédents sont de grande taille (supérieure à 1 cm), ce qui n'est pas sans effet sur l'organogenèse des tissus.

Des résultats similaires ont été néanmoins obtenus à partir de petits fragments de feuille (TOPONI, 1963 ; VASSEUR, 1978) et de racine (ROGER, 1981). Ils montrent que la rhizogenèse est favorisée par les fortes doses d'AIA particulièrement à la dose de 10^{-4} M. Cette condition a également été retenue optimale pour la rhizogenèse d'explantats constitués par des épidermes de feuilles étiolées de *Cichorium Intybus* (LIEBERT, et TRAN THANH VAN, 1972).

Pour notre part, nous avons choisi d'utiliser l'acide naphtylacétique (10^{-6} M) qui s'est révélé très efficace et nous l'avons associé à la kinétine à une concentration de 10^{-7} M qui permet un maximum de néoformation racinaire. Au delà de cette dose, il y a d'ailleurs inhibition de la rhizogenèse.

Nous avons pu constater également, que le nombre d'organes néoformés est d'autant plus élevé que les dimensions des explantats sont plus importantes. Le volume réduit des explantats de 2 mm d'épaisseur utilisés lors des essais préliminaires et par conséquent leurs faibles réserves en substances hormonales endogènes pourraient expliquer la variation des manifestations organogènes observées.

A ce facteur, on peut d'ailleurs rattacher la notion de précurseurs nécessaires en quantité suffisante et celle de glucides endogènes car les réserves glucidiques des tissus de *Cichorium Intybus* sont constituées par de l'inuline associée à des produits de sa dégradation.

L'action de ces précurseurs en tant qu'éléments limitant les phénomènes de rhizogenèse a déjà été signalée par MARGARA et RANCILLAC (1966), sur les tissus de chicorée, et par SPANJERSBERG et GAUTHERET (1963) sur la rhizogenèse des tissus de topinambour. Ces auteurs ont d'ailleurs établi que la lumière provoque l'élaboration d'un facteur rhizogène qui serait transmissible par greffage. Si ces précurseurs participent à la voie de synthèse des composés auxiniques, on comprendrait alors le rôle de facteurs tels que la lumière et l'acide gibbérellique dans nos propres expériences.

La lumière interviendrait dans la synthèse des composés phénoliques capables de ralentir la dégradation des subs-

tances auxiniques et donc de stimuler la rhizogenèse (PAUPARDIN, 1972). On sait cependant que l'éclairement peut susciter une grande diversité de réactions chez les végétaux cultivés. *in vitro*. Ainsi GALSTON (1948) puis HUNAUULT (1979) observent que la lumière réduit l'enracinement de fragments internodaux d'asperge. En cultivant des fragments de tige de pois, LEROUX (1968) constate que la lumière même fournie de manière intermittente, est inhibitrice de la rhizogenèse. Les explantats de tige de vigne (LEROUX, 1965) et des couches cellulaires minces de tabac (TRAN THANH VAN et al., 1974) réagissent de manière similaire. A l'opposé, GAUTHERET (1961, 1965) rapporte au cours de travaux sur les tissus de topinambour var. "violet de Rennes" une stimulation importante de la rhizogenèse par la lumière. Cette action est perceptible, pour des intensités lumineuses très faibles ou pour des durées d'exposition inférieures à une heure. De plus, il remarque que l'auxine à la lumière accentue le phénomène alors qu'à l'obscurité, l'intensité de la rhizogenèse diminue. L'éclairement peut avoir des effets rhizogènes très variables tantôt stimulateur (var. "Violet de Rennes" chez le topinambour, var. "express à longue cossé" chez le pois) tantôt inhibiteur (var. "violet commun" chez le topinambour, var. "Express Alaska" chez le pois) sur les tissus de topinambour (GAUTHERET, 1961) et de pois (LEROUX, 1973).

Il faut par ailleurs admettre qu'au sein des petits explantats de *Cichorium Intybus*, la quantité des glucides disponibles et immédiatement assimilables, n'est pas suffisante pour permettre la formation de racines. Le glucose exogène indispensable serait alors utilisé soit pendant toute la culture soit uniquement à un moment particulier, par exemple au début de la culture avant que l'activité des enzymes nécessaires à l'hydrolyse de l'inuline ne soit suffisante, ou durant la période de formation et/ou de croissance de méristèmes racinaires. En effet, cultivés sur des milieux nutritifs contenant 10^{-6} M d'ANA et 10^{-7} M de kinétine mais dépourvus de glucose, les explantats (2 mm de longueur) produisent des cals volumineux, verts et sans organes apparents. On observe cependant qu'ils sont incapables au bout d'un mois de produire de nouveaux organes lorsqu'ils sont transférés sur un second milieu pourvu ou non de glucose. A l'inverse, les transferts réalisés avec les fragments de 6 mm de longueur corroborent nos conclusions précédentes sur l'importance de la taille vis à vis de l'organogenèse.

En effet si l'on repique de tels explantats cultivés préalablement en présence de 10^{-6} M d'ANA et de 10^{-7} M de kinétine, sur des milieux contenant du glucose (10 g/l), on note une abondante production de racines.

Le facteur "taille" interviendrait vraisemblablement par l'intermédiaire des réserves glucidiques endogènes (accumulées sous forme d'inuline) qui seraient utilisées au cours de la culture *in vitro*. Le glucose exogène agirait alors davantage sur la croissance des ébauches néoformées.

La nécessité de glucides dans le milieu de culture pour la formation des racines est connue depuis les travaux de BOUILLENNE et WENT (1933) sur les plantules de balsamine et ceux de WENT et THIMANN (1937) sur les épicotyles de pois. Cette observation est confirmée sur divers tissus cultivés *in vitro* parmi lesquels on peut citer ceux de saule (SAUSSAY, 1971), de tabac (TRAN THANH VAN et al., 1974) et de topinambour (SPANJERSBERG et GAUTHERET, 1963). Chez cette dernière espèce, un traitement préalable des tissus par un glucide peut même remplacer l'exposition de la lumière. En définitive, les recherches relatives à l'influence des glucides sur les phénomènes d'organogenèse semblent établir que ces composés, qu'ils soient endogènes ou exogènes, peuvent intervenir soit comme source carbonée et énergétique soit comme agent osmotique. (BROWN et al., 1979).

Dans nos expériences, c'est cependant l'AG₃ (10^{-5} M) ajouté aux facteurs précédents, qui nous a permis d'obtenir un grand nombre de racines, à l'exclusion de toute formation de bourgeons. Cette hormone pourrait agir sur la régulation de l'auxine endogène et des composés phénoliques (TRONCHET, 1959). De ce point de vue, l'un des effets de l'AG₃ à la lumière serait d'intervenir sur l'activité de certaines enzymes ; protéases et hydrolases notamment (PALEG, 1960). L'exaltation de la rhizogenèse pourrait alors dépendre d'une stimulation de la voie des pentoses. Néanmoins, l'action de l'acide gibbéréllique est fort controversée même si l'on admet qu'il présente généralement un effet inhibiteur sur les processus d'organogenèse

Le moment d'application semble être un facteur essentiel de son efficacité (SIRCAR et CHATERJEE, 1974). Ainsi sur les tissus de tabac, MURASHIGE (1964) note une réduction de l'organogénèse lorsque l'AG₃ est présent dans le milieu tout au long de la culture alors qu'il n'a pas d'effet s'il est apporté après la formation des primordiums. Des résultats similaires ont été obtenus par SMITH et THORPE (1975) à la suite d'essais sur des fragments d'hypocotyle de *Prunus radiata*. Ils observent que la formation des primordiums racinaires sous l'action de l'auxine se déroule en trois phases :

- . pré-initiation
- . initiation
- . et post-initiation.

L'AG₃ serait inhibiteur lors des phases de pré et post-initiation et stimulateur durant la phase d'initiation.

Un autre exemple est rapporté par COLEMAN et GREYSON (1977a) sur les fragments foliaires de tomate. L'AG₃ pourrait exercer une inhibition précoce durant les 48 premières heures ou une inhibition plus tardive qui serait associée à la régression des primordiums formés à partir des cellules du parenchyme cortical. Ces auteurs émettent alors l'hypothèse d'une stimulation de la biosynthèse de l'auxine par l'AG₃.

Cependant, on sait que les fragments foliaires de tomate accumulent de l'amidon qui est utilisé lors de la formation des racines (BONNET et TORREY, 1965). On peut alors penser que l'action inhibitrice de l'AG₃ sur la rhizogénèse de ces tissus pourrait être liée à une hydrolyse de ces réserves au cours des premiers stades de l'organogénèse. Dans le cas du topinambour, SPANJERSBERG et GAUTHERET (1964) et GAUTHERET (1966) signalent que l'AG₃ est inactif lorsqu'il est employé seul, mais présente en association avec les auxines un effet variable. Ils observent en effet qu'à l'obscurité, l'AG₃ renforce les propriétés rhizogènes de l'ANA alors qu'à la lumière, pour des doses moyennes d'auxines, c'est le phénomène inverse qui est observé .

De manière similaire, LEROUX (1968) constate que l'AG₃ seul n'a aucune action sur la néoformation racinaire de fragments de pois. A des doses faibles et en présence d'ANA, son action est influencée par la lumière alors qu'aux concentrations élevées son action masque celle de la lumière et dépend alors du stade de développement du matériel utilisé.

Pour sa part RUCKER (1982) montre que sur des explantats foliaires de *Digitalis purpurea*, des doses élevées d'AG₃ sont capables de stimuler ou de réduire la production de racines en fonction des teneurs en AIA du milieu. Les effets variables de l'acide gibbérellique en association avec les auxines et selon les conditions d'éclairement pourraient être attribués à une certaine sensibilité à la lumière de ce composé qui selon le cas permettrait soit de bloquer à un stade donné la voie de biosynthèse des auxines soit d'empêcher l'utilisation de celles-ci.

Par ailleurs, au cours d'expériences échelonnées du mois d'octobre au mois d'avril, nous avons noté une variabilité portant en particulier sur le pourcentage d'explantats capables de produire des racines et sur ceux susceptibles de fournir un petit nombre de bourgeons. Les résultats les plus favorables à la rhizogenèse étant obtenus au début de la période de conservation des racines c'est-à-dire au cours des mois d'octobre et de novembre. Une telle hétérogénéité peut s'expliquer par une évolution en composés au cours de la conservation. On sait en particulier (RUTHEFORD et JACKSON, 1965) que le stockage des racines de chicorée à 3 ± 1°C, provoque en 4 à 8 semaines une dégradation importante de l'inuline et des oligosaccharides de poids moléculaire élevé.

Les gibbérellines endogènes évoluent également au cours de la conservation des racines. Ainsi JOSEPH et al. (1983) ont montré que si l'AG₉ n'est pas décelable lorsque les racines sont fraîchement arrachées, il en apparaît ensuite en quantité importante au cours du stockage au froid. Parallèlement les teneurs en AG₃ et AG₄ augmentent considérablement (facteur multiplicateur 100) après 9 semaines de traitement à 3° C. La vernalisation de la racine se caractérise aussi par une augmentation en cytokinines (JOSEPH et PAULET, 1973) et en composés phénoliques (PAULET, 1967 ; PAULET et

MIALOUNDAMA, 1976). Ces résultats rapprochés de nos observations semblent indiquer que le traitement au froid provoque dans la racine de *Cichorium Intybus* l'accumulation de substances favorisant le bourgeonnement et la floraison, mais inhibitrices de la rhizogénèse. De plus ils permettent de penser que lorsque la quantité de sucres solubles augmente au sein des explantats racinaires, la capacité rhizogène diminue. L'hétérogénéité observée pourrait alors s'expliquer par la difficulté de trouver un équilibre entre les glucides intratissulaires directement assimilables et le glucose exogène pour permettre une expression satisfaisante des capacités rhizogènes.

