

N° d'ordre : 379

50376
1985
197

50376
1985
197

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le diplôme de

DOCTEUR - INGENIEUR

Biologie et Physiologie végétales

«Amélioration et transformation des productions végétales et microbiennes»

par

Falak MARIE-ALSABEK



CONTRIBUTION A L'ETUDE DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES EXCRETES PAR LES SUSPENSIONS CELLULAIRES

Soutenue en Novembre 1985 devant la Commission d'Examen

Président :

M. R. BOURIQUET

Professeur U.S.T.L.

Rapporteur :

M. J.C. DERIEUX

Professeur U.S.T.L.

Examineurs :

M. F. JACQUIN

Professeur à l'INP de Nancy

M. D. JOSEPH

Plandorcash

A MON MARI
A MAHER
A MES PARENTS .

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
HISTORIQUE	4
I - MILIEU DE CULTURE ET PAROI	4
II - COMPOSITION ET STRUCTURE DE LA PAROI CELLULAIRE	5
III - COMPOSITION DES POLYSACCHARIDES EXTRACELLULAIRES	11
IV - EVOLUTION DE LA PAROI AU COURS DE LA CROISSANCE CELLULAIRE	17
V - MILIEU DE CULTURE ET CROISSANCE	21
MATERIEL ET METHODES	24
I - CULTURE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES	24
1/ Origine du matériel biologique	24
2/ Méthode de culture	26
3/ Milieux nutritifs	26
II - APPRECIATION DE LA CROISSANCE	30
III - SEPARATION ET MESURE DES POLYSACCHARIDES EXTRACELLULAIRES	30
1/ Mesure des sucres totaux	30
2/ Isolement de la fraction polysaccharidique acide	31
3/ Mesure des acides uroniques	33
IV - DOSAGE DES GIBBERELLINES DU MILIEU DE CULTURE	34
1/ Extraction des gibbérellines	34
2/ Application sur chromatogrammes	35
3/ Test "laitue"	35
4/ Test "albumen d'orge"	36
V - CULTURE DES PLANTULES D'ENDIVE	38
1/ Aseptisation des graines d'endive	38
2/ Culture des plantules d'endive	38

RESULTATS	40
A - EXCRETION DE POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES AU COURS DE LA CULTURE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES	40
I - INTRODUCTION	40
II - ETUDE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE DE SILENE	42
III - ETUDE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE DE RONCE	46
B - EFFETS DES POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES LIBERES DANS LE MILIEU DE CULTURE SUR LA CROISSANCE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES.	51
I - EFFETS DES POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES LIBERES DANS LE MILIEU DE CULTURE DES CELLULES DE SILENE, RONCE ET TABAC SUR LA CROISSANCE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES.	51
1/ Effets des polysaccharides pectiques acides excrétés par la suspension cellulaire de Silène.	51
2/ Effets des polysaccharides pectiques acides excrétés par la suspension cellulaire de Ronce.	54
3/ Effets des polysaccharides pectiques acides excrétés par la suspension cellulaire de Tabac, sur la croissance cellulaire de Silène.	56
II - EFFETS DES POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES INTRODUITS DANS LE MILIEU A DIFFERENTS STADES DE LA CULTURE.	57
III - VARIATION DE L'ACTIVITE DE POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES DE SILENE SELON L'AGE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE.	60
C - ROLE PHYSIOLOGIQUE DES POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES EXTRACELLULAIRES SUR LA CROISSANCE CELLULAIRE.	64

D - PROPRIETES PHYSICOCHEMIQUES DES POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES EXTRACELLULAIRES.	68
I - LES VARIATIONS DES COURBES DE TITRAGES SELON L'AGE DE LA CULTURE	68
II - SEPARATION DES POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES DE SILENE, SUR GEL SEPHADEX G25	72
E - MODE D'ACTION DES POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES SUR LA CROISSANCE	77
I - EFFET DES POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES SUR LA CHELATION DU FER	81
1/ Effet des polysaccharides pectiques acides normaux sur la chélation de Fer.	81
2/ Effet des polysaccharides pectiques acides fractionnés sur gel sephadex G25 sur la chélation du Fer	83
3/ Effets des polysaccharides extracellulaires sur la croissance des racines des plants d'endive en absence de l'EDTA.	84
II - EFFET TAMPON DES POLYSACCHARIDES EXCRETES PAR LES CELLULES DE SILENE	85
III - ACTIVITE GIBBERELLINIQUE	90
1/ Mise en évidence de substances ayant une activité gibbère- linique excrétées dans le milieu de culture.	90
2/ Recherche d'une activité de type gibbèrellinique dans les polysaccharides extracellulaires, avant et après autoclavage.	94
3/ Effet des différentes fractions des PPA obtenues par solubi- lisation dans l'éthanol et l'acétate d'éthyle.	97

DISCUSSION	101
I - EXCRETION DES POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES DANS LE MILIEU DE CULTURE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES	101
II - EFFETS DES POLYSACCHARIDES EXTRACELLULAIRES SUR LA CROISSANCE CELLULAIRE	104
III - ROLE PHYSIOLOGIQUE ET MODE D'ACTION DES POLYSACCHARIDES EXTRA- CELLULAIRES DE SILENE	107
1/ Effet tampon des polysaccharides extracellulaires de Silène	107
2/ Effet chélateur des polysaccharides extracellulaires	108
3/ Effets de type gibbérellinique	109
CONCLUSIONS	111
BIBLIOGRAPHIE	113

Abréviations

PPA : polysaccharides pectiques acides.

AG₃ : Acide gibbérellique

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétraacétique

2,4-D : Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

A.U. : Acide uronique

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

La culture "in vitro" des tissus végétaux s'est imposée progressivement depuis un demi-siècle comme une méthode fondamentale en raison des résultats qu'elle a fournis dans divers domaines, notamment la nutrition minérale, la croissance et la division cellulaire, l'organogenèse et l'embryogenèse. Actuellement, les études s'orientent surtout dans le domaine génétique par utilisation des techniques de micropropagation et de sélection destinées au maintien des caractères phénotypiques intéressants avec les méthodes d'hybridation et de mutagenèse susceptibles d'ouvrir de nouvelles perspectives.

Parmi les différentes méthodes mises au point, la culture de suspensions cellulaires en milieu liquide a permis de réaliser certaines expérimentations impossibles sur la plante entière ; de plus, le potentiel de biosynthèse des cellules a été exploité pour la production de métabolites primaires et secondaires.

Parmi les très nombreux métabolites rejetés par les cellules cultivées en suspension dans un milieu liquide, ceux qui proviennent de la paroi ont été étudiés du point de vue biochimique et structural, en particulier les polysaccharides, parce que les auteurs les ont considérés comme des "images" partielles des parois, lesquelles sont impliquées dans différents aspects de la biologie de la cellule et de la plante.

Les études que nous avons effectuées concernent les propriétés biologiques des polysaccharides d'origine pariétale rejetés dans le milieu de culture par les cellules en suspension dans un milieu liquide (cellules de Silène, de Ronce et de Tabac).

Ce travail s'inscrit dans un programme qui vise à caractériser qualitativement et quantitativement les échanges entre les parois des cellules (au cours de la croissance) et le milieu extracellulaire.

L'étude approfondie des polysaccharides rejetés par les cellules en culture, en particulier l'étude de leur rôle et de leur mode d'action permettrait : i) d'améliorer l'équilibre des milieux de culture ; ii) de démontrer que les composés pariétaux interviennent dans la croissance des cellules ou des organismes qui les produisent ; iii) d'avoir au niveau de la plante entière une indication d'une part sur la concentration de ces métabolites dans la phase soluble de la matrice de la paroi cellulaire, et d'autre part, sur le rôle de ces métabolites lors de la croissance.

Avant de présenter les résultats sur la libération des polysaccharides d'origine pariétale dans le milieu de culture des suspensions cellulaires de Silène, de Ronce, et de Tabac et leur rôle sur la croissance, il convient de situer ce travail par rapport aux études qui ont déjà été réalisées dans des conditions similaires et de réunir les renseignements importants que révèle la bibliographie sur ce sujet.

La revue historique comprendra donc, sous forme résumée, un rappel des connaissances concernant l'évolution de la paroi primaire au cours de la croissance, son ultrastructure et sa composition chimique. Des précisions seront ensuite apportées à propos des constituants pariétaux qui sont libérés

dans le milieu au cours de la culture. Enfin des considérations sur l'importance de la maîtrise de ce milieu de culture pour la réussite des expérimentations, conclueront cette brève étude bibliographique.

HISTORIQUE

I - MILIEU DE CULTURE ET PAROI.

En 1966, STREET a signalé la présence de métabolites organiques et d'enzymes dans le milieu de culture d'une suspension cellulaire d'Erable (Acer pseudoplatanus. L) ; par la suite, des composés pectiques et des protéines ont été caractérisés dans le milieu de culture de suspension cellulaire de Nicotiana tabacum.L (DEJONG et al., 1968 ; OLSON et al., 1969). Ces auteurs ont montré une relation entre ces polymères et la paroi primaire de la cellule végétale.

Un changement de l'activité enzymatique a aussi été remarqué dans le milieu de culture : dans un premier temps l' α -amylase (JASPERS et VELDSTRA, 1965) puis la phosphatase et l'IAA oxydase (GAMBORG et EVELEIGH, 1968, et ensuite les peroxydases (OLSON et al., 1969 ; LEGRAND et DUBOIS, 1977).

Depuis, de nombreux travaux, concernant ces polymères secrétés dans le milieu de culture par des suspensions cellulaires d'Acer pseudoplatanus.L (BECKER et al., 1964 ; ASPINALL et al., 1969 ; SIMPKINS et STREET, 1970) ont permis, grâce à un contrôle strict des méthodes de culture, la mise en évidence d'une part de la relation existant entre la croissance des cellules, les synthèses spécifiques intervenant dans les parois et d'autre part la libération de composés polysaccharidiques dans le milieu de culture. Ces derniers sont considérés comme de véritables précurseurs de la paroi qui peuvent être extraits et étudiés sans que la structure de la cellule soit endommagée. De plus, leur analyse donne une indication sur leur concentration dans la phase soluble de la matrice pariétale. Ils ne proviennent d'ailleurs pas de la lyse des parois des cellules les plus âgées ou des cellules mortes car ils apparaissent dès les premiers jours de la culture (MARETZKI et al. 1974).

TAKEUCHI et KOMAMINE (1980 a), en utilisant une technique radioactive ont trouvé qu'il se produit un échange entre la paroi et les fractions polysaccharidiques solubles du milieu.

II - COMPOSITION ET STRUCTURE DE LA PAROI CELLULAIRE.

Les parois primaires des cellules des plantes supérieures comportent un squelette de fibrilles cellulcsiques enrobé par une matrice amorphe de polysaccharides pectiques et hemicellulosiques associés à une protéine de structure (LAMPORT, 1965 ; ASPINALL, 1970 ; TALMADGE et al., 1973 ; DARVILL et al.;1980, CHAMBAT et al., 1984).

La nature chimique et les propriétés mécaniques des parois ont été définies et interprétées ainsi que les modifications intervenant lors de la croissance et de la différenciation pariétales (KAMIYA et al., 1962, FERRIER et DAINTY, 1977 ; KATO et NOGUCHI, 1976 ; TAKEUCHI et KOMAMINE, 1978 ; NISHITANI et MASUDA, 1979 ; ASAMIZU et al., 1984).

La cellulose, l'hémicellulose, les pectines et les protéines riches en hydroxyproline, sont les principaux constituants de la paroi primaire. La nature et l'architecture pariétales sont comparables chez les dicotylédones et les monocotylédones étudiées (ALBERSHEIM et al., 1976).

La cellulose : elle constitue une partie importante des parois primaires de toutes les plantes supérieures, sa structure a été établie par WILSON (1964) et par KEEGSTRA et al. (1973). Elle comprend un enchaînement linéaire de résidus glucopyranosyls susceptibles de se lier par des liaisons hydrogène aux xyloglucanes qui constituent une des fractions hémicellulosiques.

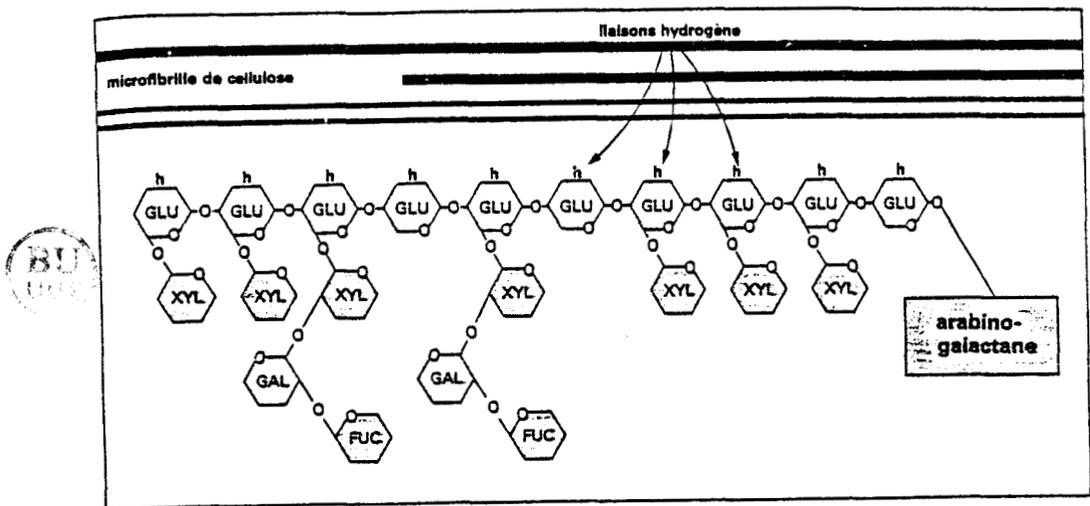


Figure 1 - Aspect structural d'un xyloglucane. Glu, glucose ; Xyl, Xylose ; Gal, galactose ; Fuc, fucose.

Les hémicelluloses : Les parois primaires renferment une fraction hémicellulosique comprenant deux hémicelluloses distinctes ; une xyloglucane et une glucuronoarabinoxylane. La présence de ces deux hémicelluloses a été décrite chez les dicotylédones et les monocotylédones (DARVILL et al., 1980). Par ailleurs, la présence de xyloglucane dans les cellules en suspension a été rapportée par de nombreux auteurs (ASPINALL et al., 1969 ; BARNOUD et al., 1977). En ce qui concerne la nature biochimique des xyloglucanes, il a été montré que le D-glucose (D-glc) et le D-xylose (D-xyl) constituent une partie dominante alors que le D-galactose (D-gal), la L-Fucose (L-fuc) et le L-arabinose (L. ara) ont été trouvés en petite quantité (BARNOUD et al., 1977 ; JOSELEAU et CHAMBAT, 1984) Figure 1.

Les xyloglucanes sont liés par des liaisons hydrogène avec la cellulose ou avec d'autres xyloglucanes (TALMADGE et al., 1973 ; BAUER et al., 1973 ; CHAMBAT et al., 1984) d'autre part les xyloglucanes sont liées par covalence aux polysaccharides pectiques par l'intermédiaire de ponts glucosidiques (BAUER et al., 1973). Quant à la glucuronoarabinoxylane, elle comporte en majorité des xylanes, arabinanes et des acides glucuroniques (ASPINALL et GREENWOOD, 1962 ; WILKIE et WOO, 1977 ; DARVILL et al., 1980).

On admet que cette fraction polysaccharidique, formant des liaisons hydrogène avec la cellulose (BAUER et al., 1973), constitue un polysaccharide de structure (DARVILL et al., 1980) mais aucune autre fonction ne lui a encore été attribuée.

Les polysaccharides pectiques. Ce sont des polymères acides et neutres. La fraction acide consiste en une chaîne d'acides galacturoniques (Gal - UA) liés en α -1,4 dans laquelle s'intercalent des résidus rhamnosyl

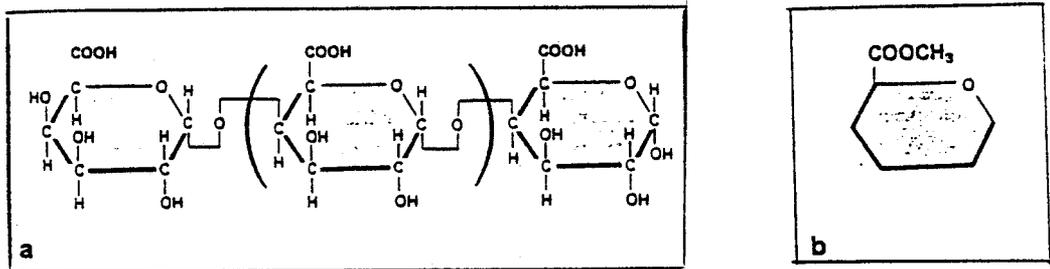


Figure 2 - Aspect structural de l'acide polyuronique (pectines).

a : chaîne d'unités acides galacturoniques.

b : fonction acide estérifiée par un groupement méthyle.

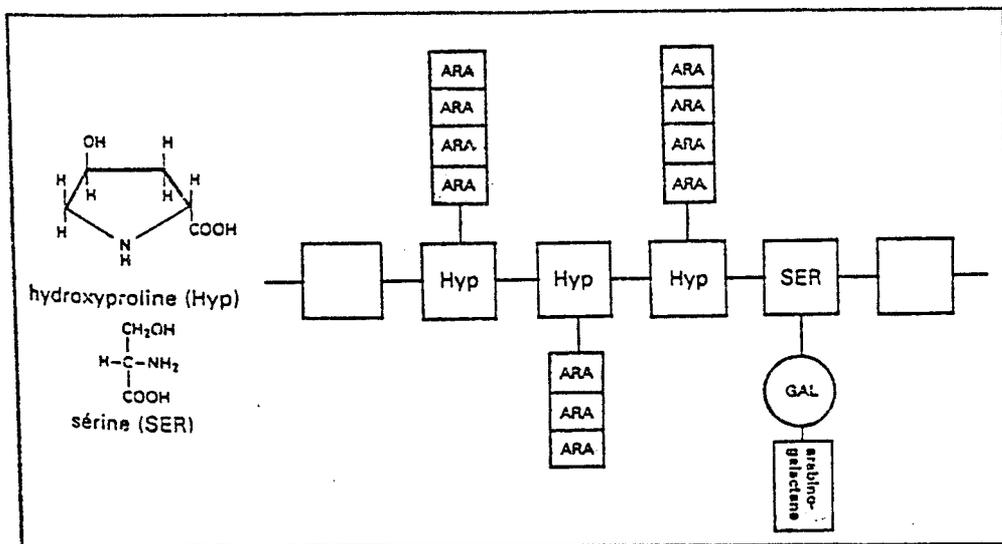


Figure 3 - Représentation schématique de l'extensine séquence d'acides aminés avec deux types de glycosylation, sérine et galactose (SER - GAL) et hydroxyproline arabinose (Hyp - ARA), d'après LAMPORT (1965).

(figure . 2), certains des groupements carboxyliques des résidus galacturoniques acides sont méthyl-esterifiés (TALMADGE et al., 1973 ; ASPINALL et al., 1969, McNEIL et al., 1979). A cette chaîne rhamnogalacturonique sont souvent liés soit une arabinane soit une galactane (ASPINALL, 1970).

Ces polysaccharides pectiques comportent deux types de chaînes galacturoniques (Mc NEIL et al., 1980), le rhamnogalacturonane I et le rhamnogalacturonane II. La première fraction comporte une chaîne riche en acide D-galacturonique (D-gal-UA) et en L-rhamnose (L-rha), et une chaîne riche en (L-ara) et (D-gal). Cette donnée structurale est en accord avec ASPINALL et al. (1968), TALMADGE et al. (1973), SIDDIQUI et WOOD (1976).

Le second composant pectique des parois cellulaires est le rhamno galacturonane II constitué de sept monosaccharides différents dont les sucres (DARVILL et al., 1978, SPELLMAN et al., 1983) sont associés par des liaisons glycosidiques.

Les glycoprotéines : LAMPORT (1965) a montré l'existence d'une protéine à hydroxyproline dans la paroi cellulaire des tissus végétaux en culture. Depuis, de nombreux chercheurs ont confirmé la présence de protéines dans les parois d'une gamme étendue de végétaux, qu'il s'agisse aussi bien de cellules en culture que d'organes divers de Mono et de Dicotylédone (OLSON, 1971 ; LAMPORT et MILLER, 1971 ; CHRISPEELS, 1976 ; TALMADGE et al., 1973 ; KEEGSTRA et al., 1973).

La teneur des parois en protéines varie de 2 à 10 % environ, notamment au cours de l'élongation. Les parois primaires sont généralement plus riches en protéines que les parois secondaires. La molécule représentée sur la figure 3 est appelée

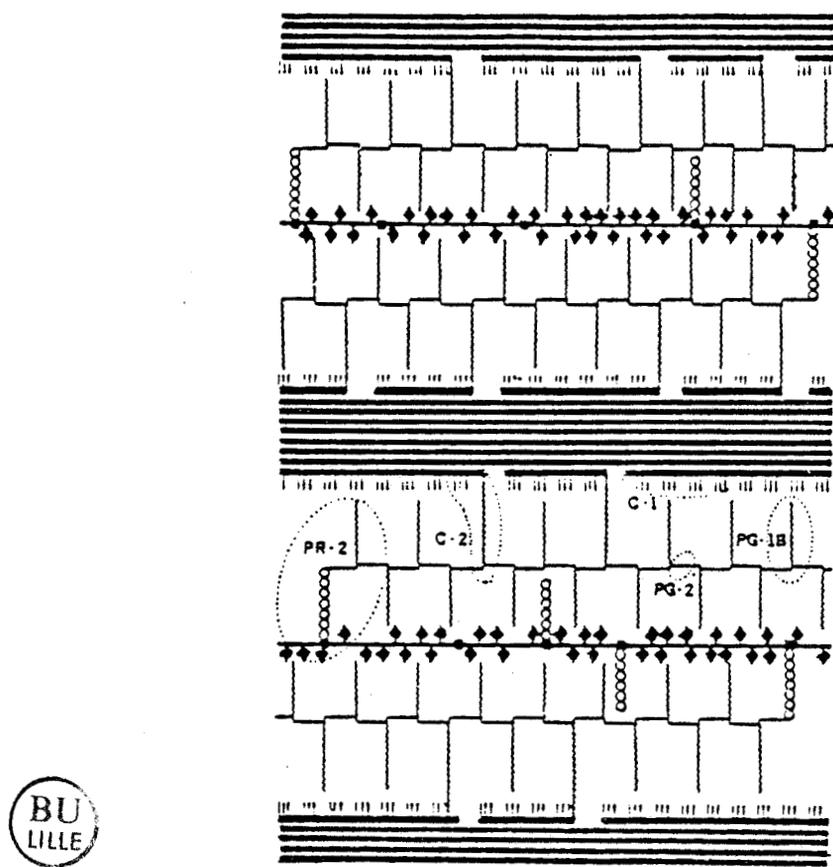
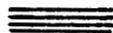
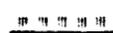
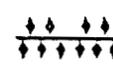
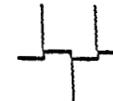
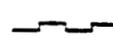
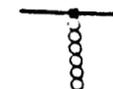


Figure 4 :

Modèle qualitatif de la structure pariétale des cellules d'Erable (d'après KEEGSTA et coll., 1973).

-  Fibrilles élémentaires de cellulose
-  Xyloglucanes
-  Protéines pariétales (les tetraholosides sont attachés sur les résidus d'hydroxyproline)
-  Polysaccharides pectiques
-  Rhamnogalacturonanes des chaînes pectiques
-  Arabinanes et 4-galactanes branchés sur les chaînes pectiques
-  3,6-arabinogalactanes attachés à la sérine des protéines pariétales
-  Résidus séril non substitués des protéines pariétales

l'extensine (LAMPART, 1965). Ce nom lui a été donné pour souligner le rôle joué par cette glycoprotéine dans l'allongement cellulaire (ESQUERRE et MAZAU, 1981). Selon les schémas qui représentent habituellement la paroi cellulaire, ces glycoprotéines se trouvent au voisinage des polysaccharides pectiques sans qu'il soit possible d'apprécier le processus physiologique dans lequel elles sont impliquées.

A la suite de ces travaux, il a toutefois été possible d'établir plusieurs modèles de l'architecture moléculaire de la paroi primaire (BAUER et al., 1973; BURKE et al., 1974; KEEGSTRRA et al., 1973 ; Mc NEIL et al., 1980 ; WILDER et ALBERSHEIM, 1973).

Les figures 4 et 5 représentent deux des modèles proposés par l'équipe d'ALBERSHEIM.

III - COMPOSITION DES POLYSACCHARIDES EXTRACELLULAIRES.

Les suspensions cellulaires établies à partir de tissus végétaux possèdent essentiellement une paroi primaire dont la composition globale est identique, quelque soit l'origine du matériel (BECKER et al., 1964 ; NEVINS et al., 1967 ; BAUER et al., 1973 ; KEEGSTRRA et al., 1973 ; TALMADGE et al., 1973 ; KATO et NOGUCHI, 1976). Ces suspensions cellulaires libèrent activement dans le milieu de culture des complexes macromoléculaires riches en polysaccharides. Leur analyse structurale et biochimique a montré que trois types de polysaccharides pouvaient être isolés et caractérisés dans le milieu de culture des suspensions cellulaires d'Acer pseudoplatanus (ASPINALL et al., 1969, OLSON et al.,

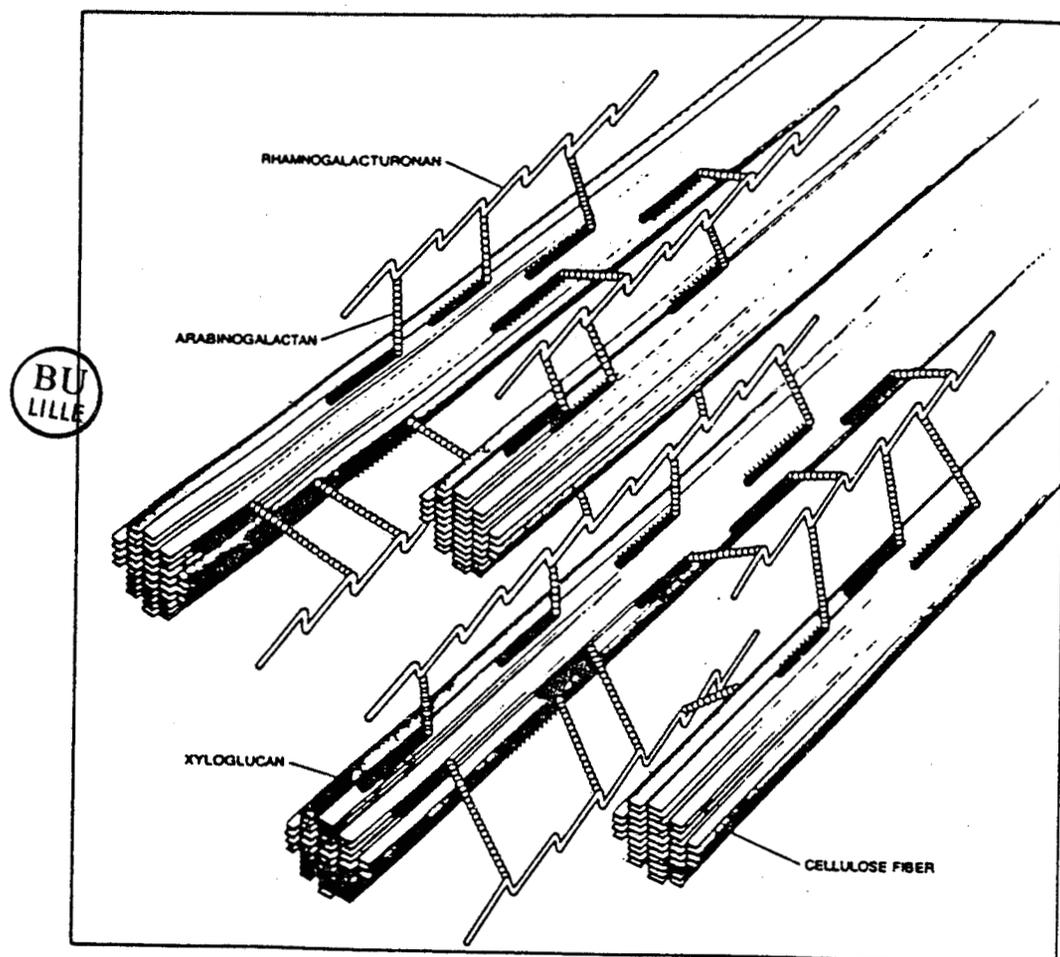


Figure 5:

Structure schématique de la paroi primaire montrant les inter-connections entre les différents types de polysaccharides. (ALBERSHEIM et al., 1976).

1969 ; BECKER et al., 1964 ; WILDER et ALBERSHIEME, 1973). Deux d'entre eux sont composés des sucres neutres (arabinogalactanes et fucoxyloglucanes) et le troisième a des propriétés acides. Il est assimilé à un acide pectique comprenant 67 % d'acide galacturonique dont 30 % est sous forme méthylée. La composition moléculaire des polysaccharides extracellulaires a été étudiée à partir d'Acer pseudoplatanus L (BAUER et al., 1973) Nicotiana tabacum (OLSON et al., 1969 ; KATO et NOGUCHI, 1976) Vinca rosea (TAKEUCHI et KOMAMINE, 1978) et Rosa glauca (BARNOUD et al., 1977). Les acides uroniques représentent 5 à 25 % de ces polysaccharides où les groupes carboxyles sont soit méthylés, soit complexés par du calcium. Les sucres neutres comprennent principalement du glucose, du mannose, de l'arabinose, du galactose et du xylose en proportions variables ; la fraction pectique varie de 6 à 18 % (OLSON et al., 1969), la quantité et la composition des polysaccharides extracellulaires changent considérablement avec l'âge de la culture comme l'ont mentionné TAKEUCHI et KOMAMINE (1978), MANTE et BOLL (1976) et MORVAN (1982). Les protéines et l'acide galacturonique passent de 1 et 4 % au début, puis à 14 et 24 % à la fin de la culture ; dans le même temps la quantité de glucose décroît de 40 à 10 % tandis que le galactose, le mannose, le xylose et l'arabinose augmentent. Ces variations de la composition des polysaccharides extracellulaires sont d'ailleurs parallèles à celles qui interviennent dans la paroi (OLSON et al., 1969) ; de la même façon TAKEUCHI et KOMAMINE (1978) montrent que toute augmentation des acides uroniques s'accompagne d'une augmentation d'arabinose et de galactose et d'une diminution de glucose et de xylose et que la synthèse de ces composés secrétés dans le milieu de culture est plus active pendant la phase de division que pendant la phase de grandissement cellulaire. Toutes ces variations de composition des polymères sont le