Nos observations rejoignent celles de SPANJERSBERG et GAUTHERET (1963) sur les variations saisonnières du pouvoir rhizogène des tissus du topinambour. Ces auteurs trouvent par contre que l'apport de glucose exogène est moins efficace sur des tissus prélevés sur des rhizomes fraîchement récoltés ou n'ayant séjourné que quelques jours en chambre froide ; ils pensent que le froid provoque une augmentation de l'efficacité rhizogène du glucose ou que le pouvoir rhizogène des tissus augmente au cours du vieillissement des tissus.

II - CALLOGENESE

Sur les tissus de *Cichorium Intybus*, GAUTHERET constate cependant qu'une concentration de 0,0001 % (= $5,4 \cdot 10^{-6} M$) d'ANA bloque complètement le développement des bourgeons et donne naissance à des cals énormes qui portent encore quelques racines. Des travaux ultérieurs (1947, 1959) lui permettent de montrer que l'inhibition de l'organogenèse dépend de la nature et de la concentration de l'auxine utilisée, ainsi que de l'orientation des fragments sur le milieu de culture. Des observations du même ordre sont rapportées par GWOZDZ et SZWEYKOWSKA (1967) et NAKANISHI (1979) qui notent qu'une intense prolifération cellulaire n'a lieu qu'à la suite de l'inhibition totale de l'organogenèse par des concentrations auxiniques élevées.

Les explantats employés dans les travaux précédents présentent cependant, en raison de leur taille (d'environ 6 mm de \emptyset et 1 cm de longueur), l'inconvénient de contenir d'importantes réserves nutritives.

Dans nos propres essais avec de petits explantats racinaires (6 mm de diamètre et 2 mm d'épaisseur), nous avons noté qu'en présence d'ANA à $5 \cdot 10^{-5} M$, on obtient une callogénèse importante sans aucune manifestation organogène apparente. Au sein des cals néoformés, on observe cependant la présence de zones méristématiques en attente et qui n'évoluent pas, même après 30 jours de culture. Le nombre de ces massifs méristématiques peut-être fortement réduit par l'adjonction de kinétine à la concentration de $10^{-7} M$ alors que, la prolifération cellulaire est exaltée par la présence d'hydrolysats de caséine et des vitamines. L'hydrolysat de caséine est composé d'un mélange d'acides aminés dont les propriétés callogènes ont déjà été mises en évidence, en particulier sur les embryons de *Cichorium endivia* (VASIL et HILDEBRANT, 1966). Nos résultats confirment que les tissus de chicorée sont capables d'utiliser l'azote organique. De plus, les vitamines augmentent notablement les effets de ce composé. On savait d'ailleurs déjà que beaucoup de tissus végétaux cultivés *in vitro* nécessitaient la présence de vitamines (GAUTHERET, 1959). La thiamine (B_1) est indispensable, alors que les besoins en d'autres

vitamines varient selon les espèces (GAUTHERET, 1959). Le composé qui lui est le plus souvent associé est le mésoinositol dont l'effet sur la prolifération cellulaire a été signalé par exemple avec les tissus de moelle de tabac (LINSMAIER et SKOOG, 1965), d'asperge (HUNAULT, 1979) et les suspensions cellulaires de riz (OHIRA et coll., 1973). Nous avons donc choisi pour induire la prolifération cellulaire, un milieu de culture renfermant de l'ANA ($5 \cdot 10^{-5} M$), de la kinétine ($10^{-7} M$), de l'hydrolysate de caséine (1g/l) et les vitamines préconisées par MURASHIGE & SKOOG (1962) (thiamine (B_1), pyridoxine (B_6) et acide nicotinique) plus de la biotine, de l'inositol et de l'acide folique (cf Matériel & méthodes).

Dans ces conditions, si un apport de glucides provoque l'augmentation du poids de matière sèche, il exerce aussi une certaine toxicité qui se traduit par un brunissement des explantats, qui est d'autant plus prononcé que les doses sont plus élevées. Or, on sait que ces tissus possèdent d'importantes réserves glucidiques (12 % du poids de matière sèche) sous forme de fructosanes de degrés de polymérisation variés (84 % des glucides totaux), de saccharose (1 %), de fructose (4,5 %) et de glucose (0,5 %) (BACKOULA, 1983). Il semble donc que les glucides endogènes (inuline et produits d'hydrolyse) suffisent au métabolisme des petits explantats et qu'une addition supplémentaire, bien que participant à l'augmentation pondérale est en fait préjudiciable aux cultures. Les phénomènes de toxicité seraient encore accentués par la présence de régulateurs de croissance (auxines) à des doses élevées qui, en agissant sur la perméabilité cellulaire accentueraient la pénétration intratissulaire des glucides exogènes. Une telle observation a d'ailleurs déjà été réalisée en présence de 2,4-D pour les cals d'oxalis (SUNDERLAND et WELLS, 1968) et en présence d'AIA dans le cas des tissus de *Cichorium Intybus* (SOBCZYK et SZWEYKOWSKA, 1973) et de *Datura innoxia* (BROSSARD-CHRIQUI et ISKANDER, 1980).

Les composés auxiniques employés à doses élevées doivent par ailleurs provoquer une intense activité catabolique des tissus. Ainsi GORDON et FLOOD (1979) ont pu montrer que le traitement des tissus de racine de chicorée par du 2,4-D à $10^{-5} M$, provoque une

importante entrée d'eau et une intense hydrolyse de l'inuline en fructosanes de faible poids moléculaire et en sucres réducteurs libres. Pénétration accrue et hydrolyse accélérée des réserves pourraient expliquer les phénomènes de toxicité observés. SOBCZYK et SZWEYKOWSKA (1973) constatent par contre que sur des explantats racinaires (6 mm de \varnothing et 1 cm d'épaisseur) de *Cichorium Intybus* var. sativum, cv Polanowicka, le saccharose stimule la callogenèse jusqu'à la dose de 9 % qui s'avère optimale. Les tissus sont alors compacts et jaunâtres ; l'analyse au microscope électronique révèle une forte vacuolisation des cellules parenchymateuses dont les plastes regorgent de grains de polysaccharides. Le brunissement n'apparaît alors que pour des concentrations de glucides plus importantes. Les différences ainsi constatées par rapport à nos propres résultats s'expliquent vraisemblablement par les dimensions plus réduites des explantats que nous avons utilisés et qui sont de ce fait plus sensibles aux substances exogènes et en particulier aux glucides.

Ces résultats ont été obtenus sur un milieu nutritif solidifié par la gélose à 7 %. Si la concentration de gélose est plus faible ou plus forte, la croissance des explantats est nettement moins bonne. L'effet exercé par la nature du support a déjà été signalé par un certain nombre de chercheurs. Ainsi, HELLER (1953) montre que la présence d'une faible couche de liquide entre la colonie tissulaire et la gélose annule la stimulation observée en présence du milieu gélosé, et qu'inversement, une pellicule de gélose interposée entre les tissus et la solution liquide, améliore la prolifération. L'état physique du milieu peut même conditionner des phénomènes tels que l'induction florale. RANCILLAC (1973) a en effet montré que des explantats de *Cichorium Intybus* cultivés sur un milieu aqueux forment des bourgeons dont les 2/3 restent végétatifs. Par contre, des explantats placés sur des milieux solidifiés par la gélose forment tous, dans les mêmes conditions, des boutons inflorescentiels. Le potentiel hydrique des milieux de culture semble donc jouer un rôle important. La substitution d'autres supports à la gélose permet de montrer que c'est bien l'état physique, solide ou liquide,

du support qui est responsable (MARGARA et Coll., 1968). En outre ces mêmes auteurs en observant des différences dans la composition en acides aminés de fragments racinaires de *Cichorium Intybus*, cultivés soit sur un milieu liquide soit sur un milieu solide, suggèrent que le support pourrait jouer un rôle dans les échanges entre les substances intratissulaires et celles contenues dans le milieu. On peut également rappeler les résultats obtenus par GAS et Coll. (1971) avec des tubercules de topinambour. La rhizogenèse n'est obtenue habituellement qu'en présence d'une auxine (GAUTHERET, 1961-1965); lorsque les cultures sont placées sur un biogel de type polyacrylamide, la rhizogenèse devient possible en absence d'auxine.

La présence d'AG₃ permet d'obtenir une importante callogenèse sur les explantats racinaires de *Cichorium Intybus* et les cals sont alors très chlorophylliens. Il semble cependant que l'acide gibbérellique à lui seul n'ait pas d'effet notable sur la prolifération, mais amplifie les propriétés callogènes de l'auxine et de la cytokinine. Ainsi il renforce l'action de l'ANA sur la croissance des tissus de topinambour (SPANJERSBERG et GAUTHERET, 1964) et celle de la kinétine dans le cas des tissus médullaires de tabac (NITSCH, 1968). L'action stimulante de l'AG₃ sur la prolifération cellulaire pourrait provenir : d'une synthèse accrue d'auxine (COLEMAN et GREYSON, 1977b), de la formation des composés phénoliques (PAULET et NITSCH, 1963), d'une stimulation de l'activité de certaines enzymes (CHRISPEELS et VARNER, 1967), d'un rôle sur la perméabilité cellulaire en augmentant le flux de glucose, de saccharose et d'ions à travers les membranes (WOOD and PALEG, 1972) et sur l'activité osmotique en diminuant le potentiel hydrique (ENDE and KOORNNEEF, 1960 ; STUART and JONES, 1977).

Toutefois, dans nos conditions expérimentales, l'AG₃ qui stimule la callogenèse des tissus racinaires de *Cichorium Intybus* favorise également l'apparition de zones méristématiques qui se signalent extérieurement sous forme de nodules de couleur vert-clair. Cela est d'ailleurs en accord avec les constatations de GAUTHERET (1966) sur des cultures de tissus de topinambour et de carotte où l'AG₃ augmente la formation des nodules cribrovasculaires.

Pour ces raisons, nous avons dû renoncer à l'utilisation de cette substance ainsi d'ailleurs qu'à celle du lait de coco qui stimule fortement la callogenèse, mais présente les mêmes inconvénients et favorise les phénomènes de différenciation.

Les résultats observés diffèrent en fonction du lieu de prélèvement des explants le long de la racine mais aussi suivant la nature des tissus ensemencés. Nous avons pu montrer que ce sont les explantats issus de la région médiane qui présentent la meilleure croissance, cette variabilité de la callogenèse des fragments selon leur localisation, corrobore l'existence le long de la racine, d'un gradient de distribution des substances hormonales (CAMUS, 1949 ; WARMKE et WARMKE, 1950 ; VARDJAN et NITSCH, 1961). Les cytokinines sont plus abondantes dans la région proche du collet, alors que les auxines sont abondantes à la pointe de la racine. De ce point de vue, il ne semble pas que les différences observées dans la composition en glucides des différentes parties de la plante soient suffisamment importantes pour jouer un rôle déterminant (BACKOULA, 1983). Les capacités de prolifération et d'organogenèse étant sous la dépendance de facteurs stimulants ou inhibiteurs, exogènes ou endogènes, il faut alors admettre que ce sont les explantats de la partie médiane de la racine qui sont les plus aptes à proliférer. Cette capacité ne s'expliquant actuellement que par un équilibre intratissulaire déterminé en substances parmi lesquelles, les auxines et les cytokinines exerceraient un rôle important. Ce sont d'autre part, les cellules cambiales qui ont montré une croissance très supérieure. Ce résultat rappelle les observations déjà anciennes de BUVAT (1948) sur l'antagonisme entre la prolifération et la différenciation cellulaire des fragments racinaires de *Cichorium Endivia*. Cet auteur rapporte que tous les types cellulaires n'ont pas la même capacité à se différencier et à proliférer. La différenciation passe d'abord par l'acquisition d'un état méristématique secondaire où les cellules peuvent s'organiser en zones génératrices néoformées. Certaines d'entr'elles peuvent même parvenir à un stade méristématique primaire et donner naissance à des points végétatifs. De la même manière, l'observation histologique réalisée par RANCILLAC (1973) sur les tissus racinaires de *Cichorium Intybus* montre, que la meilleure croissance est observée à partir des

cellules les moins différenciées, caractérisées en particulier par l'aspect juvénile de leurs mitochondries et qui sont localisées dans la zone cambiale.

S'il n'est donc pas surprenant que ce soit les explantats contenant la zone cambiale qui prolifèrent le mieux, nos résultats montrent également que les fragments renfermant uniquement du phloème se développent mieux que ceux provenant du xylème. Ce comportement semble avoir pour origine la présence, au sein du phloème, de laticifères qui possèdent le pouvoir de proliférer intensément (BUVAT, 1944-1945) mais aussi, des réserves en inuline dissoute dans le suc vacuolaire des cellules du phloème secondaire (RANCILLAC, 1973).

Parallèlement, nous avons cherché à induire la callogenèse sur divers tissus, prélevés sur de jeunes plantules cultivées aseptiquement. Seules les racines ont donné des cals volumineux sans organes apparents. Ce comportement découle vraisemblablement du fait que le milieu de prolifération utilisé, a été mis au point pour des tissus racinaires et qu'il n'était pas fatalement adapté à d'autres tissus. C'est ce que suggère d'ailleurs les travaux d'un certain nombre de chercheurs (VASIL et HILDEBRANDT, 1966 ; FUKAMI et HILDEBRANT, 1967) qui ont étudié la croissance et la nutrition de cals issus de racine de carotte, d'embryons de chicorée, de pétiole et de tige de laitue, de pétiole de persil et d'épinard. Ils observent en particulier que des apports de composés tels que le lait de coco, l'extrait de levure et l'hydrolysate de caséine, de même que l'addition de vitamines, d'éléments minéraux ou d'hormones, provoquent des réponses variables selon les tissus utilisés. De plus, ils notent que l'intensité et la qualité de la lumière pouvaient exercer une action marquée sur la croissance, puisque les tissus de carotte par exemple exigent des énergies lumineuses importantes pour proliférer alors que la prolifération des cals issus d'embryons de *Cichorium Endivia* est nettement inhibée dans ces conditions. Par ailleurs d'autres auteurs rapportent la possibilité d'initier la callogénèse de tissus de *Cichorium Intybus* sur des fragments de feuilles étiolées (VASSEUR, 1978), voire de couches minces de cellules épidermiques (LIEBERT et TRAN THANH VAN, 1972).

L'observation histologique des explantats placés sur le "milieu cal" met en évidence l'apparition des premières divisions cellulaires aux environs de la 15e heure de culture. On assiste au cours de la 2e semaine à une intense néoformation de trachéides suivie de la formation d'amas de cellules méristématiques entre la 3e et la 4e semaine (22e jour) qui d'ailleurs ne se développent pas, car aucun organe n'apparaît à la surface des explantats même après 30 à 40 jours de culture. Cependant, en procédant à des transferts d'explantats sur des milieux induisant la formation soit de racines soit de bourgeons, il est possible d'orienter à volonté la différenciation organogène de ces tissus. Trois facteurs semblent jouer un rôle déterminant :

- les régulateurs de croissance : auxines et cytokinines
- les glucides
- la durée de séjour sur le "milieu cal" initial.

Par rapport au milieu initial (ANA $5.10^{-5}M$), la formation d'organes nécessite de diminuer la teneur en auxine des milieux de culture mais de manière plus spécifique, la rhizogenèse exige la présence de glucides et le bourgeonnement celle des cytokinines.

La possibilité d'effectuer des changements nous a permis de préciser l'évolution des potentialités cellulaires. Le temps de contact avec le milieu initial joue un rôle important en particulier, lorsqu'il s'agit d'induire des bourgeons. On observe en effet que c'est au cours de la 3e semaine de culture qu'une étape importante est franchie puisque avant, on obtient uniquement des bourgeons alors qu'après, on obtient dans les mêmes conditions, simultanément des bourgeons et des racines. Or sur le milieu initial, c'est précisément vers le 22e jour de culture que l'on observe les premiers méristèmes et on peut alors penser qu'ils seraient déjà orientés vers la voie racinaire. Pour obtenir uniquement des bourgeons il faut donc effectuer le transfert des explantats sur un milieu adéquat avant la 3e semaine de culture.

D'autres essais de transfert réalisés cependant avec des milieux différents corroborent ces observations. Des résultats analogues ont été obtenus par MARGARA et PIOLLAT (1982) dans le cas

de pétales de *Begonia rex*. En effet, ils observent que l'organogénèse *in vitro* peut être orientée vers la production abondante de racines, de bourgeons végétatifs ou de pétales en utilisant dans les trois cas un même milieu initial contenant du 2,4-D (10^{-5} M) et une cytokinine, puis en transférant au bout de 12 jours, les cultures, sur un second milieu dont on fait varier la composition minérale et glucidique.

L'étude de la nutrition minérale fait ressortir que la concentration ionique totale paraît optimale au voisinage de 100 meq/l. Néanmoins, elle ne suffit pas à elle seule à expliquer les effets différents des diverses solutions, puisque les éléments minéraux préconisés par ERIKSSON (1965) (concentration globale de 90 meq/l) provoquent une prolifération cellulaire nettement inférieure à celle observée en présence de la solution minérale de HELLER (1953 (42 meq/l). Les effets les plus marquants semblent résider dans la nature et la proportion des éléments minéraux qui les composent. La solution minérale de MURASHIGE & SKOOG (1962) semble la plus favorable à la prolifération des tissus de *Cichorium Intybus*.

Cependant l'ion NH_4^+ provoque une forte inhibition de la croissance même à des teneurs aussi faibles que 10 meq/l. Son absence dans des solutions telles que celles de HELLER, de MARGARA et de LESCURE pourrait expliquer en partie l'efficacité de ces milieux. L'inhibition de la prolifération cellulaire par l'ion NH_4^+ pourrait avoir pour origine l'acidification rapide du milieu nutritif (BAYLEY et Coll., 1972 ; BRASSART et Coll., 1978) puisqu'en maintenant le pH initial des cultures cellulaires par une solution tampon (M.E.S.) ou par une correction régulière à l'aide d'une solution alcaline, la croissance n'est plus modifiée. L'inhibition porterait peut-être sur le système enzymatique faisant intervenir la glutamine synthétase et la glutamine synthase qui catalysent respectivement la transformation du NH_4^+ et de la glutamine en acide glutamique.

Les nitrates dans la gamme des concentrations utilisées ne favorisent pas la croissance des explantats ; ce qui suggère qu'ils peuvent être supprimés des milieux de culture ou que leur teneur peut être nettement réduite.

Dans nos conditions expérimentales, lorsque les formes d'azote nitrique et ammoniacale sont associées, c'est l'action inhibitrice de l'ion NH_4^+ qui prédomine.

Cependant, l'apport d'azote sous forme de nitrates est indispensable à l'initiation florale *in vitro* de tissus racinaires de *Cichorium Intybus* (MARGARA et Coll, 1966). Il faut toutefois prendre en considération les doses de glucides utilisées (rapport C/N) puisqu'en ce qui concerne le pourcentage d'explantats ayant produit des boutons inflorescentiels complètement développés, l'optimum obtenu en présence de NO_3^- croît à mesure que la dose de saccharose augmente.

De plus, les phosphates (H_2PO_4^-) ne doivent être apportés qu'à doses très faibles (de l'ordre de 1 meq/l) comme c'est d'ailleurs le cas pour les solutions de MURASHIGE & SKOOG (1962) (1,25 meq/l), de HELLER (1953) (0,90 meq/l) et de GAMBORG (1968) (1,10 meq/l). Ce résultat diffère de celui obtenu par GWOZDZ et SZWEYKOWSKA (1969) à partir de fragments racinaires de *Cichorium Intybus* var. sativum cv. Polanowicka, qui constatent une stimulation de la prolifération cellulaire pour des teneurs plus élevées en phosphate. Les dimensions des explantats (6 mm \emptyset et 1 cm d'épaisseur) ainsi que le facteur variétal pourraient expliquer ces résultats.

Enfin, nos essais montrent que les concentrations en K^+ et Ca^{++} des solutions minérales éprouvées sont très inférieures aux besoins des tissus de la chicorée Witloof. Un tel résultat avait déjà été signalé par MARGARA et Coll. (1966) sur les tissus racinaires de la même espèce. Le bourgeonnement inflorescentiel nécessitant d'augmenter les teneurs en K^+ et Ca^{++} .

Nos observations nous ont donc conduit à employer la solution de MURASHIGE et SKOOG (1962) privée de ses éléments azotés minéraux et dont les teneurs en calcium et en potassium sont respectivement triplées (18 meq/l au lieu de 6 meq/l) et doublées (40 meq/l au lieu de 20 meq/l).

III - COLONIES TISSULAIRES

Nous avons pu montrer qu'il était possible d'induire les divisions cellulaires sans qu'elles soient suivies d'un programme organogène. La prolifération des cals peut être maintenue par repiquages successifs et fournit des colonies tissulaires d'aspect friable, constituées d'aggrégats de nodules sphériques, de diamètre variable, se séparant assez facilement. Le milieu qui a été utilisé pour cela comprend les éléments minéraux de la solution de MURASHIGE & SKOOG (1962) additionnée d'ANA 10^{-5} M, de 2,4-D 10^{-7} M, de kinétine à 10^{-7} M, de vitamines, d'hydrolysate de caséine et de saccharose 1 %. Cependant lors des repiquages ultérieurs, il est apparu que les tissus présentaient des besoins moindres en substances auxiniques (ANA $5 \cdot 10^{-6}$ M au lieu d'ANA 10^{-5} M) pour proliférer activement.

D'autre part, le transfert des cals primaires doit intervenir aux environs du 12^e jour de culture et les colonies tissulaires ainsi obtenues peuvent être entretenues indéfiniment en conservant leurs capacités prolifératrices.

Le maintien des tissus sous forme de cal nécessite toutefois, la présence constante d'auxines (ANA et 2,4-D), car l'appauvrissement du milieu en hormones se traduit rapidement par la réorganisation des points végétatifs et leur évolution en organes.

L'étude de la nutrition carbonée des souches installées montre que, comme pour nombre de tissus végétaux (HUNAULT, 1979), le saccharose et le glucose sont les glucides les plus favorables à la croissance des tissus. Les disaccharides (le maltose et le lactose) et les trisaccharides (le raffinose) permettent cependant la croissance des colonies.