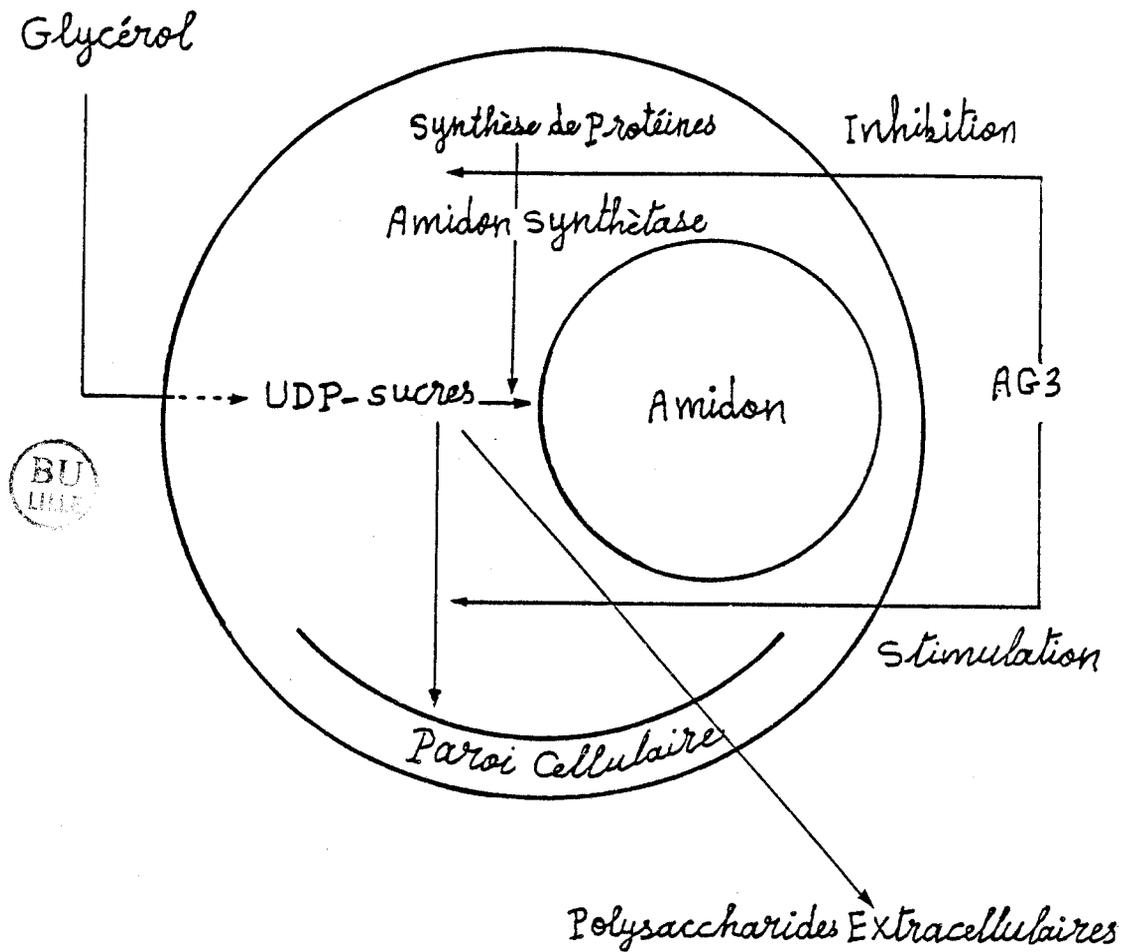


Figure 6 :

Représentation schématique de la régulation de la synthèse des polysaccharides extracellulaires et de l'amidon par AG₃, D'après SASAKI et KAINUMA (1984).

reflet de profondes modifications biochimiques et morphologiques intervenant dans les cellules au cours de leur croissance.

Les travaux de MOORE (1973) montrent que la quantité et la nature des polysaccharides extracellulaires dépendent de la composition du milieu de culture et en particulier des régulateurs de croissance utilisés. Ceci est confirmé par MANTE et BOLL (1978) qui montrent que l'addition de 2,4-D dans le milieu de culture d'une suspension cellulaire de Phaseolus vulgaris augmente la croissance mais aussi la sécrétion de composés pectiques acides et de polysaccharides neutres. De la même façon, FRY (1980), FRY et STREET (1980), MORVAN (1982) et SASAKI et KAINUMA (1984) ont signalé l'action stimulante de l'acide gibbéréllique sur la croissance et sur la sécrétion des polysaccharides (figure 6). Ces auteurs ont suggéré que l'acide gibbéréllique régle la synthèse des polymères en même temps qu'il intervient sur le grandissement cellulaire (HENGELSON et UPPER, 1970 ; FRY et STREET, 1980 ; BRASSART et al., 1982), ce qui permet de relier les deux phénomènes (MORVAN, 1982, TAKEUCHI et KOMAMINE, 1980a). On admet donc que les modifications de la composition de la fraction soluble du milieu extracellulaire sont une particularité d'un processus d'élongation cellulaire. Tandis que OLSON (1971) estime que l'environnement artificiel qui entoure les cellules cultivées en suspensions cellulaires provoque des modifications importantes. Les pectines qui sont constituées essentiellement par des polysaccharides acides localisés à la périphérie de la paroi et jouent un rôle important dans la jonction des cellules. La libération de ces composés dans le milieu de culture pourrait être due au fait qu'à la suite des divisions, les cellules ont tendance à se séparer et à rejeter

ces polysaccharides.

Les mucilages d'origine racinaire sont d'autres polymères polysaccharidiques secrétés dans le milieu extérieur. Cette sorte de sécrétion est un phénomène général et contribue à la formation d'un mucigel qui peut être observé dans des conditions naturelles ou artificielles (CHABOUD et ROUGIER, 1981 ; HALL et al., 1966 ; HARRIS et NORTHCOTE, 1970 ; JONES et MORRE, 1973 ; MIKI et al., 1980 ; PAULL et JONES, 1975). Ces sécrétions mucilagineuses comprennent essentiellement des composés polysaccharidiques de poids moléculaire élevé (LEPPARD et RAMAMOORTHY, 1975 ; MORRE et al., 1967 ; HARRIS et NORTHCOTE, 1970 ; JONES et MORRE, 1973). A la suite de ces travaux, on a aussi trouvé des polymères acides et des protéines (WRIGHT et NORTHCOTE, 1974 ; 1975 ; CHABOUD, 1983 ; LEPPARD, 1974). Ces sécrétions sont produites au moment de l'exfoliation des cellules de la coiffe racinaire (ROUGIER, 1981), elles sont identiques à celles que l'on trouve dans la paroi primaire des cellules cultivées en suspension (CHABOUD, 1983), ce qui confirme leur origine pariétale.

La présence de mucilage au niveau de la zone d'élongation a conduit de nombreux auteurs à envisager que ces sécrétions avaient une action dans la nutrition de la plante (LEPPART et RAMAMOORTHY, 1975). En effet, une étude par microanalyse couplée à la microscopie électronique à balayage (TAN et NOPAMORNBODY, 1979) a permis de suivre leurs mouvements et leur distribution dans la zone rhizosphérique du sol et dans les tissus de la plante. Les éléments nutritifs s'accumulent dans le mucilage en les chélatant, ou en les complexant.

Actuellement le rôle exact et le mode d'action de ces polysaccharides sur la croissance de cellules ne sont pas encore bien connus.

IV - EVOLUTION DE LA PAROI AU COURS DE LA CROISSANCE CELLULAIRE.

Les propriétés mécaniques de la paroi des cellules en relation avec les taux de croissance ainsi que l'action de différents facteurs tels que les hormones et la pression osmotique, ont été l'objet d'études par de nombreux auteurs (FERRIER et DAINTY, 1977 ; KAMIYA et al., 1962 ; METRAUX et al., 1980 ; VINTERS et al., 1977 ; BATES et RAY, 1981).

En effet, le relâchement de la paroi cellulaire peut s'expliquer par un mécanisme moléculaire qui consiste en une rupture des liaisons hydrogène entre la cellulose et les xyloglucanes (KEEGSTRA et al., 1973). Cette hypothèse est renforcée par les études de LABAVITCH et RAY (1974) ; ces auteurs suggèrent que le traitement par l'auxine entraîne la transformation des xyloglucanes pariétaux (d'une forme insoluble à une forme soluble dans l'eau), conduisant à leur séparation de la cellulose et favorisant ainsi le glissement des microfibrilles dont la présence est indispensable à l'élongation. Cet effet est probablement lié à une rupture des liaisons H^+ entre les xyloglucanes et la cellulose (LABAVITCH et RAY, 1974).

La dégradation des β -glucanes non cellulosiques est également en corrélation avec l'auxine qui induit l'élongation cellulaire (SAKURAI et MASUDA, 1977). Par ailleurs, (NISHITANI et MASUDA, 1980)

l'arabinogalactane est responsable des propriétés mécaniques de la paroi des cellules de Tabac. Cependant, selon LAMPORT (1965) le contrôle de l'extensibilité de la paroi cellulaire serait lié à l'existence d'une glycoprotéine (extensine) riche en hydroxyproline, en arabinose et en galactose au niveau de la paroi primaire de la cellule végétale.

Ainsi, les auteurs tendent à lier la croissance cellulaire à des variations de la composition de la paroi (sucres ou protéines). HAGER et al. (1971), CLELAND (1971) mentionnent que l'auxine stimule une pompe à protons dans la membrane plasmique et provoque ainsi une acidification de la paroi cellulaire. La diminution du pH au niveau de la paroi active alors une "enzyme" qui se trouve ainsi à son pH optimal ; l'activité de cette enzyme provoquerait la rupture des liaisons polysaccharidiques et par conséquent l'extensibilité et l'élongation de la paroi cellulaire.

Cette hypothèse a été confirmée par JACOBS et RAY (1975), DREYER et al. (1981), EVANS et VESPER (1980) ainsi que par TERRY et JONES (1981) qui ont étudié les effets de l'auxine et de l'acide sur la croissance ; ces auteurs ont montré que ces effets sont inhibés à basse température, ce qui a confirmé l'effet enzymatique. Par ailleurs, BUCKHOUT et al. (1981) montrent que l'auxine provoque l'excrétion d'ions bivalents par la paroi cellulaire, et que cette excrétion est accompagnée d'une diminution du nombre de sites d'association (par le calcium) des polysaccharides membranaires.

L'ensemble de ces résultats montre l'importance de la paroi cellulaire comme cible pour les hormones qui stimulent l'extension cellulaire.

Ainsi il y a une corrélation entre la croissance et le relâchement pariétal des cellules traitées par l'acide gibbéréllique (STUART et JONES, 1977; KATSU et KAMISKA, 1983). En effet, FRY (1980) mentionne 4 modes possibles d'action de la gibbérélline sur le relâchement pariétal : 1/ la sécrétion de polymères polysaccharidiques qui favoriserait le relâchement, 2/ l'inhibition des autres polymères structuraux (protéine riche en hydroxyproline) qui entrainerait la rigidité de la paroi, 3/ l'activation d'une enzyme qui provoquerait la lyse de la paroi (par exemple la glucanase), 4/ l'inhibition de la sécrétion des peroxydases qui rendrait les parois plus rigides. L'étude de la paroi cellulaire durant la croissance (STODDART et NORTHCOTE, 1967 ; ASAMIZU et al., 1984) permet chez l'Erable de distinguer deux types d'acides dans la fraction pectique des parois. Au début de la culture, ces auteurs mentionnent la présence d'un acide "faible" contenant une forte proportion de sucres neutres (arabinose et galactose), puis en fin de culture, un acide "fort" où les sucres neutres sont à l'état de trace. Les variations de la transformation de l'acidité de la paroi au cours de la croissance, (figure 7) suggèrent son rôle important dans le déroulement de la croissance cellulaire.

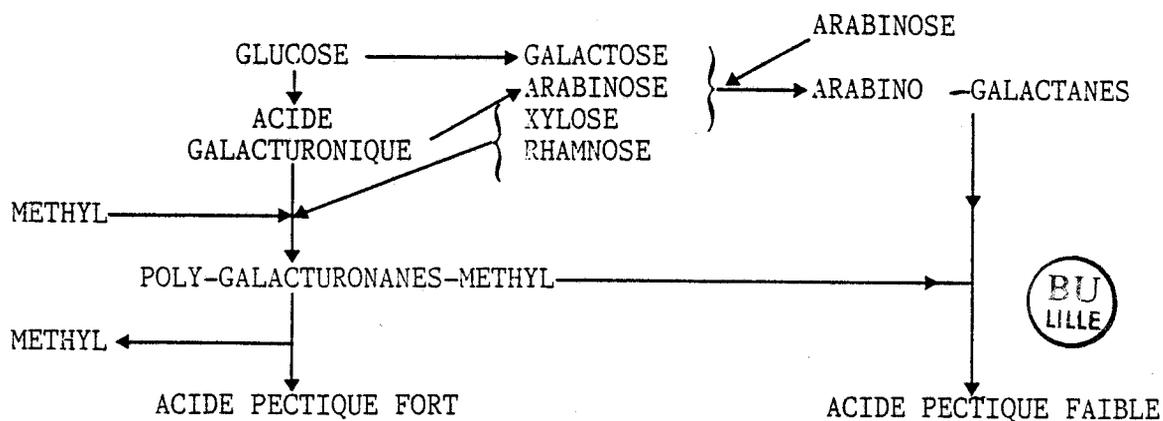


Figure 7 : Relations entre les différentes fractions isolées des substances pectiques des parois d'Erable d'après STODDART et NORTHCOTE (1967).

Par ailleurs, deux phases ont été mises en évidence sur les courbes de titrage de la paroi des cellules de Lemna minor.L récoltées en phase exponentielle de croissance (MORVAN, 1977). A l'inverse, les courbes de titrage des parois issues de cellules en phase stationnaire ne font apparaître qu'une seule phase (BIGOT et BINET, 1984) ; ce qui permet de considérer que les transports ioniques vers les cellules seraient facilités par les gradients de pH pariétaux.

La variation très complexe de la composition des polysaccharides pariétaux, au cours de la croissance, reflète les fonctions polyvalentes de ces substances. Ainsi, chacun des composants pariétaux semble intervenir.

Cependant, les composés libérés dans le milieu extracellulaire ont les mêmes caractères que ceux de la paroi cellulaire, et sont donc susceptibles de modifier les paramètres et les propriétés du milieu.

V - MILIEU DE CULTURE ET CROISSANCE.

Dès qu'ils ont obtenu des cellules séparées à partir de cals friables, certains auteurs ont tenté de les cultiver mais sans succès ; les milieux de culture qui permettaient la croissance des cals dont les cellules étaient issues, ne convenaient pas. En 1937, GAUTHERET, étudiant l'action de la racine sur la survie des cellules de coiffe, s'aperçut que la durée de vie de ces cellules était considérablement augmentée lorsqu'un fragment de racine était maintenu dans le milieu.

MUIR et al. (1958) ont obtenu pour la première fois la prolifération de cellules isolées en utilisant un support de papier à filtre maintenu au contact d'un tissu nourricier, puis ces chercheurs ont fait appel à des colonies tissulaires nourrices : les cellules se trouvaient donc au contact des exsudats du cal ayant préalablement proliféré.

Enfin, JONES et al. (1960) ont eu l'idée de mettre en culture des cellules isolées dans un milieu où avaient déjà poussé des colonies tissulaires que l'on appelle "milieu conditionné".

En 1964, BLACKELY et STEWARD ont montré que, dans des cultures cellulaires, le pourcentage de colonies tissulaires dépendrait de la con-

centration initiale des cellules, ce qui était une forme de conditionnement. Les travaux ultérieurs de STREET (1966) montrent que les cellules cultivées en suspension secrètent des métabolites et des enzymes dans le milieu de culture ; ces sécrétions entraînent le conditionnement du milieu par activation de la croissance. De ce fait, elles sont souvent considérées comme des facteurs essentiels au passage des cellules de la phase stationnaire à des cellules capables de se diviser en phase exponentielle.

Les composés organiques émis dans le milieu de culture par les tissus végétaux ont un rôle important dans le maintien de la concentration de fer en solution, (HELLER et RICHEZ, 1959 ; HELLER et al., 1968) ; en effet l'alimentation en fer est difficile aux pH élevés (la précipitation de fer a lieu à pH 5,2 en l'absence de chélateur). L'analyse du phénomène de conditionnement montre que des substances non spécifiques (obtenues avec des espèces différentes) que diffusent des cals nourrices, sont responsables du conditionnement du milieu de culture (BENBADIS, 1965, 1968 ; LUTZ, 1966).

L'analyse biochimique des milieux conditionnés (STUART et STREET, 1969, 1971) montre la présence d'acides aminés et des composés volatiles ; ces acides aminés additionnés à l'acide gibbérellique à la concentration de $0,25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ et à pH 6,4 permet de réduire la concentration de l'inoculum cellulaire.

Le problème posé par le milieu de culture a pu être résolu par GLEBA (1978), qui a pu faire se développer un seul protoplaste dans un milieu normal.

Par ailleurs, MORVAN (1982), en étudiant la suspension cellulaire de Silène, obtient un effet stimulant sur la croissance en introduisant dans le milieu de culture des polymères pectiques acides extraits d'un milieu conditionné, par une suspension cellulaire de Silène.

Très récemment, YORK et al. (1984) isolent à partir du milieu de culture d'une suspension cellulaire (d'Acer pseudoplatanus L.) une fraction polysaccharidique extracellulaire (xyloglucane) qui a un effet inhibiteur sur la croissance cellulaire.

Bien que les propriétés biologiques de composés libérés par les cellules en culture, dans un milieu liquide, soient encore mal connues, nous avons voulu déterminer les effets des composés pectiques acides libérés par les cellules de Silène, de Ronce ou de Tabac et rechercher le mode d'action des composés impliqués dans l'activation de la croissance.

I - CULTURE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES.

1. Origine du matériel biologique.

Les trois souches de suspensions cellulaires que nous avons utilisées sont entretenues au laboratoire depuis plusieurs années.

La suspension cellulaire de Silène (Silene alba (Miller) E.H.L. Krause) a été isolée par DUBOIS et la méthode de culture décrite avec précision (DUBOIS et BOURIQUET, 1974).

La souche de Ronce (Rubus fruticosus L.) est cultivée sous forme de colonie tissulaire sur le milieu minéral de HELLER (1953) gélosé et additionné de glucose (20 g.l^{-1}) et de chlorhydrate de thiamine (10^{-3} g.l^{-1}). Pour isoler la suspension cellulaire on dilacère une ou deux colonies tissulaires au moyen de pinces stériles, les fragments sont introduits dans une fiole contenant le milieu de culture liquide. Après deux semaines, la suspension est très hétérogène et il convient de séparer les agrégats obtenus sur un tamis stérile. 100 ml du filtrat obtenu sont introduits dans une fiole contenant une quantité égale de milieu neuf. Les repiquages ultérieurs destinés à l'entretien de la souche sont réalisés tous les trente jours en transférant 20 ml de suspension dans des fioles contenant chacune 200 ml de milieu neuf.

COMPOSITION DU MILIEU		CONCENTRATION (g/l)
Nitrate de calcium	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$290 \cdot 10^{-3}$
Chlorure de potassium	KCL	$65 \cdot 10^{-3}$
Nitrate de potassium	KNO_3	$1960 \cdot 10^{-3}$
Sulfate de magnésium	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$360 \cdot 10^{-3}$
Phosphate monopotassique	KPO_4H_2	$500 \cdot 10^{-3}$
Phosphate disodique	$\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H} \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	$97 \cdot 10^{-3}$
Sulfate de fer	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$2,785 \cdot 10^{-3}$
Acide borique	H_3BO_3	$1,50 \cdot 10^{-3}$
Iodure de potassium	KI	$0,75 \cdot 10^{-3}$
Sulfate de manganèse	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$4,50 \cdot 10^{-3}$
Sulfate de zinc	ZnSO_4	$1,50 \cdot 10^{-3}$
Saccharose		20
Thiamine, HCL	Vitamine B ₁	$1 \cdot 10^{-3}$
Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique	2,4-D	$1 \cdot 10^{-3}$

Tableau 1 : Composition du milieu de culture des suspensions cellulaires de Silène.
Solution de LAMPORT modifiée par LESCURE (1966)

Les cellules de Tabac sont également obtenues par dissociation des colonies tissulaires entretenues au laboratoire sur milieu gélosé.

2. Méthode de culture

La culture des suspensions cellulaires est réalisée dans des fioles de 500 ml contenant 200 ml de milieu non renouvelé (batch culture).

Afin d'éviter les risques d'interférence, les cellules sont séparées du milieu de culture par filtration sur un entonnoir de Büchner garni d'un papier filtre, les cellules sont prélevées à l'aide d'une cuillère en verre pyrex et introduites dans les fioles à ensemercer à raison de deux cuillerées par fiole soit $3 \pm 0,2$ g. Les fioles sont alors placées inclinées à 45° sur un agitateur rotatif tournant à la vitesse de 70 tours par minute, en lumière continue (1000 lux au niveau des fioles) et sont maintenues à la température de $21 \pm 1^\circ\text{C}$.

3. Milieus nutritifs

Les solutions minérales utilisées sont celle de LESCURE (1966) pour les cellules de Silène, celle de HELLER (1953) pour les cellules de Ronce et celle de MURASHIGE et SKOOG (1962) pour les cellules de Tabac. Nous avons ajouté 20 g.l^{-1} de saccharose, 10^{-3} g.l^{-1} de chlorhydrate de thiamine ainsi que d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique aux deux premières et 10 g.l^{-1} de saccharose, $0,4 \text{ mg.l}^{-1}$ de Thiamine, $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ de 2,4-D à la troisième solution (Tableaux 1, 2, 3)

COMPOSITION DU MILIEU		CONCENTRATION (g/l)
Chlorure de calcium	$\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	75.10^{-3}
Chlorure de potassium	KCL	750.10^{-3}
Nitrate de sodium	NaNO_3	600.10^{-3}
Sulfate de magnésium	$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	250.10^{-3}
Phosphate monosodique	$\text{NaPO}_4\text{H}_2, \text{H}_2\text{O}$	125.10^{-3}
Chlorure de fer	$\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$	1.10^{-3}
Sulfate de zinc	$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	1.10^{-3}
Acide borique	H_3BO_3	1.10^{-3}
Sulfate de manganèse	$\text{MnSO}_4, 4\text{H}_2\text{O}$	$0,1.10^{-3}$
Sulfate de cuivre	$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	$0,03.10^{-3}$
Chlorure d'aluminium	AlCl_3	$0,03.10^{-3}$
Chlorure de nickel	$\text{NiCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	$0,03.10^{-3}$
Iodure de potassium	KI	$0,01.10^{-3}$
Saccharose		20
Thiamine, HCL	Vitamine B ₁	1.10^{-3}
Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique	2,4-D	1.10^{-3}

Tableau 2 : Composition du milieu de culture des suspensions cellulaires de Ronce.
Solution de HELLER (1953)

Eléments	Solution mère (SM)	Milieu de culture	
		ml SM/l	mg/l
<u>Eléments minéraux : macroéléments</u>			
NH ₄ NO ₃	165 g/l	10 ml	1650
KNO ₃	190 g/l	10 ml	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	44 g/l	10 ml	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	37 g/l	10 ml	370
KH ₂ PO ₄	17 g/l	10 ml	170
<u>Eléments minéraux : microéléments</u>			
H ₃ Bo ₃	620 mg/500 ml	5 ml	6,2
MnSO ₄ ·H ₂ O	1690 mg/500 ml	5 ml	16,9
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1060 mg/500 ml	5 ml	8,6
KI	83 mg/500 ml	5 ml	0,83
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25 mg/500 ml	5 ml	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,5 mg/500 ml	5 ml	0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2,5 mg/500 ml	5 ml	0,025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2780 mg/500 ml	10 ml	27,80
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	3730 mg/500 ml	10 ml	37,30
saccharose			10.000

Tableau 3 : Composition du milieu de culture des suspensions cellulaires de Tabac solution de MURASHIGE et SKOOG (1962).

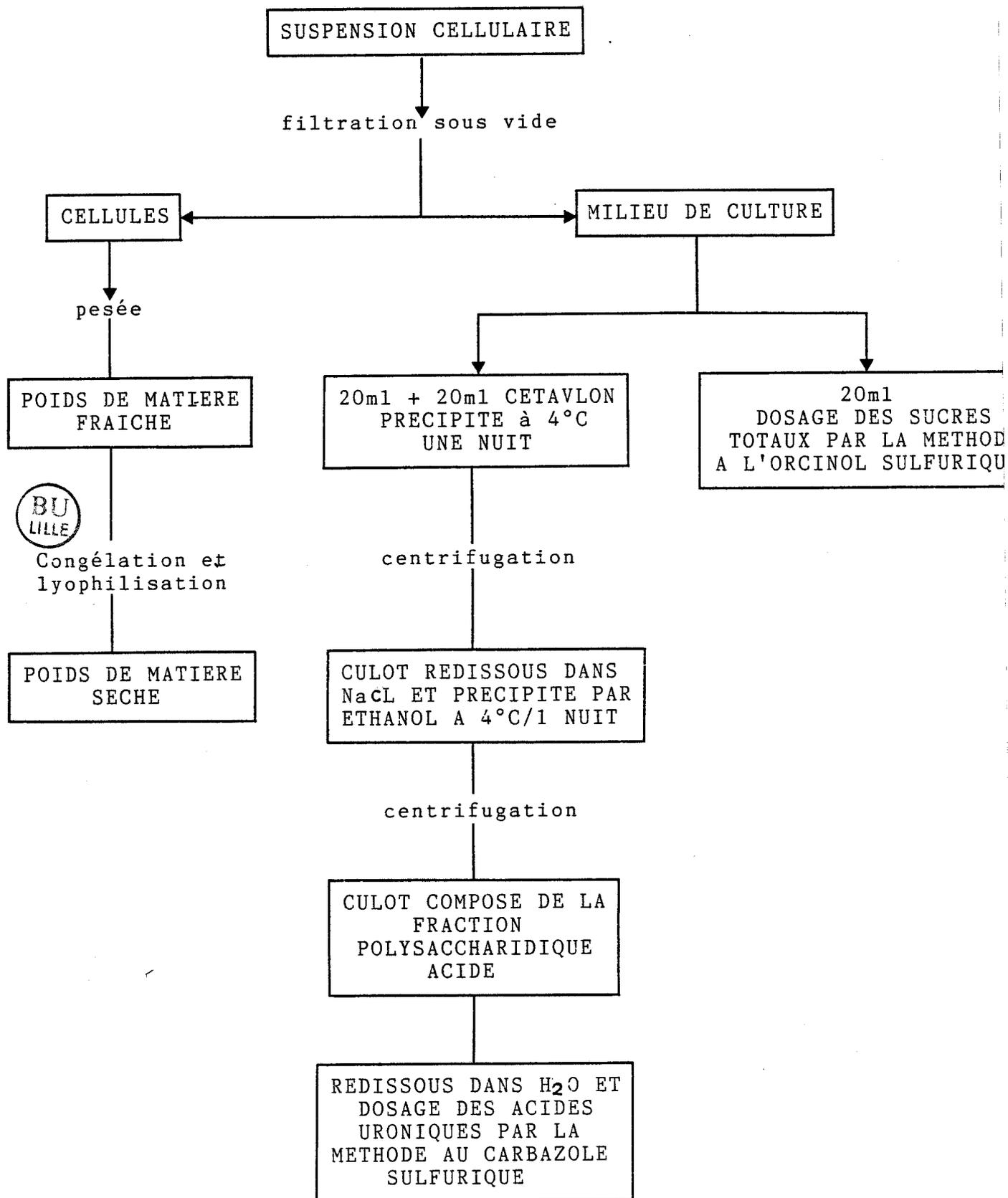


Figure 8 - Schéma récapitulatif des opérations de séparation et de mesure des polysaccharides extracellulaires

II - APPRECIATION DE LA CROISSANCE

La croissance est déterminée par la mesure des poids de matière fraîche (P.F.), de matière sèche (P.S.) et par le nombre de cellules par millilitre de suspension. Le dénombrement des cellules s'effectue sur une cellule de Nageotte, après dispersion des amas par l'acide chromique à 10 % (24 heures à 4°C) et plusieurs passages de la suspension par une aiguille hypodermique ($\varnothing = 0,8$ mm) montée sur une seringue. Une partie aliquote de la suspension ainsi dissociée est utilisée pour apprécier la taille des cellules.

III - SEPARATION ET MESURE DES POLYSACCHARIDES EXTRACELLULAIRES

Les cellules sont prélevées à intervalles réguliers pendant la durée de la culture (Figure 8). Le contenu de chaque fiole est versé dans un entonnoir de Büchner garni d'un papier filtre et la filtration se déroule sous vide jusqu'à écoulement total du milieu. Les cellules sont recueillies et pesées (poids de matière fraîche), le milieu de culture étant réservé pour y mesurer les différentes fractions saccharidiques en solution.

1. Mesure des sucres totaux

L'ensemble de la fraction saccharidique est mesurée par la méthode à l'orcinoï sulfuriq de TILLMANS et PHILIPPI (1929) modifiée par RIMINGTON (1931). Il s'agit d'une réaction colorée classique obtenue

par condensation entre l'orcinol (dihydroxy-toluène) et les produits de dégradation des hexoses par H_2SO_4 .

Le mode opératoire est celui précisé par MONTREUIL et al. (1981). Dans des tubes à essais sont introduits successivement :

- 1 ml de la solution à doser renfermant au maximum $200 \mu g \cdot ml^{-1}$ d'oses
- 2 ml de solution d'orcinol obtenue en dissolvant 1,5 g d'orcinol dans 100 ml de solution aqueuse de H_2SO_4 à 30 %
- 15 ml d'une solution de H_2SO_4 à 60 %.

Les tubes sont agités pour obtenir un mélange homogène puis placés pendant 20 mn dans un bain-marie réglé à $80^\circ C$. Ils sont alors refroidis sous un courant d'eau froide puis placés à l'obscurité pendant 45 minutes. La densité optique est mesurée à 510 nm contre un blanc préparé comme précédemment où la solution d'oses est remplacée par 1 ml d'eau distillée. Deux tubes témoins contenant respectivement 100 et $200 \mu g \cdot ml^{-1}$ de glucose permettent d'étalonner les mesures.

2. Isolement de la fraction polysaccharidique acide

Le cetavlon (bromure de N-acétyl-N,N,N-triméthylammonium) est un ion ammonium quaternaire qui précipite sélectivement les molécules chargées négativement et par conséquent les polysaccharides acides à groupement carboxylique. Le mode opératoire est celui préconisé par SCOTT (1965): à 20 ml de milieu de culture sont ajoutés 20 ml d'une solution de cetavlon à 3 % et le mélange est placé à quatre degrés pendant

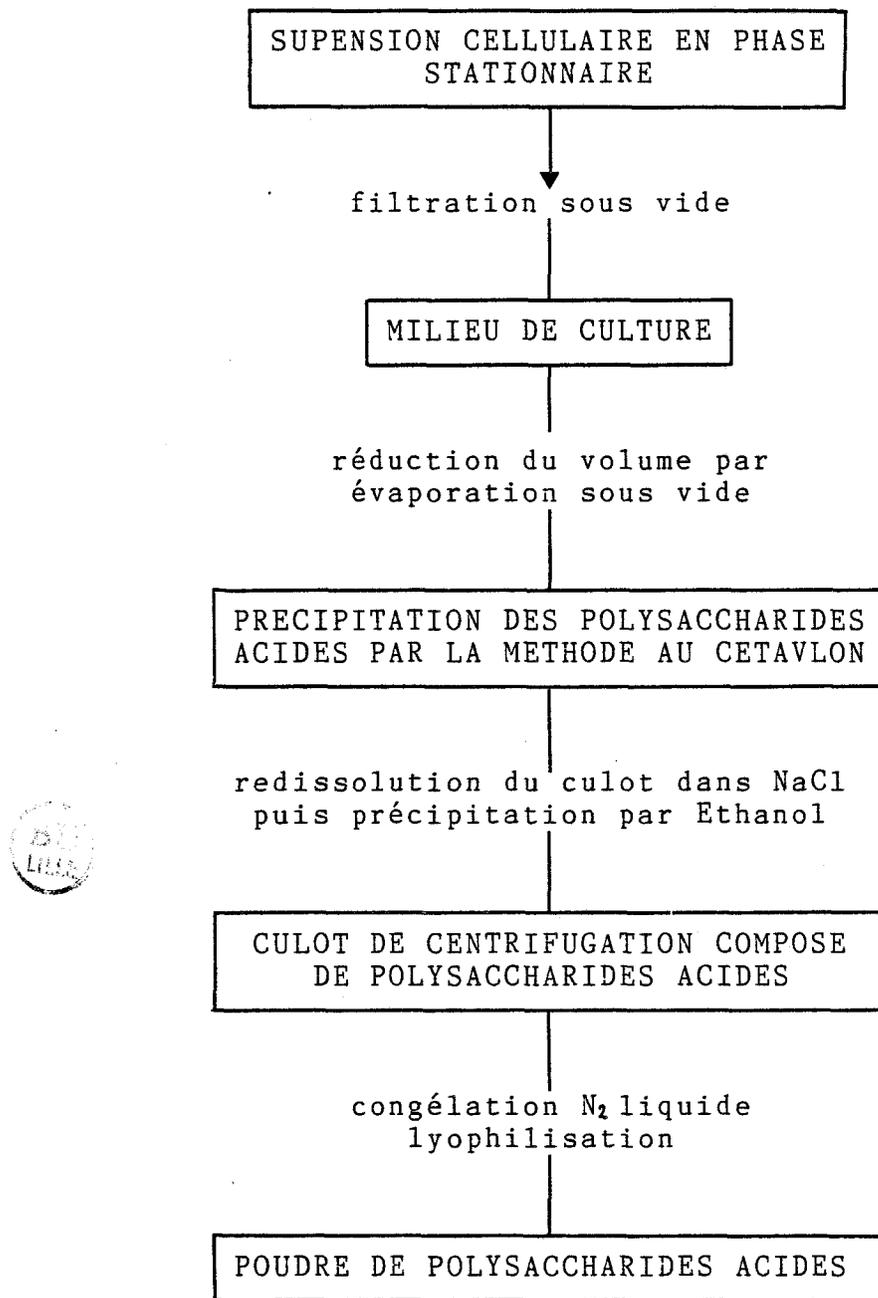


Figure 9 : Isolement des polysaccharides acides solubles dans le milieu de culture d'une suspension cellulaire en phase stationnaire de croissance

une nuit afin de permettre une précipitation complète. Après retour à la température ambiante, le mélange est séparé par centrifugation à 2000 g pendant une heure. Le culot est redissous dans 5 ml d'une solution de NaCl 0,2 M puis on précipite à nouveau les polysaccharides acides par six volumes d'éthanol absolu à 4°C pendant une nuit. Une centrifugation à 2000 g pendant une heure permet d'éliminer le surnageant alcoolique, le culot de polysaccharides est alors redissous dans 10 ml d'eau distillée pour doser les acides uroniques contenus dans ces polymères.