Il s'avère également que la nutrition azotée des colonies tissulaires ne diffère pas de celle des cultures primaires. Ainsi, elles peuvent proliférer en l'absence de toute source azotée minérale dans le milieu de culture en utilisant uniquement de l'hydrolysate de caséine. Un tel comportement suggère la présence au sein des tissus d'enzymes capables de réduire les composés organiques en particulier les acides aminés en éléments directement assimilables

par les cellules. Nos résultats confirment ceux de CREPY et Coll. (1982).

L'étude histologique des colonies tissulaires permet de mettre en évidence la présence de massifs de cellules méristématiques et de zones où la densité des trachéides est importante. Or, la présence d'éléments vasculaires est souvent associée aux phénomènes d'organogenèse, et les cellules du xylème peuvent induire des cellules voisines à se différencier en tissus vasculaires (CAMUS, 1949 ; WETMORE et SOROKIN, 1955). Au sein des colonies tissulaires, la présence d'éléments vasculaires peut modifier l'évolution des colonies. Des gradients de substances de croissance peuvent s'établir rapidement autour de la cellule vasculaire et induire la division des cellules voisines (DAVIDSON et Coll., 1976). Un groupe de cellules peut alors être soumis à un stress mécanique (YEOMAN et BROWN, 1971) qui provoque la formation d'une structure nodulaire, cyclique, composée de petites cellules non vacuolisées et ressemblant à un primordium (GAUTHERET, 1966). De telles structures se développent ensuite en racines ou en bourgeons en fonction des conditions particulières d'environnement.

Finalement, nous avons pu réaliser la formation de plantes par des transferts de colonies sur deux milieux successifs, l'un inducteur de bourgeons, le second favorable à l'enracinement. Les plantes néoformées présentent des feuilles et des racines dont la morphologie est identique à celle de plantes provenant de graines. Il est certain que le passage par une phase indifférenciée que constitue le cal, introduit une possibilité de variabilité. Ainsi CAFFARO et Coll. (1982) ont pu montrer que les cals formés sur des explantats racinaires de *Cichorium Intybus* cultivés sur un milieu ne comprenant que les éléments minéraux de la solution de HELLER, des vitamines et du glucose, présentent fréquemment des phénomènes de fragmentation nucléaire (amitoses) à l'origine de cellules binuclées ou plus rarement multinuclées. Les bourgeons formés à partir de ces cals montrent alors une mosaïque de nombre chromosomique (diploïdes et aneuploïdes) alors que les méristèmes racinaires provenant essentiellement des tissus initiaux de l'explantat sont pour la plupart diploïdes.

De plus, il est probable que la présence d'hormones de croissance dans les milieux de culture, comme c'est le cas dans nos conditions expérimentales pour induire une callogenèse importante, doit encore accentuer les possibilités de variabilité chromosomique.

Notre travail a montré que le système constitué par les petits explantats racinaires de *Cichorium Intybus* pouvait être utilisé pour orienter à volonté l'organogenèse ou contrôler la prolifération cellulaire en dépit des capacités naturelles de ces tissus à former des bourgeons.

L'obtention d'une suspension cellulaire semble désormais possible. Il faudrait préciser la composition du milieu liquide. L'effet défavorable de l'azote minéral ainsi que l'extrême sensibilité aux sucres exogènes suggèrent que le rapport C/N pourrait jouer un rôle important.

- BACKOULA E., 1983. - Les glucides et la formation des bourgeons : culture hydroponique de la racine de *Cichorium Intybus* et expérimentation *in vitro* .
Mémoire de D.E.A., U.S.T. Lille 1, 55 p.
- BAGNI N. et FRACASSINI D.S., 1971. - The effect of coumarin dérivatives on organogenesis and callus growth of *Cichorium Intybus* roots and *Helianthus tuberosus* tubers *in vitro* .
Experientia, Suisse, 27, 1239-1241.
- BAYLEY J.M. KING J. et GAMBORG O.L., 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.
- BERTOSSI F., 1950. - Action de l'acide diphenylilacétique sur les tissus d'endive et de rhizomes de topinambour cultivés *in vitro* .
C. R. Soc. Biol., CXLIV, 1330-1332.
- BESSEMER J., 1968. - Der Einfluß von Wachstumsregulatoren auf Protein- und-Enzym-Spektren kultivierter Explante aus Rüben von *Cichorium Intybus* L.
Planta, 82, 211-222.
- BESSEMER J. HARDEN U. et REINERT J., 1969. - Der Einfluß von kinetin und Gibberellinsäure auf die Organbildung an *in vitro* kultivierten Blättern von *Cichorium Intybus* L.
Z. Pflanzenphysiol., 60, 123-134.
- BLONDEL V., 1979. - Analyse morphogénétique du développement *in vitro* des tissus de la racine d'endive *Cichorium Intybus* L.
Mémoire de D.E.A., U.S.T. Lille 1, 66 p.
- BONNETT H.T. et TORREY J.G., 1965. - Chemical control of organ formation in root segments of *Convolvulus* cultured *in vitro* .
Plant. Physiol., 40, 1228-1236.

- BOUILLENNE R. et WENT F., 1933. - Recherches expérimentales sur la néoformation des racines dans les plantes et les boutures des plantes supérieures.
Ann. J. Bot. Buitenzorg, 43, 25-202.
- BOUNIOLS A., 1968. - Recherches expérimentales sur la néoformation de bourgeons inflorescentiels chez *Cichorium Intybus* L. .
Thèse 3e cycle, Paris, 67 p.
- BOUNIOLS A. et MARGARA J., 1968. - Recherches expérimentales sur la néoformation de bourgeons inflorescentiels ou végétatifs *in vitro* à partir d'explantats d'endive (*Cichorium Intybus* L.) VI. Mise en évidence de l'influence de l'hydratation des tissus.
Ann. Physiol. vég., 10, 69-81.
- BOUNIOLS A. et MARGARA J., 1971. - Influence de la nature du milieu liquide ou gélosé sur la composition en acides aminés des tissus de racine d'Endive (*Cichorium Intybus* L.) au cours de la néoformation *in vitro* de bourgeons végétatifs ou inflorescentiels.
C.R. Acad. Sci., Paris, 273, 1104-1107.
- BOUNIOLS A., DELECOLLE M.T. et KRONENBERGER J., 1973. - Influence de la photopériode sur la composition en acides aminés libres et protéiques des tissus de la racine d'Endive (*Cichorium Intybus* L.) au cours de la néoformation de bourgeons végétatifs ou inflorescentiels.
C.R. Acad. Sci., Paris, 277, 161-164.
- BOURIQUET R., 1966. - Action de la lumière sur le développement des tissus de feuilles d'endive cultivés *in vitro* .
Phytochem. Photobiol., 5, 391-395.
- BOURIQUET R. et VASSEUR J., 1966. - Sur la croissance et le bourgeonnement des tissus de feuilles d'endive cultivés *in vitro* .
In "Les Phytohormones et l'organogenèse".
Congrès International, Université de Liège, 38, 381-389.

- BOURIQUET R. et COUVEZ J., 1967. - Action des rayons X sur le bourgeonnement des tissus de feuilles d'endive cultivés *in vitro*. *Bull. Soc. Bot. Fr. mem.*, 61-72.
- BOURIQUET R., 1972. - Action de l'éthylène sur le bourgeonnement et la floraison *in vitro* de fragments de racines d'endive. *C.R. Acad. Sci. Paris.*, 275, 33-34.
- BRASSART C. DUBOIS J. et BOURIQUET R., 1978. - Nutrition azotée d'une suspension cellulaire de Silène (*Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause). *C.R. Acad. Sci. Paris.*, 287, 1373-1376.
- BROSSARD-CHRIQUI D. et ISKANDER S., 1980. - Particularités ultrastructurales de l'amylogénèse provoquée *in vitro* dans les explants foliaires du *Datura innoxia* Mill. *Jour. Ultrastruct. Res.*, 72, 264-271
- BROWN D.C.W. LEUNG D.W.M. et THORPE T.A., 1979. - Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. *Physiol. Plant.*, 46, 36-41.
- BUVAT R., 1944 -1945, - Recherches sur la dédifférenciation des cellules végétales. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, 11e série, 5, 1-119.
- BUVAT R., 1948, - Monographie cytologique des cultures de tissus de chicorée. *Rev. Cytol. Cytophysiol. vég.*, 10, 55-80.
- CAFFARO L. DAMERI R.M. PROFUMO P. et BENNICI A., 1982, - Callus induction and plantlet regeneration in *Cichorium Intybus* L. A cytological study. *Protoplasma*, 111, 107-112.

- CAMUS G., 1949. - Recherche sur le rôle des bourgeons dans les phénomènes de morphogenèse.
Rev. Cytol. Biol. veg., 11, 1-195.
- CHRISPEELS M.J. et VARNER J.E., 1967, - Hormonal control of enzymes synthesis : on the mode of action of gibberellic acid and abscisic acid in aleurone layers of barley.
Plant. Physiol., 42, 1008-1016.
- COLEMAN W.K. et GREYSSON R.I., 1977 a. - Analysis of root formation in leaf discs of *Lycopersicon esculentum* Mill. cultured *in vitro* .
Ann. Bot., London, 41, 307-320.
- COLEMAN W.K. et GREYSON R.I., 1977 b. - Promotion of root initiation by gibberellic acid in leaf discs of tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultured *in vitro* .
New. Phytol., 78, 47-54.
- CREPY L., CHUPEAU M.C. et CHUPEAU Y., 1982. - The isolation and culture of leaf protoplasts of *Cichorium Intybus* and their regeneration into plants.
Z. Pflanzenphysiol., 107, 123-131.
- COUILLEROT J.P. BOURIQUET R. et BONNEMAIN J.L., 1978. - Phénomènes d'histogenèse dans les explantats de feuilles d'endive étiolées (*Cichorium Intybus* L.) cultivés *in vitro* .
Rev. gén. Bot., 85, 3-10.
- DAVIDSON A.W. AITCHISON P.A. et YEOMAN M.M., 1976. - Disorganized systems. In : "Cell division in higher plants".
Yeoman Edit. Academic Press London, N. York, San Francisco., 407-432.

- DORCHIES V., 1984. - Activité de la nitrate réductase de *Cichorium Intybus* : Etude à différents stades de développement de la plante et dans les tissus cultivés *in vitro*.
Thèse 3e cycle, U.S.T. Lille I, 137 p.
- ENDE VAN DEN J. et KOORNNEEF P., 1960. - Gibberellic acid and osmotic pressure.
Nature, 186, 327.
- ERIKSSON T., 1965. - Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of *Haplopappus gracilis*.
Physiol. Plant., 18, 975-993.
- FUKAMI T. et HILDEBRANDT A.C., 1967. - Growth and chlorophyll formation in edible green plant callus tissues *in vitro* on media with limited sugar supplements.
Bot. Mag. Tokyo., 80, 199-212.
- GALSTON A.W., 1948. - On the physiology of root initiation in excised *Asparagus* stem tips.
Amer. J. Bot., 35, 281-287.
- GAMBORG O.L. MILLER R.A. et OJIMA K., 1968. - Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells.
Exp. Cell. Res., 50, 148-151.
- GAS G., ZALTA J.P. et FALLOT J., 1971. - Croissance et différenciation de tissus cultivés sur supports de gels de polyacrylamide.
96e Congr. Nat. Soc. Sav.
- GAUTHERET R.J., 1939. - Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte.
C. R. Acad. Sci. Paris, 210, 186-188.
- GAUTHERET R.J., 1941a. - Recherches sur la croissance de fragments de tissus de quelques végétaux appartenant à la famille des composées.
C.R. Acad. Sci. Paris, 212, 1098-1100.

- GAUTHERET R.J., 1941b. - Caractères anatomiques et cytologiques des tranches d'Endive, Salsifis et Topinambour cultivées *in vitro*.
C.R. Soc. Biol. 135, 1161-1164.
- GAUTHERET R.J., 1941c. - Sur le repiquage des cultures de tissus d'Endive, de Salsifis et de Topinambour.
C.R. Acad. Sci. Paris, 213, 317-318.
- GAUTHERET R.J., 1942. - Recherches sur le développement de fragments de tissus végétaux cultivés *in vitro*.
Rev. Cytol. Cytophysiol. vég., 6, 87-180.
- GAUTHERET R.J., 1947. - Action des acides 2,4-dichlorophenoxyacétique et naphtoxyacétique sur le développement des fragments de tissus de Carotte et d'Endive, cultivés *in vitro*.
C.R. Soc. Biol., 141, 475-477.
- 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, édit., Paris, 863 p.
- GAUTHERET R.J., 1961. - Action de la lumière et de la température sur la néoformation de racines par des tissus de topinambour cultivés *in vitro*.
C.R. Acad. Sci. Paris., 252, 2791-2796.
- GAUTHERET R.J., 1965. - Sur l'interaction des principaux facteurs de la néoformation des racines par les tissus de topinambour cultivés *in vitro*.
90e congr. Soc. Sav., II, 355-368.

- GAUTHERET R.J., 1966. - Phytohormones et culture de tissus . In : "Les phytohormones et l'organogénèse".
Congrès international, Université de Liège, 38, 55-82.
- GAUTHERET R.J., 1969. - Investigations on the root formation in the tissues of *Helianthus tuberosus* cultured *in vitro*.
Amer. J. Bot., 56, 702-717.
- GORDON A.J. et FLOOD A.E., 1979. - Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on invertases in chicory root.
Phytochem., 18, 405-408.
- GORDON A.J. et FLOOD A.E., 1980. - 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and the *de novo* synthesis of invertase in chicory root tissue.
Phytochem., 19, 505-508.
- GRESSHOFF P.M., 1978. - Phytohormones and growth and differentiation of cells and tissues cultured *in vitro*.
In : Phytohormones and related compounds. A Comprehensive treatise, vol. II., Ed. Letham, Goodwin and Higgins, 1-29.
- GWOZDZ E. et SZWEYKOWSKA A., 1967. - The effect of kinetin and IAA on the organogenesis in root explants of *Cichorium Intybus*.
Bull. Soc. Amis. Sci. Lettr. Poznan., D, 8, 3-9.
- GWOZDZ E. et SZWEYKOWSKA A., 1969. - The effect of some nutritional factors on the organogenesis in root explants of *Cichorium Intybus*
Bull. Soc. Amis. Sci. Lettr. Poznan., 9, 11-18.
- GWOZDZ E., 1973. - Effect of IAA on growth, organogenesis and RNA metabolism during the development of *Cichorium Intybus* root explants cultured *in vitro*.
Acta. Soc. bot. Pol., 17, 493-506.
- HELLER R., 1953. - Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*.
Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. vég., 14, 1-223.

- HUNAUULT R., 1979. - Recherches sur le comportement des fragments d'organes et des tissus de Monocotylédones cultivés *in vitro*.
III. Etude du cas de plusieurs liliacées.
Rev. Cytol. Biol. végét. Bot., 2, 103-154.
- JABLONSKI J.R. et SKOOG F., 1954. - Cell enlargement and cell division in excised tobacco pith tissue.
Physiol. Plant., 7, 16-24.
- JOSEPH C. et PAULET P., 1973. - Variations de la teneur en cytokinines endogènes dans la racine de *Cichorium Intybus L.*, en fonction du traitement de vernalisation par le froid.
C.R. Acad. Sci. Paris, 277, 785-788.
- JOSEPH C. SEIGNEURET J.M. TOURAUD G. et BILLOT J., 1983. - The free gibberellins of *Cichorium Intybus L.* root : Identification and changes during vernalization.
Z. Pflanzenphysiol., 110, 401-407.
- LANGERON M., 1949. - *Precis de microscopie.*
Masson Edit. Paris, 1430 p.
- LEE T.T. et SKOOG F., 1965. - Effects of substituted phenols on bud formation and growth of tobacco tissue cultures.
Physiol. Plant., 18, 386-402.
- LEFEBVRE R., 1964. - Influence de la composition de l'atmosphère sur le développement de fragments de racine d'endive cultivés *in vitro*.
Bull. Soc. Bot. Nord. France., 17, 55-61.

LEFEBVRE R., 1970. - Efficacité de traitements anaérobies sur le développement de fragments de racine d'endive cultivés *in vitro*. *Bull. Soc. Bot. Nord. Fr.*, 23, 53-56.

LEFEBVRE R., 1971a. - Influence de la faible tension d'oxygène sur le développement des fragments de racine d'endive cultivés *in vitro*. *Rev. gén. Bot.*, 78, 261-266.

LEFEBVRE R., 1971b. - Action de différents alcools sur le bourgeonnement des fragments de racine d'endive cultivés *in vitro*. *96e Cong. natn. Soc. Sav., Toulouse, Sci.*, 4, 43-49.

LEFEBVRE R. et YAMEOGO R.A., 1976. - Alimentation carbonée et bourgeonnement des tissus de racine d'endive (*Cichorium Intybus L.*). Influence de l'anaérobiose. *Actes du 101 ème Congrès national des sociétés savantes, Lille, Sciences, fascicule I*, 573-583.

LEFEBVRE R., 1978. - Actions comparées de l'éthylène et de l'éthane sur le bourgeonnement. *C.R. Acad. Sci. Paris.*, 287, 25-27.

LEFEBVRE R., 1979. - Influence de l'éclairement sur le bourgeonnement de fragments de racine d'endive (*Cichorium Intybus L.*) cultivés *in vitro*. *C.R. Acad. Sci. Paris.*, 289, 271-274.

LEFEBVRE R., 1980. - Influence d'un apport d'éléments minéraux sur la croissance de feuilles d'endive (*Cichorium Intybus L.*). Application au forçage des racines en hydroponique. *Bull. Soc. Bot. Nord. France*, 33, (3-4), 41-46.

- LEGRAND B., 1972. - Influence des conditions initiales d'éclairement sur le bourgeonnement et la polarité de tissus de feuilles d'endive cultivés *in vitro*.
C.R. Acad. Sci. Paris, 275, 31-32.
- LEGRAND B., 1974. - Influence des conditions d'éclairement sur la néoformation des bourgeons par les tissus de feuilles d'endive cultivés *in vitro* et sur l'activité peroxydasique de ces tissus.
C.R. Acad. Sci. Paris, 278, 24-28.
- LEGRAND B., 1975. - Action du fer et de l'EDTA sur la néoformation des bourgeons par les fragments de feuilles d'endive cultivés *in vitro*.
C.R. Acad. Sci. Paris., 280, 2215-2218.
- LEGRAND B. GASPARD T. PENEL C. et GREPPIN H., 1976. - Light and hormonal control of phenolic inhibitors of peroxydase in *Cichorium Intybus* L.
Plant. Biochem. Jour., 3, (2), 119-127.
- 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. (PRAHA)., 19, (1), 27-33.
- LEROUX R., 1965. - Influence de l'auxine et de la lumière sur la rhizogenèse de fragments de tiges de deux espèces de vignes vierges (*Parthenocissus tricuspidata* (Sieb. et Zucc) Planch. et *Parthenocissus quinquefolia* L. Planch.) cultivés *in vitro*.
C.R. Acad. Sci. Paris., 260, 4589-4591.
- LEROUX R., 1968. - Action de l'acide gibbérellique sur la rhizogenèse de fragments de tiges de pois (*Pisum sativum* L.) cultivés *in vitro* en présence d'auxine à l'obscurité ou à la lumière.
C.R. Acad. Sci. Paris., 266, 106-108.

- LEROUX R., 1973. - Contribution à l'étude de la rhizogenèse de fragments de tiges de pois (*Pisum sativum* L.) cultivés *in vitro*.
Thèse Doctorat, Université Paris VI; 163 p.
- LESCURE A.M., 1969. - Mutagenèse et sélection de cellules d'*Acer pseudoplatanus* L. cultivées *in vitro*.
Physiol. vég., 7, 237-250.
- LIEBERT J. et TRAN THANH VAN M., 1972. - Progrès de la multiplication clonale intense chez les plantes cultivées : cas de l'endive. Etudes de la capacité néoformatrice des couches minces de cellules de types épidermiques de *Cichorium Intybus* L.
C.R. Acad. Agric. Fr., n° 58, 472-479.
- LINSMAIER E.M. et SKOOG F., 1965. - Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures.
Physiol. Plant., 18, 100-127.
- LISON L., 1960. - Histochimie et cytochimie animales.
Gauthier-Villars Edit. Paris., 842 p.
- LOWRY O.H. ROSEBROUGH N.J. FARR A.L., et RANDALL R.J., 1951. - Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- MARGARA J. et RANCILLAC M., 1966. - Recherches expérimentales sur la néoformation de bourgeons inflorescentiels ou végétatifs *in vitro* à partir d'explantats d'endive (*Cichorium Intybus* L.). II Observations sur la vernalisation préalable de la racine.
Ann. Physiol. vég., 8, 39-47.
- MARGARA J. RANCILLAC M. et BOUNIOLS A., 1966. - Recherches expérimentales sur la néoformation de bourgeons inflorescentiels ou végétatifs *in vitro* à partir d'explantats d'endive (*Cichorium Intybus* L.). III Etude de la méthode.
Ann. Physiol. vég., 8 (4), 285-305.

- MARGARA J. RANCILLAC M. et BOUNIOLS A., 1968. - La néoformation *in vitro* de bourgeons inflorescentiels chez *Cichorium Intybus* L. Etude méthodologique. In : "Les cultures de tissus de plantes". Colloques Nat. C.N.R.S. Paris 71-82.
- MARGARA J. et PIOLLAT M. TH., 1982. - Influence de la composition minérale et glucidique du milieu sur l'organogenèse observée *in vitro* à partir de pétales de *Begonia x elatior*. C.R. Acad. Sci. Paris, 294, 545-548.
- MURASHIGE T., 1961. - Suppression of shoot formation in cultured Tobacco cells by gibberellic acid. *Science*, 134, 280.
- MURASHIGE T. et SKOOG F., 1962. - A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- MURASHIGE T., 1964. - Analysis of the inhibition of organ formation in Tobacco tissue culture by gibberellin. *Physiol. Plant.*, 17, 636-643.
- NAKANISHI S., 1979. - Peroxydases et bourgeonnement de fragments de racines d'Endive (*Cichorium Intybus*) L.) C.R. Acad. Sci. Paris, 289, 695-698.
- NITSCH J.P. et NITSCH C., 1956. - Auxin-dependent growth of excised *Hélianthus tuberosus* tissue. *Ann. J. Bot.*, 43, 839.
- NITSCH J.P., 1966. - Multicellular physiology : the role of plant hormones. In : "Wachstum regulatoren bei Pflanzen". Intern. Vortragstagung. Rostock/kuhlungsborn 395-405.
- NITSCH J.P., 1968. - Studies on the mode of action of auxins, cytokinins and gibberellins at the subcellular level. In : "Biochemistry and Physiology of plant growth substances". Proc. of the 6 th intern. Conf. on plant growth substances. Ottawa (Wightman F. et Setterfield G. Edit.) The Runge Press Ltd, 563-580.