La nécessité de disposer de quantités importantes de polymères en vue de leur étude ultérieure a conduit à modifier le protocole expérimental (Figure 9) : à partir du volume maximum de milieu de culture récupéré en phase stationnaire, une évaporation sous vide permet d'avoir un volume réduit auquel on ajoute une quantité suffisante de solution de cetavlon à 3 %, la suite des opérations est identique à celle décrite précédemment. Le culot obtenu est congelé puis lyophilisé. La poudre est conservée à l'abri de l'humidité et de la lumière.

3. Mesure des acides uroniques

Les acides uroniques compris dans les polymères extraits du milieu de culture et solubles dans l'eau, sont mesurés par la méthode du carbazole sulfurique de DISCHE (1947). Le carbazole (dibenzopyrrole) réagit avec les acides uroniques en milieu sulfurique et à chaud pour donner une coloration rose caractéristique.

Dans des tubes à essais sont ajoutés :

- 1 ml de la solution à doser renfermant de 20 à 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ d'acide uronique
- 6 ml de H_2SO_4 concentré.

Le mélange est agité, refroidi rapidement, puis 0,2 ml de solution de carbazole à 0,1 % dans l'alcool absolu sont ajoutés.

Après une nouvelle agitation les tubes sont placés à 100°C pendant 20 mn (bain-marie), puis laissés pendant trois heures à l'obscurité.

La densité optique est mesurée à 530 nm contre un blanc préparé de la même façon que précédemment où la solution d'oses est remplacée par de l'eau distillée.

Par ailleurs, une série de témoins contenant respectivement 20, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ d'acide glucuronique serviront à étalonner les mesures.

IV - DOSAGE DES GIBBERELLINES DU MILIEU DE CULTURE

1. Extraction des gibbérellines

Le milieu de culture d'une fiole récupéré à la fin de la croissance des cellules est évaporé à sec à 35°C, au moyen d'un évaporateur Büchi. Ensuite, les gibbérellines sont extraites avec 30 ml de méthanol 80 % pendant 4 heures à 4°C (3 fois), puis avec 30 ml d'acétate d'éthyle

à 4°C (3 fois). L'extrait est alors évaporé à sec à 35°C.

L'extraction des gibbérellines à partir des PPA (200 mg) est faite, directement, avec le méthanol 80 % et l'acétate d'éthyle. L'extrait est ensuite évaporé à sec à 35°C, comme précédemment.

2. Application sur chromatogrammes

Chaque extrait est solubilisé dans 400 μ l de méthanol 80 %. Cette prise d'essai est déposée à l'aide d'une micropipette sur une plaque de gel de Silice (5 cm \times 20 cm, MERCK, F 254). Les substances non solubles dans le méthanol sont reprises dans 400 μ l d'acétate d'éthyle pur et sont déposées sur la même plaque de gel de silice.

Le chromatogramme témoin est préparé en déposant 400 μ l de méthanol à 80 % + 400 μ l d'acétate d'éthyle pur sur une plaque de gel de silice, cet essai est appelé : "Témoin solvant".

Les plaques sont chromatographiées simultanément dans le solvant isopropanol-ammoniaque-eau (80/0,05/1,95 V/V), sur une hauteur de 18 cm (Température : 18°C - obscurité).

3. Test "laitue" (FRANKLAND et WAREING, 1960, modifié par COUILLEROT, 1976).

Les tests sont réalisés avec Lactuca sativa, cultivar Batavia blonde dorée de printemps. Après passage dans l'hypochlorite (30 g/l),

Les graines de laitues sont rincées dans l'eau stérile et ensemencées aseptiquement sur papier filtre humide dans des boîtes de pétri et mises à germer à l'obscurité à 25°C.

Des petits tubes de verre sont remplis avec 5 ml de milieu gélosé à 0,5 % contenant les éléments minéraux de la solution de Heller. Chaque petit tube est placé à l'intérieur d'un tube de Borrel, où l'atmosphère est maintenue humide grâce à un fragment d'éponge mouillée. L'ensemble est ensuite stérilisé à 110°C durant 20 mn.

Les chromatogrammes précédemment réalisés (extraits et témoins solvants) sont partagés en 10 bandes de 5 cm x 1,8 cm, le gel de silice de chaque Rf est gratté et introduit stérilement dans un tube contenant le milieu gélosé, auquel nous ajoutons 1 ml d'eau stérile. L'élution du gel se poursuit durant 3 h, puis dix germinations de laitue de 2 jours, sont repiquées dans chaque flacon et les tubes sont mis en culture (2300 lux, 24°C, 16 h de jour/ 8 h de nuit).

Après 15 jours de culture, pour chaque Rf, la longueur moyenne pour 10 hypocotyles de laitue est comparée à celle obtenue pour le témoin solvant et pour une gamme d'étalonnage effectuée avec des solutions de AG_3 à différentes concentrations (10^{-1} à 10^{-5} $\mu\text{g/ml}$).

4. Test "albumen d'orge" (COOMBE et al., 1967) modifié par COUILLEROT, 1976).

Ce test nous permet de doser simultanément les sucres réducteurs

et l'activité gibbéréllique des extraits. On divise l'extrait en deux lots qui sont évaporés sous vide, une série d'essais sans albumen d'orge permet de doser les sucres réducteurs du milieu de culture ou des PPA ; l'autre série reçoit les albumens d'orge. Les deux tests sont préparés en même temps à partir d'un même extrait, en considérant chaque fois des prises d'essais de 400 μ l.

Les chromatogrammes obtenus avec l'extrait et avec le solvant sont partagés en 10 zones de Rf ; le gel de silice est gratté et introduit dans une fiole de 25 ml où l'on ajoute 2 ml d'eau distillée et 0,2 ml d'une solution de sulfate de streptomycine à 0,2 %. Dans l'une des deux séries, on ajoute l'albumen d'orge.

L'orge utilisée est une variété d'orge nue (lignée 113 sélectionnée par l'INRA de Clermont-Ferrand). Les grains sont groupés selon leur poids et on utilise toujours le même lot de graines pour un dosage. Les graines sont mises à tremper à + 4 C° 3 heures, puis on supprime pour chaque graine l'extrémité distale (qui porte l'embryon) sur une longueur de 4 mm et l'on pèse l'albumen privé de sa zone embryonnaire. On prélève deux albumens par essai ; ceux-ci sont choisis selon leur poids, la quantité de substrat (100 mg) soumise à l'hydrolyse restant toujours la même d'un essai à l'autre. Ensuite, les albumens sont coupés en deux, longitudinalement, puis introduits dans la fiole, la face coupée dirigée vers le bas, baignant dans le liquide. Un essai blanc sert à mesurer l'activité amylasique du substrat.

Les séries sans albumen et avec albumen sont mises à incuber au même moment à 29°C pendant 20 h. Le liquide de chaque fiole récupéré est

complété à 10 ml avec de l'eau distillée, puis filtré sur amberlite 120 H⁺. On pipette 1 ml de filtrat et on dose les sucres réducteurs par la méthode de NELSON (1944). La D.O. est mesurée à 650 nm au spectrophotomètre.

V - CULTURE DES PLANTULES D'ENDIVE.

1. Aseptisation des graines d'Endive (variété hâtive).

Le principe est le suivant :

- Tremper les graines dans une solution de mercryl pendant 10 mn, puis dans de l'éthanol à 70°C durant 5 mn ;
- Tremper, durant 15 mn, dans une solution d'hypochlorite de calcium à 90 g.l^{-1} à laquelle on ajoute du mercryl laurylé à 5 % ;
- Rincer 3 fois à l'eau déminéralisée stérile. Au dernier rinçage, les graines sont laissées dans l'eau 1 h.

Les graines sont alors déposées dans des boîtes de pétri contenant un milieu nutritif de Heller plus 1 % de saccharose. Ce milieu est solidifié par de la gélose (Agar à 8 %). Le milieu est autoclavé à 110°C pendant 20 mn. Les graines sont mises à germer (10 j) dans une pièce éclairée 18 h par jour et à une température de 22°C.

2. La mise en culture des plantules d'Endive.

Le milieu de repiquage contient la solution nutritive de HELLER

diluée au 1/2 + 100 µg/ml de PPA + 2 % de saccharose. Ce milieu est autoclavé à 110°C pendant 20 mn. A 10 jours, les plantules sont transférées dans ce milieu sur un support de papier filtre. Elles sont placées dans une pièce à 22°C, éclairée 18 h par jour. Les P.F. et P.S. sont mesurés après 60 jours.

RESULTATS

A

EXCRETION DE POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES AU COURS
DE LA CULTURE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES.

I - INTRODUCTION.

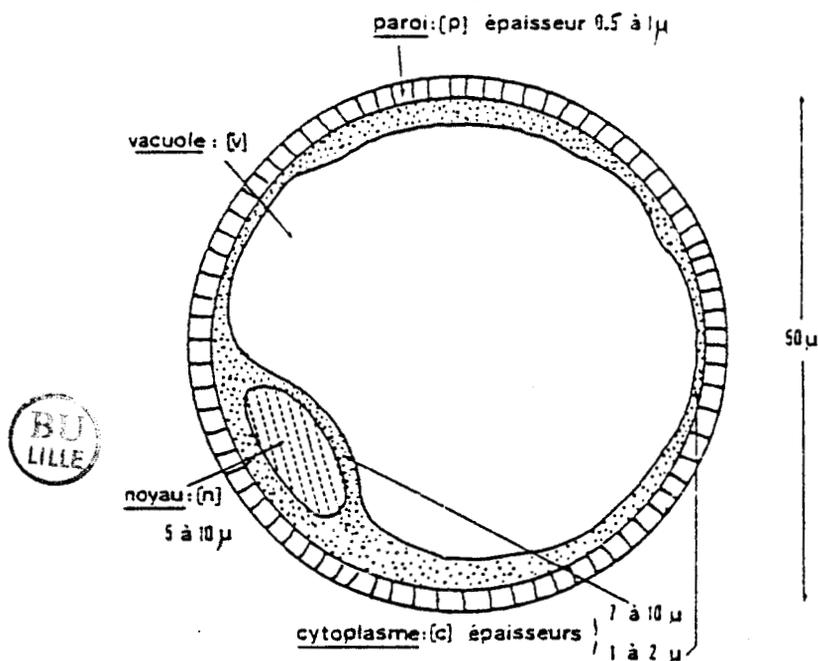
Les systèmes biologiques que l'on cultive sous le nom de suspensions cellulaires sont constitués par un ensemble de cellules isolées et de massifs cellulaires comprenant un nombre plus ou moins élevé de cellules non séparées les unes des autres. L'existence de ces agrégats cellulaires est liée au fait que les deux cellules filles issues de la division d'une cellule mère dans la plupart des cas restent liées par leur paroi pectocellulosique.

Au cours de la croissance de ce massif, les propriétés des parois se modifient, chaque cellule évolue vers une forme subsphérique avec réduction des surfaces qui relient les cellules de la périphérie du massif à leurs voisines. L'agitation mécanique de la culture conduit à la libération de cellules ou de petits massifs périphériques, il en résulte donc une situation d'équilibre dans la suspension cultivée qui est donc constituée d'un ensemble de massifs allant de quelques dizaines, voire de quelques centaines de cellules à la cellule isolée. Cette situation d'équilibre sera donc caractérisée par une composition moyenne en agrégats de tailles variables.

Il est également nécessaire d'insister sur certaines des particularités structurales de la cellule végétale cultivée en milieu liquide : la présence d'une vacuole importante et d'une paroi de faible épaisseur.

La figure 10 donne une vue très schématique d'une telle cellule. Il est donc clair que l'augmentation de surface cellulaire imposée par la vacuole et l'importance du milieu extérieur en relation directe avec

Figure 10 - SCHEMA D'ORGANISATION GENERALE D'UNE CELLULE DE PLANTE
CULTIVEE EN MILIEU LIQUIDE ET DIMENSIONS CORRESPONDANTES



	Volume		Surface (μ^2)
	(μ^3)	(%)	
total	8.5×10^4	100	
vacuole	5.8×10^4	88	
cytoplasme	3.7×10^3	6	7.5×10^3
paroi	3.8×10^3	6	
cytoplasme équivalent	3.7×10^3	-	1.1×10^3

(d'après GUERN., 1979)

la cellule font que les activités d'échange (absorption des éléments nutritifs, fuites de métabolites primaires et secondaires) représentent l'une des activités majeures des cellules cultivées en milieu liquide (GUERN, 1979).

Ces cellules cultivées en suspension libèrent activement dans le milieu de culture des polysaccharides (BECKER et al., 1964 ; ASPINALL et al., 1969 ; BARNOUD et al., 1977 ; TAKEUCHI et KOMAMINE, 1978, 1980a) dont la composition est en relation avec celle de la fraction pectique et hémicellulosique de la paroi.

Nous avons donc étudié quantitativement les variations des polymères pectiques acides du milieu de culture, en fonction de l'intensité de la croissance des suspensions cellulaires de Silène et de Ronce.

II - ETUDE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE DE SILENE.

Isolée au laboratoire, la suspension cellulaire de Silène (Silène alba (Miller) E.H.L. KRAUSE) a été présentée comme une souche à croissance rapide en raison de l'augmentation importante du poids de matière fraîche qui est multiplié par 20 au cours de la culture et en raison de la durée relativement courte (15 jours) nécessaire pour atteindre l'optimum pondéral (DUBOIS, 1980). Au cours des essais que nous avons effectués (figure 11), nous n'avons noté qu'une multiplication par 10 du poids de matière fraîche en 14 jours de culture et il n'est pas apparu de diminution significative en fin de cycle. Ce n'est qu'au cours de mesures indépendantes que nous avons vérifié que le poids de matière fraîche diminuait effectivement après 16 ou 20 jours de culture, ce qui nous a permis

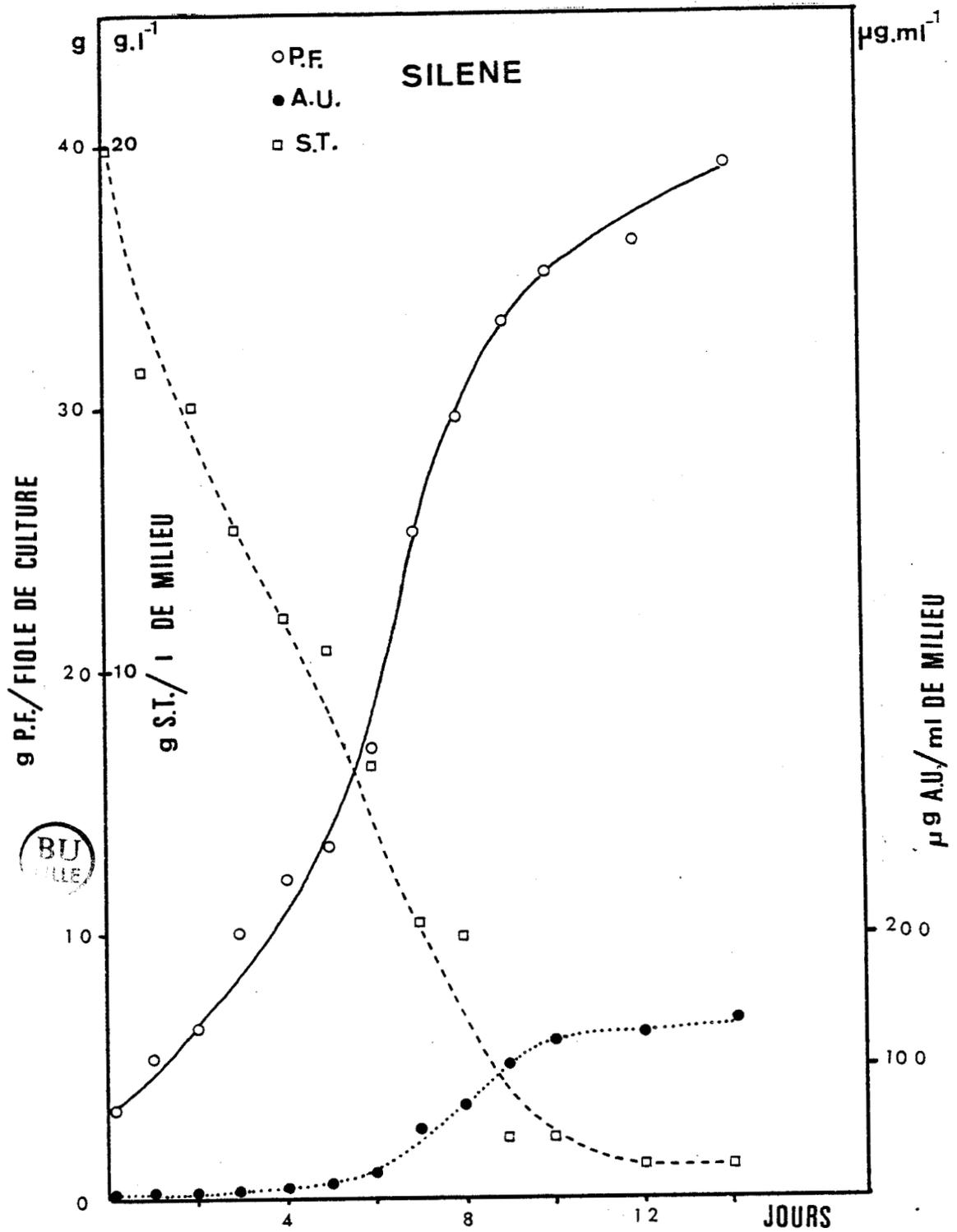


Figure 11 - Croissance (augmentation du poids de matière fraîche : P.F. en g), évolution des sucres totaux (S.T. en g.l⁻¹) et des acides uroniques (A.U. en μg.ml⁻¹) dans le milieu, au cours de la culture des suspensions cellulaires de Silène.

de situer l'optimum de croissance après 14 jours de culture et justifie le choix de cette périodicité pour le repiquage de la souche. La représentation semi-logarithmique des variations du poids de matière fraîche en fonction du temps (figure 12) montre l'absence de phase de latence et l'augmentation exponentielle de la croissance avec un temps de doublement de 53 heures très voisin de celui calculé par DUBOIS (1980).

Au cours de la culture, les suspensions cellulaires de *Silène* libèrent dans le milieu extérieur des polysaccharides acides (précipitables par le cétavlon). Nous avons dosé la quantité d'acides uroniques qu'ils contiennent.

Les acides uroniques (A.U) des polysaccharides acides excrétés dans le milieu sont en faible quantité dès le repiquage, et ils ne cessent d'augmenter tout au long de la culture (figure 11). La représentation en coordonnées semi-logarithmiques montre la similitude entre la courbe d'excrétion et la courbe de croissance. Cela dépend évidemment de la valeur que l'on accorde à la mesure du poids de matière fraîche comme critère de croissance et repose sur l'hypothèse que le rapport entre la masse des polysaccharides acides excrétés et les acides uroniques qu'ils contiennent demeure constant tout au long de la culture. Si on confronte l'évolution du poids de matière fraîche aux quelques données que nous avons obtenues concernant le poids de matière sèche et à d'autres résultats du laboratoire, il apparaît que la croissance de la suspension de *Silène* peut être considérée comme rapide, la phase de latence est réduite ou absente. Les cellules commencent à se diviser très rapidement et présentent une taille moyenne minimale après six jours, c'est-à-dire au moment où les divi-

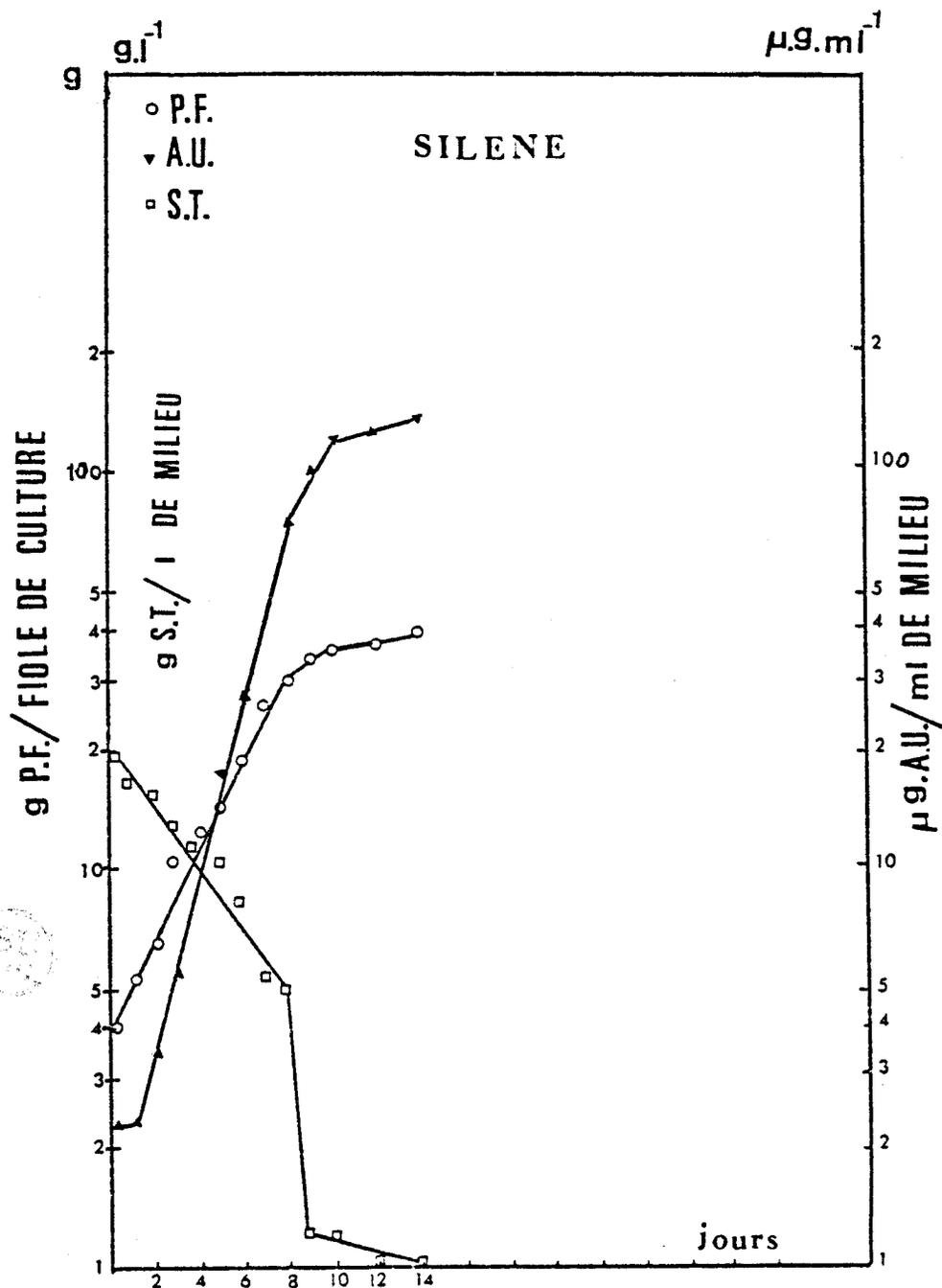


Figure 12 - Représentation semi-logarithmique de l'évolution de la croissance (poids de matière fraîche : P.F. en g), des sucres totaux (S.T. en $g.l^{-1}$) et de l'excrétion d'acides uroniques (A.U. en $\mu g.ml^{-1}$) dans le milieu, au cours de la culture des suspensions cellulaires de Silène.

sions cellulaires sont les plus nombreuses. A partir de huit jours de culture, la taille moyenne des cellules augmente témoignant du grandissement cellulaire (DUBOIS et al., 1976). L'absence de mesure de poids de matière sèche dans notre série expérimentale est un handicap pour vérifier l'absorption d'eau en fin de culture. Par ailleurs, nos résultats indiquent que la sécrétion des polysaccharides acides varie en fonction du temps, qu'elle est maximale entre le 4ème et le 8ème jour, ce qui correspond à la phase exponentielle et qu'elle diminue ensuite jusqu'au 10ème jour pour se stabiliser finalement et atteindre une concentration de $150 \pm 20 \mu\text{g/ml}$ de milieu en fin de culture. Les expériences ont été répétées trois fois. Ce sont les résultats d'une d'entre elles qui sont présentés sur les figures 11 et 12.

Les sucres présents dans le milieu de culture évoluent également au cours du temps : les cellules utilisent la moitié de la réserve carbonée pendant les quatre premiers jours et le milieu est épuisé après 10 jours de culture.

III - ETUDE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE DE RONCE.

A partir de colonies tissulaires entretenues au laboratoire depuis de nombreuses années, on a établi une suspension cellulaire de Ronce (Rubus fruticosus L.). Elle croît plus lentement que celle de Silène : en ensemençant $3 \pm 0,2$ g de cellules de Ronce dans 200 ml de milieu, on obtient finalement $35,3 \pm 3,6$ g de P.F. de cellules après 30 jours de culture, alors que l'ensemencement de $3 \pm 0,2$ g de cellules de Silène donne 40 ± 4 g

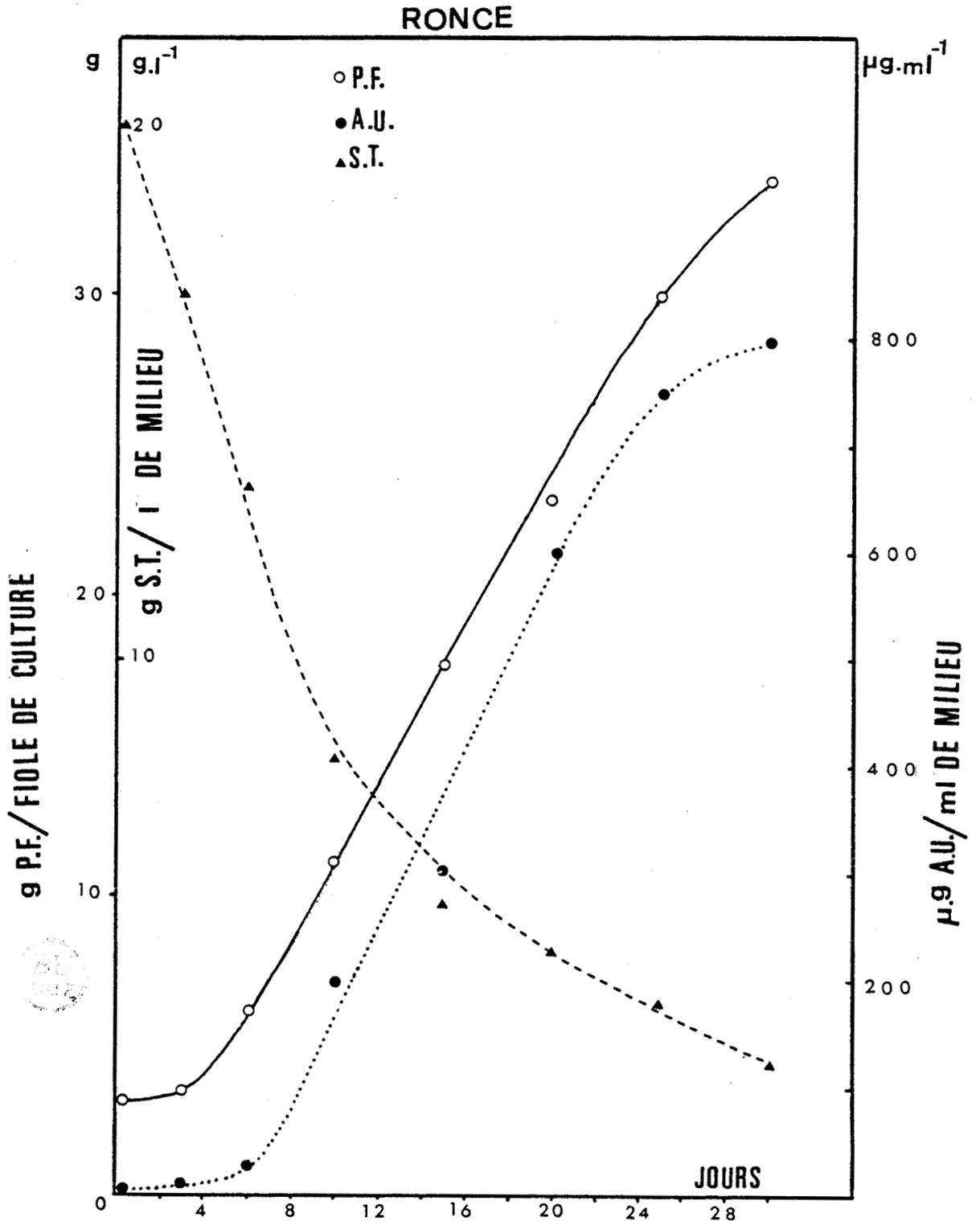


Figure 13 - Croissance (augmentation du poids de matière fraîche : P.F. en g), évolution des sucres totaux (S.T. en g.l^{-1}) et des acides uroniques (A.U. en $\mu\text{g.ml}^{-1}$) dans le milieu, au cours de la culture des suspensions cellulaires de Ronce.

de P.F. de cellules après 15 jours seulement. La suspension cellulaire de Ronce est constituée d'amas cellulaires comprenant jusqu'à une cinquantaine de cellules sphériques de 60 à 80 μm de diamètre. On y trouve également des cellules géantes ovoïdes ou allongées qui peuvent atteindre 150 à 200 μm de longueur. Pour réaliser une étude cinétique des variations de P.F. au cours de la culture, nous avons fait des prélèvements à intervalles réguliers dont nous avons mesuré les P.F. Chaque série de mesures a été réalisée sur deux fioles à chaque prélèvement et les expériences ont été répétées trois fois. Ce sont les résultats de l'une d'entre elles qui sont présentés sur la figure 13 : l'utilisation de coordonnées semi-logarithmiques (figure 14) donne une courbe de croissance caractéristique avec une courte phase de latence, puis une phase exponentielle longue entre le 4^{ème} et le 26^{ème} jour, pour atteindre une phase de croissance ralentie au 30^{ème} jour de culture. Le fait qu'il faut au moins 30 jours pour atteindre le poids de matière fraîche optimal, et que le temps de doublement soit de l'ordre de 96 heures, permet de qualifier de lente la croissance de la suspension cellulaire de Ronce, du moins comparativement à celle de Silène (DUBOIS et BOURIQUET, 1974) ou de l'Erable (LESCURE, 1966).