- NOBECOURT P., 1939. - Sur la perennité et l'augmentation du volume des cultures de tissus végétaux.
C.R. Soc. Biol., 130, 1270-1271.
- OHIRA K. OJIMA K. et FUJIWARA A., 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.
- PALEG L.G., 1960. - Physiological effects of gibberellic acid. I : On carbohydrate metabolism and amylase activity of barley endosperm.
Plant.Physiol., 35, 293-299.
- PAULET P. et NITSCH J.P., 1963. - Etude préliminaire du bourgeonnement *in vitro* de "*Nicotiana glauca*, *N. suaveolens*" et leur hybride.
Bull. Soc. Bot. Fr., 110, 361-366.
- PAULET P., 1967. - La néoformation de bourgeons floraux sur une plante nécessitant la vernalisation : *Cichorium Intybus L.*
Bull. Soc. Bot. Fr., *mémoires*, 201-208.
- PAULET P. et MIALOUNDAMA F., 1976. - Changes in content of chlorogenic and isochlorogenic acids during vernalization of the roots of *Cichorium Intybus L.* in connection with their ability to bloom *in vitro*.
Fiziologiya Rastenii, 23, (3), 550-553.
- PHAN C.T., 1971. - *Monographies de Physiologie végétale*, n° 8, 130 p.
- PROFUMO P., 1967. - Osservazioni sulla coltura *in vitro* di foglie e frammenti fogliari di *Cichorium Intybus L.*
Giorn. bot. Ital., 101, 311.
- PROFUMO P. et DAMERI R.M., 1969. - Proliferazione e rizogenesi in frammenti fogliari di *Cichorium Intybus L.* : Osservazioni istologiche.
Giorn. bot. Ital., 103, 301-324.

- RANCILLAC M., 1973. - Néof ormation de bourgeons et induction florale en culture de tissus : étude histophysiologique.
Thèse de Doctorat, Paris VI, 97 p.
- RAMBOUR S. et MONTUELLE B., 1963. - Action de la kanamycine sur le développement de fragments de racines d'endive cultivés *in vitro*.
Bull. Soc. Bot. Nord. Fr., 16, 73-76.
- ROGER V., 1981. - Etude biochimique et histiautoradiographique de la néof ormation de bourgeons sur des fragments de racine d'endive (*Cichorium Intybus L.*) cultivés *in vitro*.
Thèse 3e cycle, U.S.T. Lille I, 73 p.
- ROGER V. et VASSEUR J., 1983. - Etude histoautoradiographique de la synthèse d'ADN au cours de l'initiation de bourgeons adventifs par des explantats de racines de *Cichorium Intybus* cultivés *in vitro*.
Rev. cytol. Biol. végét. bot., 6, 129-139.
- ROGOZINSKA J., 1961. - Organogeneza w tkance korzenia cykorii w zależności od obecności sacharozy i azotu w pożywce.
Acta.Soc. Bot. Pol., 30, 149-162.
- ROSS M.K. THORPE T.A. et COSTERTON J.W., 1973a. - Ultrastructural aspects of shoot initiation in Tobacco callus cultures.
Ame. J. Bot., 60, 788-795.
- ROSS M.K. THORPE T.A. et COSTERTON J.W., 1973b. - Physiological gradients and shoot initiation in Tobacco callus cultures.
Plant.Cell .Physiol., 14, 473-480.
- RUCKER W. et PAUPARDIN C., 1969. - Action de quelques acides-phénols sur la rhizogenèse des tissus de tubercules de topinambour (var. violet de Rennes) cultivés *in vitro*.
C.R. Acad. Sci. Paris, 268, 1279-1281.

- RÜCKER W., 1982. - Kombiniertes Einfluß von indoleessigsäure, gibberellin und benzylaminopurin auf kallus- und organendifferenzierung an blattexplantaten von *Digitalis purpurea*.
Z. Pflanzenphysiol., 107, 141-151.
- RUTHEFORD P.P. et JACKSON A.A., 1965. - L'influence du froid sur la dégradation des oligosaccharides de fructose dans les racines de chicorée de Bruxelles et l'effet sur la production de chicons.
Ann. Gembloux, 71, 187-196.
- SAUSSAY R., 1971. - Action de quelques facteurs sur les tissus de saule (*Salix cinerea* L.) cultivés *in vitro*.
96e Congr. Natn. Soc. Sav., Toulouse, 4, 137-144.
- SCHENK R.V. et HILDEBRANDT A.C., 1972. - Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures.
Can. J. Bot., 50, 199-204.
- SCHOUTEDEN-WERY J., 1920. - Quelques expériences de régénération des bourgeons chez les racines de chicorées.
Bull. Acad. roy. Belg., 6, 152-166.
- SEIBERT M. WETHERBEE P.J. et JOB D.D., 1975. - The effects of light intensity and spectral quality on growth and shoot initiation in Tobacco callus.
Plant Physiol., 56, 130-139.
- SENE A., 1981. - Recherche des conditions nutritives et hormonales nécessaires à la prolifération des tissus et à la formation de racines à partir d'explantats de *Cichorium Intybus* L. (variété Witloof, cultivar "Zoom").
Mémoire de D.E.A., U.S.T. Lille I, 43 p.

- SENE A. VASSEUR J. et LEFEBVRE R., 1983. - Sur l'aptitude de petits explantats racinaires de *Cichorium Intybus* L. (var. Witloof) à produire des racines adventives en culture *in vitro*. *C.R. Acad. Sci. Paris.*, 297, 81-86.
- SIRCAR P.K. et CHATERJEE S.K., 1974. - Physiological and biochemical changes associated with adventitious root formation in *Vigna* hypocotyl cuttings. II. Gibberellin effects. *Plant. Crop.*, 20, (2), 15-22.
- SKOOG F. et MILLER C.O., 1957. - Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exptl. Biol.*, 11, 118-131.
- SMITH D.R. et THORPE T.A., 1975. - Root initiation in cuttings of *Pinus radiata* seedlings. I. Developmental sequence. *J. Exp. Bot.*, 26, 184-192.
- SOBCZYK U. et SZWEYKOWSKA A., 1973. - The effect of 3-indolylacetic acid on the accumulation of starch in the root tissue of *Cichorium Intybus* L. cultured *in vitro*. *Acta.Soc. bot. Pol.*, 19, 297-303.
- SOBCZYK U., 1976. - The effect of 3-indolylacetic acid and sucrose on the activity of some enzymes in the callus tissue of *Cichorium Intybus* L. *Bull. Soc. Amis.Sci. Lettr. Poznan.*, 16, 79-83.
- SPANJERSBERG G. et GAUTHERET R.J., 1963. - Sur les facteurs de la néoformation des racines par les tissus de topinambour (*Helianthus tuberosus* L. var. violet de Rennes) cultivés *in vitro*. *C.R. Acad. Sci. Paris.*, 263, 1834-1836.

- SPANJERSBERG G. et GAUTHERET R.J., 1964. - Nouvelles recherches sur l'action de l'acide gibbérellique sur les tissus de topinambour cultivés *in vitro*.
C.R. Acad. Sci. Paris, 258, 4121-4125.
- STERLING C., 1951. - Origin of buds in tobacco stem segments cultured *in vitro*.
Amer. J. Bot., 38, 761-767.
- STUART D.A. et JONES R.L., 1977. - Roles of extensibility and turgor in gibberellin -and dark- stimulated growth.
Plant. Physiol., 59, 61-68.
- SUNDERLAND N. et WELLS B., 1968. - Plastid structure and development in green callus tissues of *Oxalis dispar*.
Ann. Bot., 32, 327-346.
- THORPE T.A. et MURASHIGE R., 1968 . - Starch accumulation in shoot-forming Tobacco callus cultures.
Science, 160 421-422.
- THORPE T.A. et MURASHIGE T., 1970. - Some histochemical changes underlying shoot initiation in Tobacco callus cultures.
Can. J. Bot., 48, 277-285.
- THORPE T.A., 1978. - Regulation of organogenesis *in vitro*. In :
" Propagation of higher plants through tissue culture. A bridge between research and application."
University of Tennessee. Symposium proceedings, 87-101.
- TOPONI M., 1963a. - Action combinée de la kinétine et de l'acide indolyacétique sur la néoformation d'organes par des fragments de feuilles d'endive (*Cichorium Intybus L.*) cultivés *in vitro*.
C.R. Acad. Sci. Paris, 257, 3030-3033.

- TOPONI M., 1963b. - Sur la culture de fragments de feuilles d'endive (*Cichorium Intybus* L.).
C.R. Acad. Sci. Paris., 257, 3212-3215.
- TRAN THANH VAN M. NGUYEN THI DIEN et CHLYAH A., 1974. - Regulation of organogenesis in small explants of superficial tissue of *Nicotiana tabacum* L.
Planta, 119, 149-159.
- TRONCHET J., 1959. - Etude par chromatographie sur papier des flavonoïdes de *Convolvulus sepium* dans les flagelles volubiles, les tiges rampantes et les tiges rampantes devenues volubiles par traitement gibbérellique.
Bull. Soc. Hist. Nat. Doubs, 62, 101-104.
- VARDJAN M. et NITSCH J.P., 1961. - La régénération chez *Cichorium endivia* L. : Etude des auxines et des kinines endogènes.
Bull. Soc. Bot. Fr., 108; 363-374.
- VASIL I.K. et HILDEBRANDT A.C., 1966. - Variations of morphogenetic behaviour in plant tissue cultures. I : *Cichorium endivia*.
Amer. J. Bot., 53, (9), 860-869.
- VASSEUR J., 1965. - Sur les conditions de culture *in vitro* des tissus de feuilles d'endive.
Bull. Soc. Bot. Nord. Fr., 18, 205-212.
- VASSEUR J., 1966. - Sur la polarité des tissus de feuilles d'endive cultivés *in vitro*.
Bull. Soc. Bot. Nord. Fr., 19, 188-194.
- VASSEUR J., 1978. - Etude du bourgeonnement de fragments de feuilles étiolées d'endive (*Cichorium Intybus* L.) en fonction de critères physiologiques et biochimiques.
Thèse Lille, 240p.

- WARMKE H.E. et WARMKE G.L., 1950. - The role of auxin in the differentiation of root and shoot primordia from root cuttings of *Taraxacum* and *Cichorium*.
Amer. Jour. Bot., 37, 272-280.
- WENT F. et THIMANN K.V., 1937. - *Phytohormones*.
Mc Millan edit. New York., 294 p.
- WETMORE R.H. et SOROKIN S., 1955. - On the différentiation of xylem.
Jour. Arnold Arboretum., 36, 305-317.
- WHITE PH. R., 1939a. - Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient.
Amer. Jour. Bot., 26, 182-188.
- WHITE PH. R., 1939b. - Controlled differentiation in a plant tissue culture.
Bull. Torrey. Bot. Club., 66, 507-513.
- WHITE PH.R., 1943. - A handbook of plant tissue culture.
The Jacques catlell Press. Edit. Lancaster, Pa.
- WOOD A. et PALEG L.G., 1972. - The influence of GA₃ on the permeability of model membrane systems.
Plant. Physiol., 50, 103-108.
- YEOMAN M.M. et BROWN R., 1971. - Effects of mechanical stress on the plane of cell division in developping callus cultures.
Ann. Bot., 35, 1001-1012.