Au cours de la culture, la suspension cellulaire de Ronce libère également dans le milieu des polysaccharides pectiques acides (PPA) en quantités très importantes environ 800 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ d'acides uroniques tandis que les cellules de Silène n'en sécrètent que 150 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. De nouveau, la représentation en coordonnées semi-logarithmiques (figure 14) montre une similitude entre l'évolution de cette excrétion et celle de la croissance.

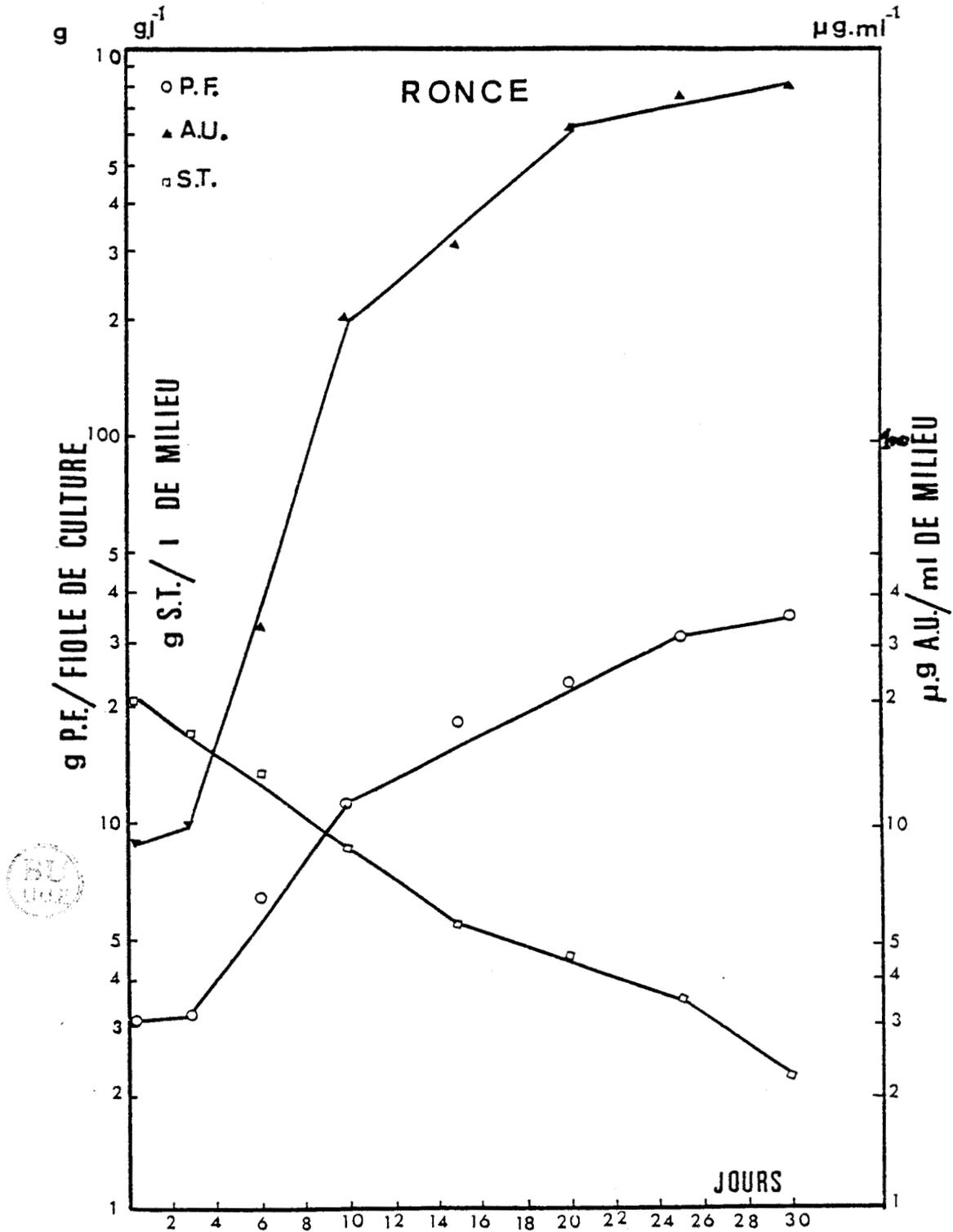


Figure 14 -

Représentation semi-logarithmique de l'évolution de la croissance (poids de matière fraîche : P.F. en g), des sucres totaux (S.T. en g.l⁻¹) et de l'excrétion d'acides uroniques (A.U. en µg.ml⁻¹) dans le milieu, au cours de la culture des suspensions cellulaires de Roncea.

Les sucres totaux contenus dans le milieu de culture diminuent régulièrement tout au long de la culture, mais même en fin de culture, il en reste encore 10 %.

Les résultats que nous avons obtenus établissent clairement que la suspension de Silène qui croît dans de bonnes conditions n'excrète dans son milieu de culture que de faibles quantités de polysaccharides acides ($150 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) alors que celle de Ronce qui présente une croissance plus faible libère beaucoup plus de polysaccharides acides ($800 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). Ceci permet de supposer que les polysaccharides acides libérés dans le milieu de culture varient selon la souche utilisée, et qu'ils peuvent intervenir sur la croissance ultérieure de la suspension cellulaire qui les excrète.

B.

EFFETS DES POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES LIBERES
DANS LE MILIEU DE CULTURE SUR LA CROISSANCE DES
SUSPENSIONS CELLULAIRES.

I - EFFETS DES POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES LIBERES DANS LE MILIEU DE CULTURE DES CELLULES DE SILENE, RONCE ET TABAC SUR LA CROISSANCE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES.

Ayant constaté que l'excrétion dans le milieu de culture de Polysaccharides acides, probablement d'origine pectique, dépendait de la souche utilisée et qu'elle était d'autant moins importante que la croissance de la suspension était rapide, nous avons pensé que la présence de ces composés dans le milieu nutritif dès le début de la culture pouvait agir sur la croissance des cellules qui les produisaient. Afin d'examiner cette éventualité, les polysaccharides acides ont été extraits puis lyophilisés de façon à être disponibles sous forme de poudre.

L'extraction a été réalisée lorsque les suspensions cellulaires ont atteint la phase stationnaire de croissance, c'est-à-dire après 14 jours pour le Silène et après 30 jours pour la Ronce. Les poudres ont été introduites dans les milieux neufs en quantité variable et avant l'autoclavage. Nous avons vérifié le pH avant et après l'autoclavage pour le maintenir à des valeurs identiques à celles des milieux témoins (5.7 ± 1).

1. Effets des polysaccharides pectiques acides excrétés par la suspension cellulaire de Silène.

Comme nous avons pu déjà le constater, la souche de Silène n'excrète que de faibles quantités de polysaccharides acides exprimées par la quantité d'acides uroniques (A.U.) qui en contient. Leur extraction à partir du contenu d'une fiole (200 ml) fournit environ 25 mg de poudre de

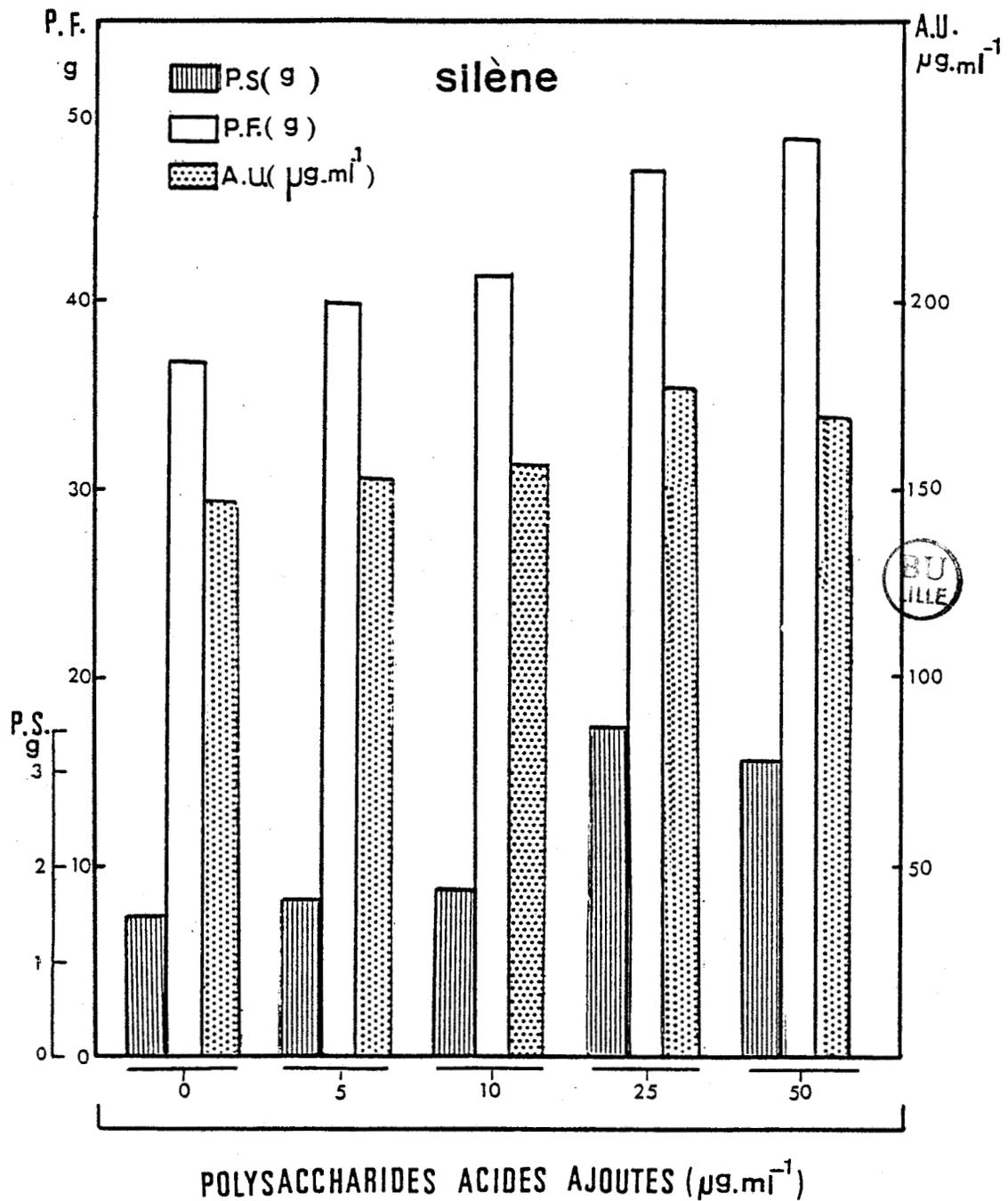


Figure 15 :

Effets de polysaccharides acides, extraits du milieu de culture de la suspension cellulaire de Silène, sur la croissance des cellules de Silène (poids de matière fraîche : P.F. en g et poids de matière sèche : P.S. en g et sur l'excrétion de ces polymères dans le milieu: A.U. en µg.ml⁻¹)

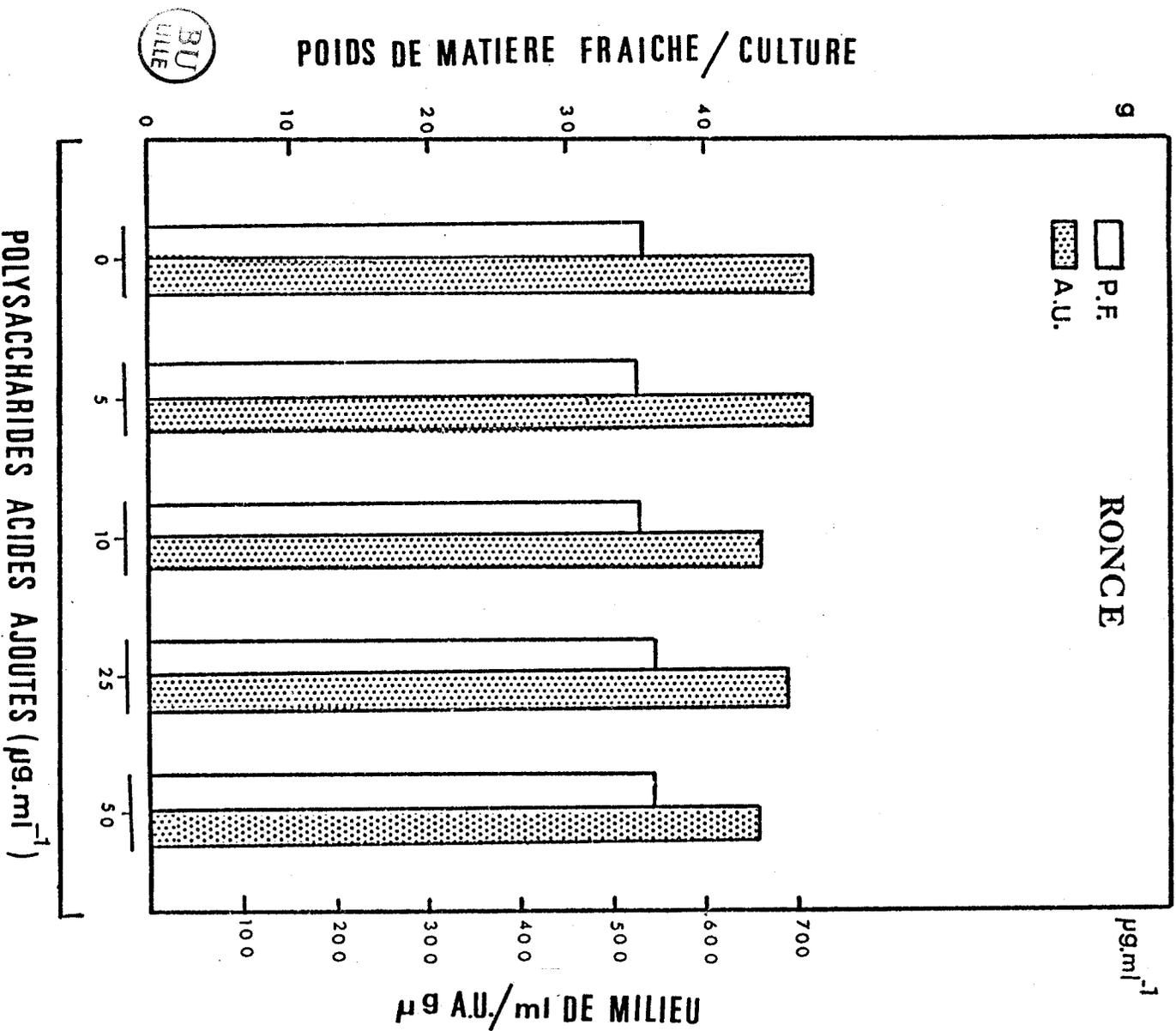


Figure 16 :

Effets de polysaccharides acides, extraits du milieu de culture de la suspension cellulaire de Silène, sur la croissance des cellules de Ronce (poids de matière fraîche : P.F. en g) et sur l'excrétion de ces polymères (A.U. en $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) dans le milieu.

polysaccharides pectiques acides (PPA). Cette poudre a été réintroduite dans les milieux neufs à raison de 5, 10, 25 et 50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ce qui correspond aux doses normalement présentes dans le milieu jusqu'au 7ème jour de culture, c'est-à-dire pendant la période où la croissance est la plus active.

La croissance de la suspension cellulaire de Silène, est stimulée qu'elle soit exprimée en poids de matière fraîche ou de matière sèche. La quantité de polysaccharides acides exprimée en A.U. augmente également quelque soit la quantité initiale introduite dans le milieu avant l'ensemencement (figure 15). Par contre, l'introduction des polysaccharides acides de Silène dans le milieu de culture d'une suspension cellulaire de Ronce ne provoque que très peu d'effet (figure 16). Les résultats présentés sur les figures correspondent à la moyenne de trois essais indépendants.