P L A N C H E I

CULTURE *IN VITRO* DE FRAGMENTS RACINAIRES DE *CICHORIUM INTYBUS L.*

Photo 1 : Explantats (6 mm de diamètre, 2 mm d'épaisseur) avant leur ensemencement (A) et après 30 jours de culture (B) sur un milieu renfermant la solution minérale de HELLER additionnée d'ANA 10^{-6} M, de Kin 10^{-7} M, d'AG₃ 10^{-5} M et de glucose 1 %.

Photo 2 :

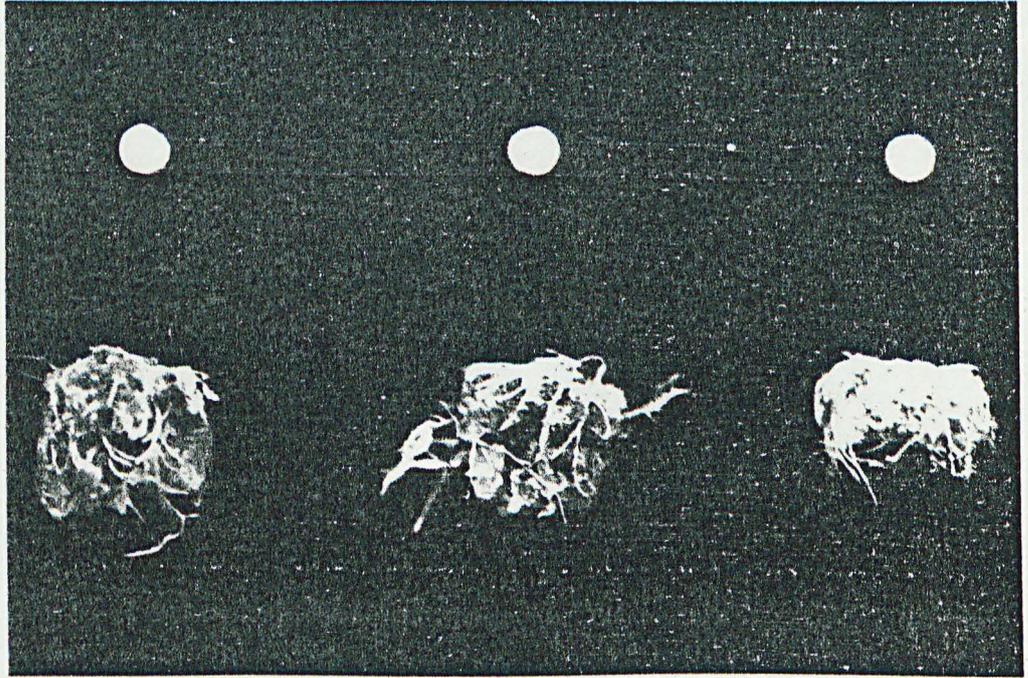
A : Induction de la callogenèse sur un milieu renfermant la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG additionnée d'ANA $5 \cdot 10^{-5}$ M, de Kin 10^{-7} M, de vitamines et d'hydrolysate de caséine, pendant 30 jours.

B : Induction de la rhizogenèse sur un milieu renfermant la solution minérale de HELLER additionnée d'ANA 10^{-6} M, de Kin 10^{-7} M, d'AG₃ 10^{-5} M et de glucose 1 %, pendant 30 jours.

①

A

B



②



A

B

HIS
LITTLE

P L A N C H E I I

ETUDES HISTOLOGIQUES AU COURS DE LA CULTURE *IN VITRO* DES TISSUS
DE *CICHORIUM INTYBUS L.*

Photo 1 et 2 : Observation des premières divisions cellulaires au sein du phloème après 15 heures de culture (grossissement : environ 700 fois ; coloration : feulgen).

Photo 3 et 4 : Amas de cellules méristématiques néoformées au contact des trachéides après 30 jours de culture (grossissement : environ 700 fois ; coloration : safranine - fast green).

Les fragments racinaires sont cultivés sur un milieu renfermant la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG additionnée d'ANA $5 \cdot 10^{-5}$ M, de Kin 10^{-7} M, de vitamines et d'hydrolysate de caséine.



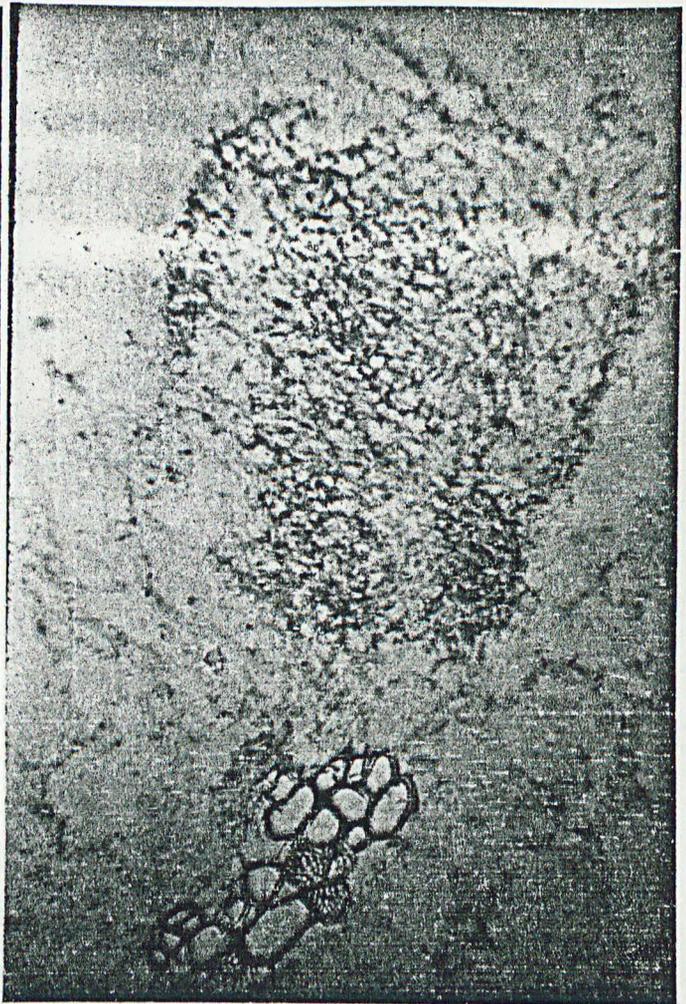
①



②



③



④

P L A N C H E I I I

ASPECTS HISTOLOGIQUES DES COLONIES TISSULAIRES APRES 30 JOURS
DE CULTURE.

Photo 1 : Trachéides néoformés en nappes.
(grossissement : environ 700 fois ; coloration : feulgen)

Photo 2 : Trachéides néoformés en nodules.
(grossissement : environ 700 fois ; coloration : feulgen).

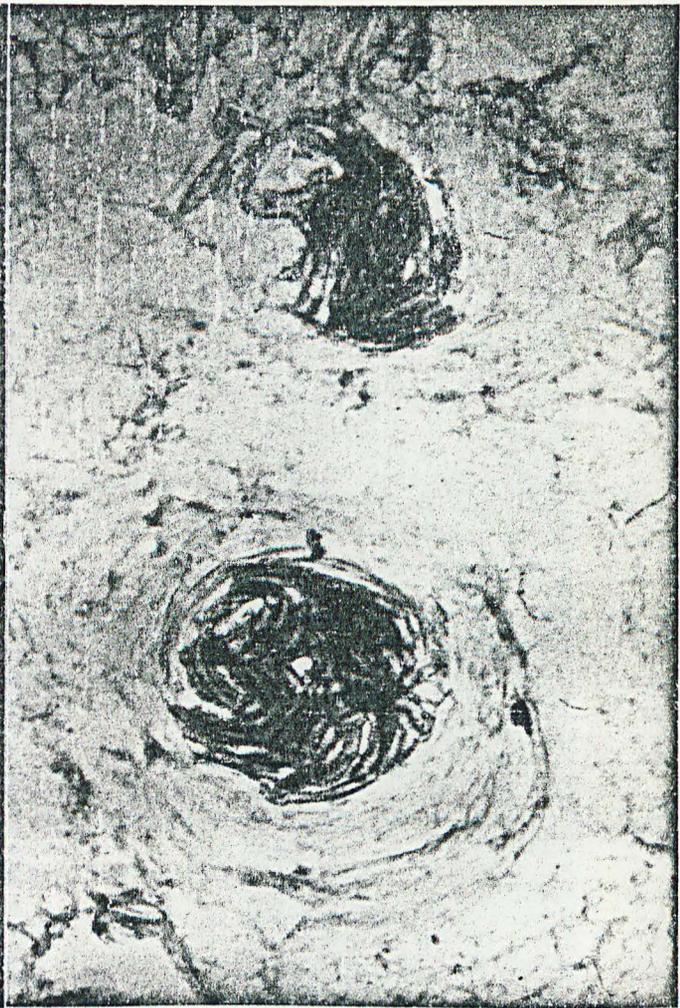
Photo 3 : Présence d'amas de cellules méristématiques au sein des
tissus. (grossissement : environ 150 fois ; coloration :
feulgen).

Les colonies sont entretenues sur un milieu renfermant la solution
minérale de MURASHIGE & SKOOG additionnée d'ANA $5 \cdot 10^{-5}$ M, de Kin
 10^{-7} M, de 2,4-D 10^{-7} M, de vitamines, d'hydrolysate de caséine et
de saccharose 1 %.

Photo 4 : Primordium racinaire dans les colonies tissulaires
30 jours après leur transfert sur un "milieu
inducteur" (MURASHIGE & SKOOG + ANA 10^{-6} M + Kin
 10^{-7} M + saccharose 1 %). (grossissement : environ
150 fois ; coloration : feulgen).



①



②



③



④

303
LILLE

P L A N C H E I V

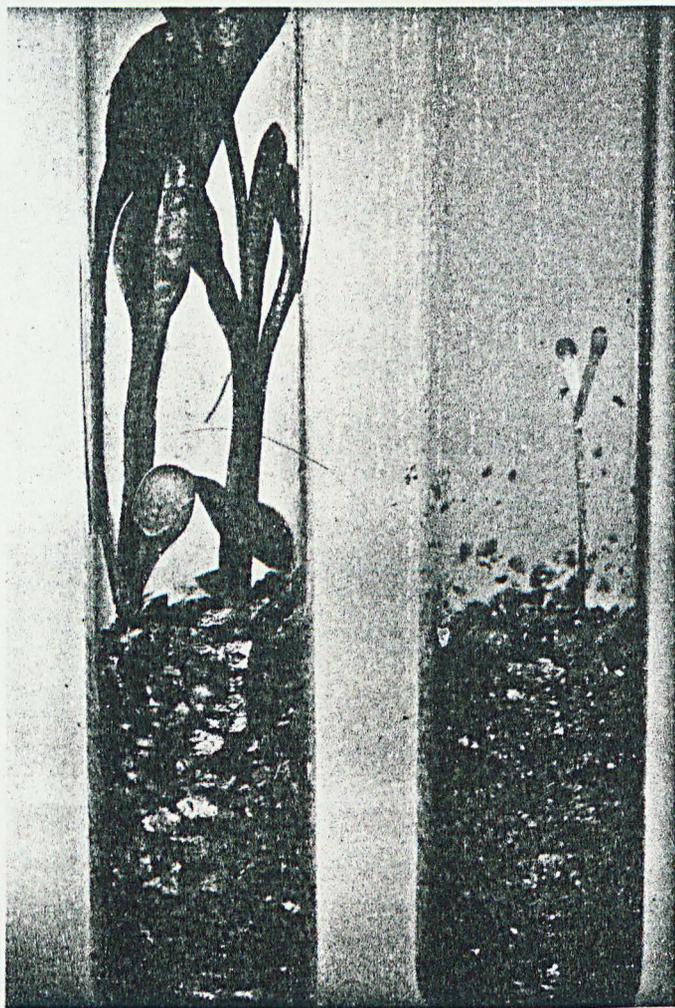
CULTURE D'ORGANES DE PLANTULE ISSUE DE GERMINATION ASEPTIQUE

Photo 1 : Germination de graines de *Cichorium Intybus* L. à la lumière (a) et à l'obscurité (b). (durée 15 jours).

Le milieu de germination renferme la solution minérale de HELLER + (Fe - Na₂- EDTA) additionné de glucose 1 %.

Photo 2 : Culture de rosettes de feuilles après 30 jours sur un milieu de prolifération renfermant la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG additionnée d'ANA 10^{-5} M, de Kin 10^{-7} M, de 2,4-D 10^{-7} M, de vitamines, d'hydrolysate de caséine et de saccharose 1 %.

Photo 3 : Racine de plantule au moment de l'ensemencement (a) et après 30 jours de culture (b) sur un milieu de prolifération (MURASHIGE & SKOOG + ANA 10^{-5} M + Kin 10^{-7} M + 2,4-D 10^{-7} M + vitamines + hydrolysate de caséine + saccharose 1 %).



A

B

①



②



A

B

③

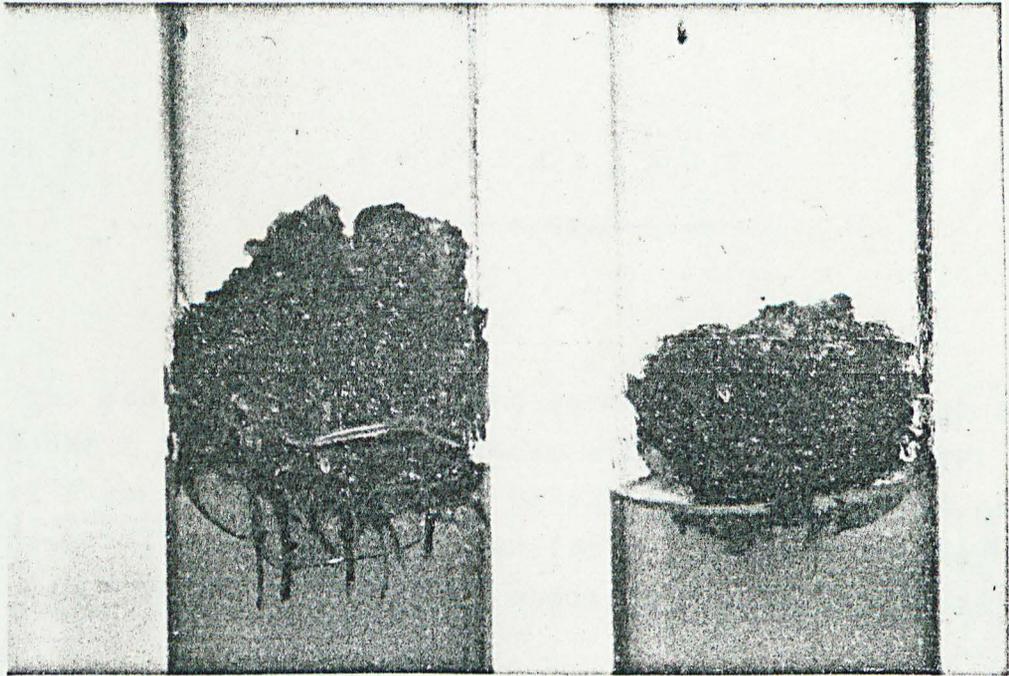
JHS
LILLIE

P L A N C H E V

TRANSFERT DES COLONIES TISSULAIRES SUR DES MILIEUX INDUCTEURS
DE BOURGEONS OU DE RACINES

Photo 1 : Les colonies tissulaires (b) transférées sur un milieu contenant la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG additionnée d'ANA 10^{-6} M, de Kin 10^{-7} M et de saccharose 1 % produisent après 30 jours de culture de nombreuses racines (a).

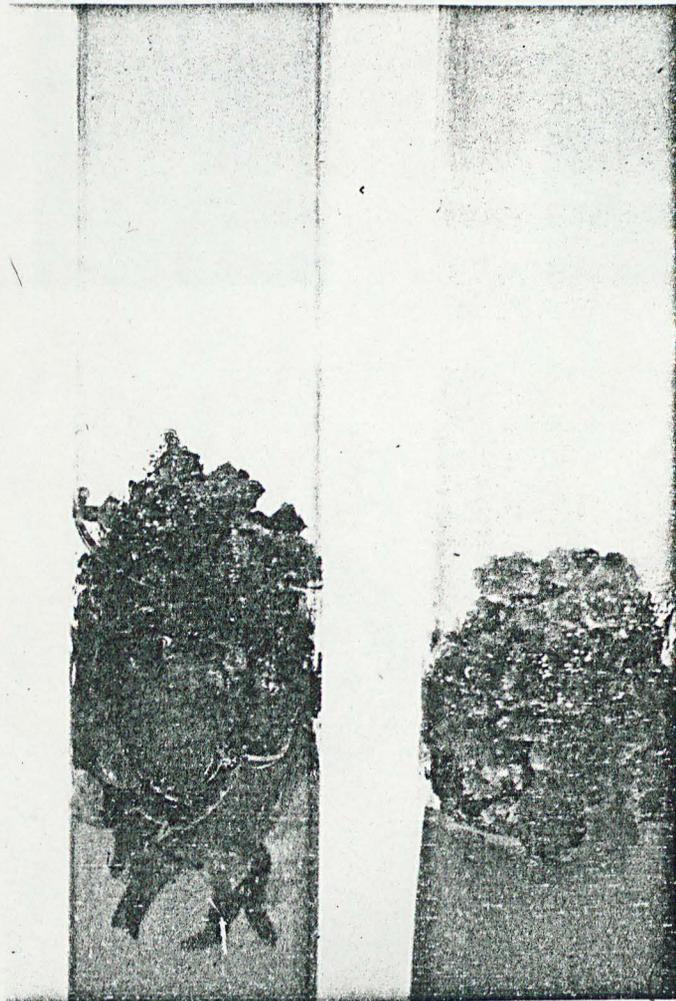
Photo 2 : Les colonies tissulaires (b) transférées sur un milieu contenant la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG additionnée de BAP 10^{-6} M et de saccharose 1 %, produisent après 30 jours de nombreux bourgeons (a).



A

B

①



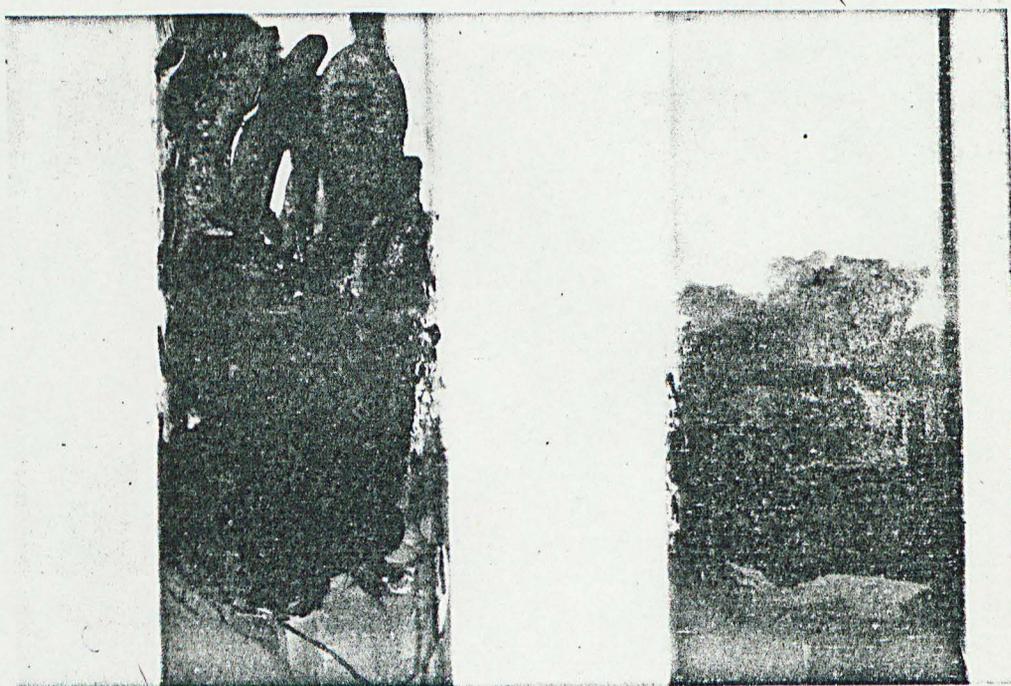
A

B

②

P L A N C H E V I

Apparition de racines à la base de bourgeons (b) repiqués sur un milieu contenant la solution minérale de MURASHIGE & SKOOG additionnée d'ANA 10^{-6} M, de Kin 10^{-7} M et de saccharose 1 %. Ces bourgeons proviennent des colonies tissulaires cultivées sur un milieu induisant leur apparition (MURASHIGE & SKOOG + BAP 10^{-6} M + saccharose 1 %).



①



RESUME

De petits explantats racinaires (6 mm de diamètre, 2 à 6 mm d'épaisseur) de *Cichorium Intybus* manifestent une grande sensibilité aux facteurs nutritifs et d'environnement. En culture *in vitro*, il est possible d'orienter à volonté ces tissus soit vers la callogénèse uniquement soit vers la formation de bourgeons ou de racines.

Si les bourgeons végétatifs se forment essentiellement, sans apport de substances particulières dans les milieux de culture, la production de racines n'est possible que si les explantats cultivés en présence de la solution minérale de HELLER, ont une taille suffisante (6mm d'épaisseur) et bénéficient d'un apport convenablement équilibré en glucide (glucose 1 %), auxine (ANA $10^{-6}M$) et cytokinine (Kin $10^{-7}M$). La lumière et l'acide gibbéréllique (AG_3 $10^{-5}M$) sont par ailleurs capables de promouvoir la formation de ces organes.

L'induction de la callogénèse sur des fragments de faible épaisseur (2 mm) est essentiellement conditionnée par la présence d'auxine à forte concentration (ANA $5.10^{-5}M$) associée à de la kinétine ($10^{-7}M$), à des vitamines et à de l'hydrolysate de caséine. Les glucides exogènes sont par contre toxiques. L'utilisation de la solution minérale de MURASHIGE et SKOOG privée de ses éléments azotés minéraux et enrichie en Ca^{++} et Zn^{++} permet d'améliorer l'intensité de la callogénèse.

Les cals primaires indifférenciés, transférés sur des milieux inducteurs peuvent produire à volonté des racines ou des bourgeons. De plus, par des transferts successifs sur des milieux adéquats, il a été possible d'obtenir une colonie tissulaire exempte de manifestation organogène. Cette colonie âgée d'un an, est encore capable de produire des organes végétatifs.

Ces résultats permettent maintenant de proposer ces petits explantats racinaires comme modèle dans l'analyse des processus de la différenciation organogène.

Mots clés : *Cichorium Intybus* Prolifération cellulaire - organogénèse - nutrition minérale et organique.