2. Effets des polysaccharides pectiques acides excrétés par la suspension cellulaire de Ronce.

La suspension cellulaire de Ronce excrète très activement des polysaccharides acides de telle sorte que l'on peut extraire environ 100 mg de poudre par fiole de culture. Si on introduit ces composés dans les milieux de culture neufs à raison de 5, 10, 25 et 50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, il se produit une diminution sensible de la croissance, y compris pour la dose la plus faible et une inhibition totale à partir de 25 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, ceci aussi bien sur la suspension cellulaire de Ronce qui a produit ces poudres (PPA) que sur la suspension cellulaire de Silène (figure 17). De plus, la quantité de polysaccharides acides décelable en fin de culture est négligeable dans

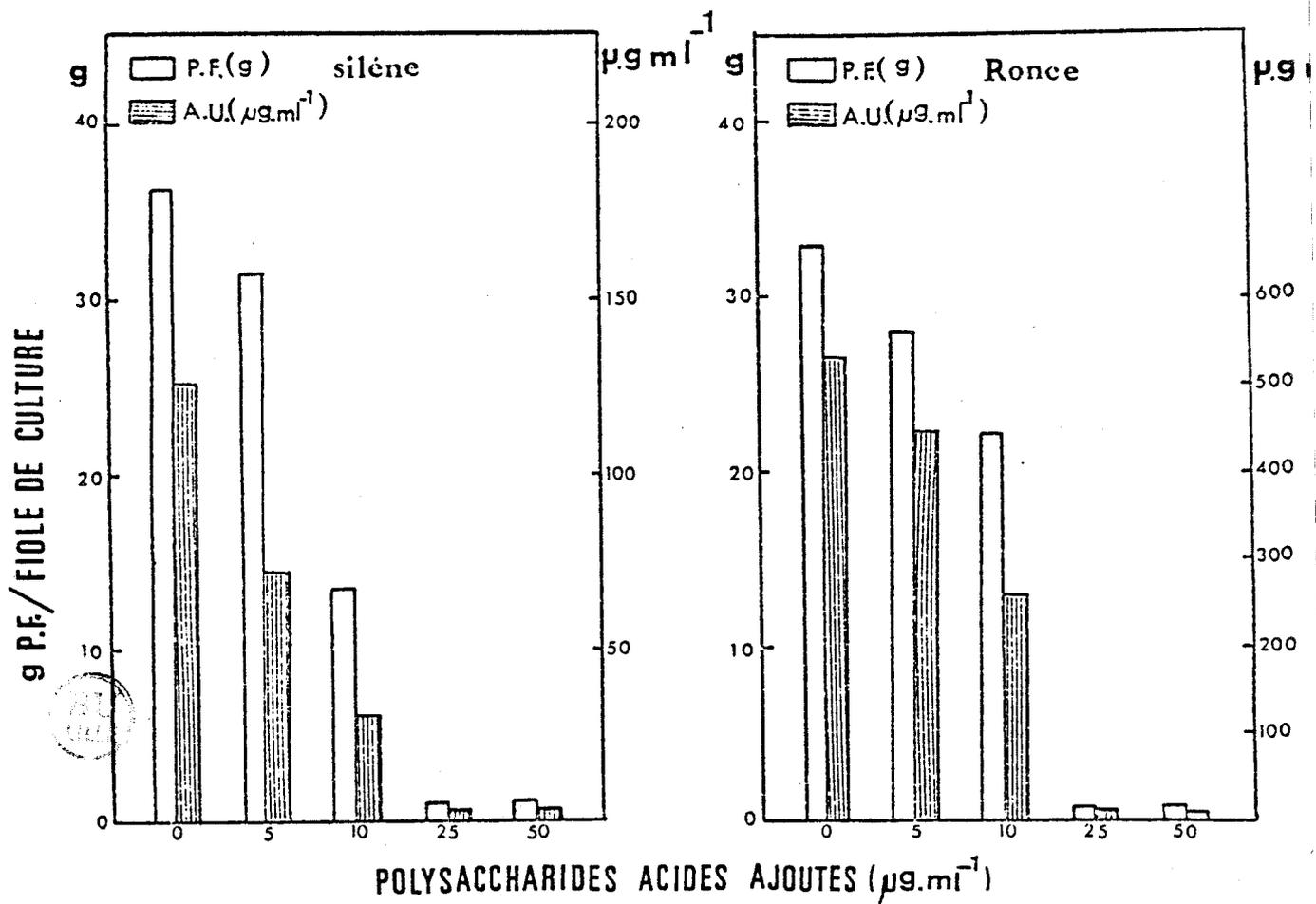


Figure 17 :

Effets inhibiteurs des polysaccharides acides, extraits du milieu de culture de la suspension cellulaire de Ronce, sur la croissance (P.F. en g) des suspensions cellulaires de Silène et de Ronce et sur l'excrétion de ces polymères (A.U. en $\mu\text{g.ml}^{-1}$) dans le milieu.

les deux cas, ce qui indique que les composés ajoutés dans les milieux nutritifs ont été absorbés et qu'en l'absence de toute croissance aucune excrétion nouvelle ne s'est manifestée.

3. Effets des polysaccharides pectiques acides excrétés par la suspension cellulaire de Tabac, sur la croissance des cellules de Silène.

La suspension cellulaire de Tabac a été établie à partir de colonies tissulaires entretenues au laboratoire depuis longtemps. C'est une souche à croissance rapide comme la souche de Silène et elle excrète également dans le milieu de culture une petite quantité de polysaccharides pectiques acides, environ 20 mg de poudre lyophilisée par fiole de culture de 200 ml. L'introduction de $50 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de ces PPA dans un milieu où on cultive des cellules de Silène, stimule leur croissance ; celle-ci est exprimée en P.F. et P.S. (tableau 4).



	P.F. (g)	P.S. (g)
Témoins	$54 \pm 3,1$	$3,86 \pm 0,26$
PPA de Tabac	$81,7 \pm 17,2$	$4,32 \pm 0,76$

Tableau 4 : Effet des PPA de Tabac sur la croissance des suspensions cellulaires de Silène.

Cette expérience réalisée à partir de cellules de Tabac n'avait pour but que de démontrer que ce qui avait été observé avec les cellules de Silène n'était pas un cas particulier.

Tous les résultats montrent que les polysaccharides (qui sont sans doute d'origine pariétale), extraits des milieux de culture varient non seulement quantitativement mais aussi qualitativement selon la nature de la souche cellulaire qui les a produite. Le rôle de ces polysaccharides excrétés dans le milieu peut être très important, dans la mesure où ils peuvent, soit limiter, soit stimuler la prolifération des cellules, que celles-ci les aient produits ou non. Au niveau cellulaire, ces polysaccharides pariétaux pourraient jouer également un rôle sur la croissance des cellules et des organismes qui les produisent.

Pour compléter les résultats ainsi obtenus, il nous a semblé intéressant d'étudier les variations de l'effet stimulateur des PPA, quand ils sont introduits dans le milieu à différentes phases de la culture, et selon l'âge des cellules qui les produisent, ainsi que le rôle physiologique et le mode d'action de ces PPA sur la croissance. Pour ces essais nous avons utilisé des cellules de Silène, ce matériel ainsi que les méthodes de culture ont été depuis longtemps mis au point au laboratoire, ils présentent donc l'avantage d'être bien connus.

II - EFFETS DES POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES INTRODUITS DANS LE MILIEU A DIFFERENTS STADES DE LA CULTURE

Certes, les PPA de Silène introduits dans le milieu à raison de 50 $\mu\text{g/ml}$ en début de culture stimulent la croissance de cette souche. Nous avons montré que cette dose correspond à celle que l'on trouve dans

les milieux de cultures témoins pendant la phase la plus active de la croissance.

On pouvait toutefois se demander, si l'effet exercé par les PPA est immédiat, ou si un contact prolongé avec cette substance est nécessaire ; d'autre part, si ces PPA agissent sur la croissance dès le début de la culture au moment où les cellules n'en secrètent pas encore, ou bien s'ils agissent seulement à partir de la phase exponentielle au moment où les cellules en secrètent . L'adjonction de ces PPA se fera au cours de la phase stationnaire au moment où leur dose atteint $110 \mu\text{g/ml}$ de milieu. Pour vérifier si la croissance des cellules était stimulée ou inhibée, nous avons réalisé l'expérience suivante : on ensemence au même moment avec des cellules de Silène une série de flacons qui ont été placés dans les mêmes conditions de température, d'éclairement et d'agitation. Ces flacons ont été répartis en 3 catégories : dans la première, les flacons ont reçu les PPA au début de la culture (0 jour), tandis que dans la deuxième, les flacons ont reçu les PPA après 5 jours de culture, ce qui correspond à la phase exponentielle des cellules. Puis, les flacons sont remis en place pour continuer à tourner dans les mêmes conditions jusqu'à la fin de la culture (15ème jour). Dans la troisième catégorie, les flacons ont reçu les PPA après 10 jours de culture (10 jours) ce qui correspond à la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire. Ces flacons sont remis ensuite dans les mêmes conditions jusqu'à la fin de la culture (15ème jour). Les prélèvements des cellules sont effectués le même jour pour tous les flacons (15ème jour).

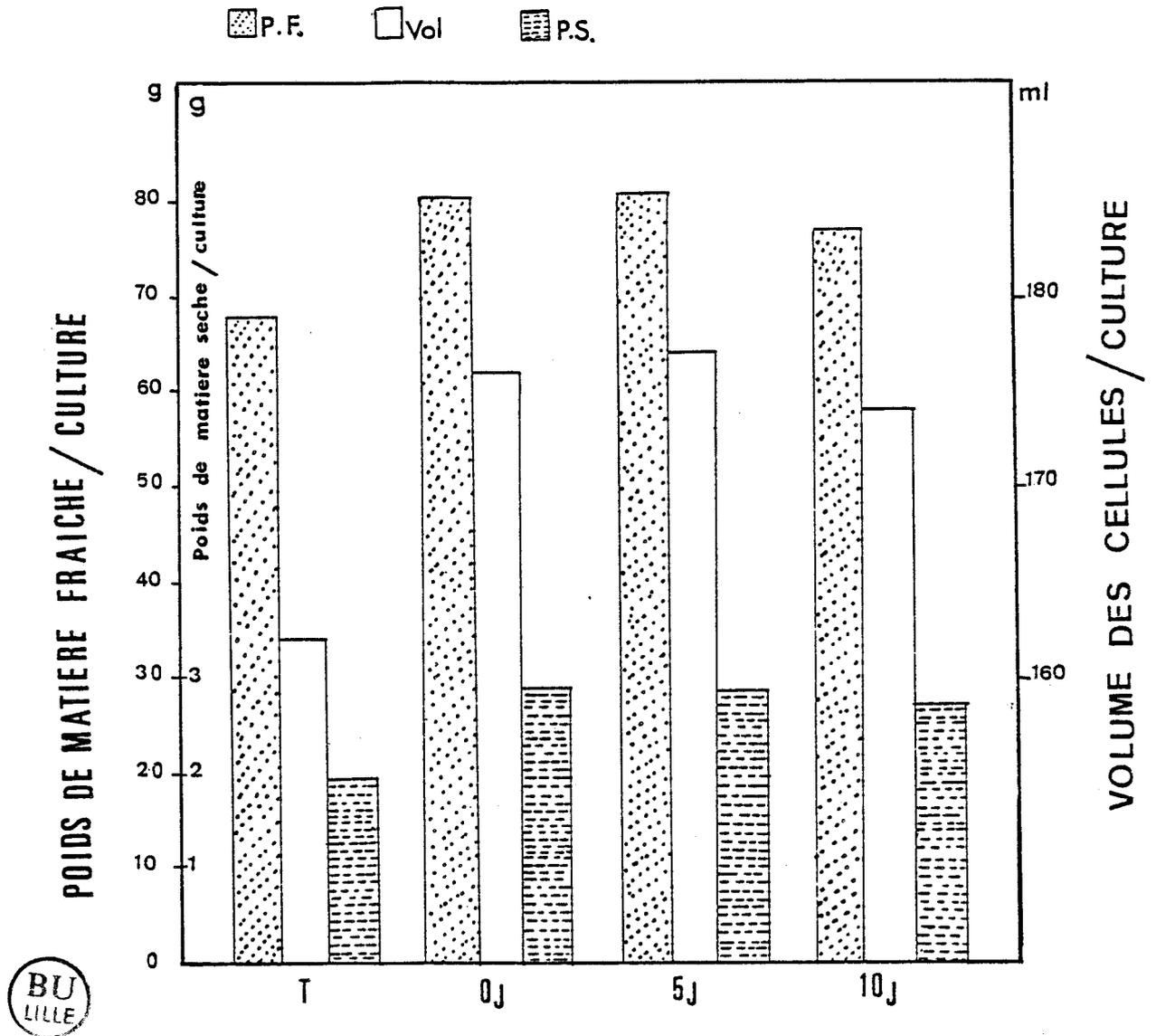


Figure 18 :

Effets des PPA de Silène introduits dans le milieu de culture (1er jour, 5ème jour et au 10ème jour) sur la croissance, exprimés par les poids de matière fraîche (P.F.), le poids de matière sèche (P.S.) et le volume total des cellules par fiole de culture.

Dans les deux premières catégories, les PPA agissent à peu près de la même manière sur la croissance. Ils provoquent une augmentation du P.F., P.S. et du volume total des cellules (figure 18). On ne note pas de différence significative entre les résultats obtenus avec ces deux catégories. Dans la troisième catégorie (flacons qui ont reçu leurs PPA au début de la phase stationnaire), on observe également que l'introduction des PPA provoque une augmentation des P.F., P.S. et du volume des cellules ; mais cette augmentation est moins importante que pour les deux cas précédents.

Ceci montre que les cellules sont capables d'utiliser facilement les PPA durant toutes les phases de leur croissance, et que cette utilisation est d'autant plus importante que le contact avec les PPA est plus long.

III - VARIATION DE L'ACTIVITE DE POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES DE SILENE SELON L'AGE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE.

Des recherches bibliographiques ont permis d'établir que la nature chimique des polysaccharides excrétés dans le milieu de culture change considérablement selon l'âge de la culture. Ces variations concernent la proportion de sucres neutres et d'acides uroniques (OLSON et al., 1969 ; TAKEUCHI et KOMAMINE, 1978). D'après ces travaux, on ne peut prévoir l'influence de l'âge des cellules sur l'effet de leurs polysaccharides excrétés dans le milieu sur la croissance.

Références	PPA 6 jours	PPA 9 jours	PPA 14 jours	T
P.F. (g) par culture	68,072 ± 2,556	81,006 ± 4,560	81,61 ± 10,982	55 ± 3,166
P.S. (g) par culture	3,827 ± 0,154	3,994 ± 0,17	3,972 ± 0,340	3,40 ± 0,18

Tableau 5 :

Effet des PPA extraits aux différentes phases de la culture des cellules de Silène, sur la croissance des cellules de Silène exprimée en poids de matière fraîche P.F. et poids de matière sèche p.S. par fiole de culture

T : Témoin

Pour étudier la variation de l'effet des PPA sur la croissance selon l'âge des cellules qui les sécrètent, des cellules de Silène sont ensemencées dans des flacons de 1000 ml placés dans les mêmes conditions. L'ensemble des flacons est classé en 3 lots pour les prélèvements. Pour le premier lot, les PPA cellulaires sont extraits après 6 jours de culture (phase exponentielle). Pour les deuxième et troisième lots, l'extraction des PPA est réalisée respectivement après 9 jours de culture (fin de la phase exponentielle) et 14 jours (phase stationnaire ou fin de culture). Chaque lot de PPA a été introduit en quantité identique ($50 \mu\text{g.ml}^{-1}$) dans des fioles contenant le milieu habituel additionné d'une source carbonnée 4 %, les fioles étaient placées dans les mêmes conditions et 14 jours plus tard, nous avons comparé les effets sur la croissance. Pour chaque fiole, le P.F. et le P.S. sont mesurés.

Les PPA prélevés à 6 jours de culture stimulent la croissance (P.F. et P.S.) comme le montre le Tableau 5, mais ils sont moins actifs que ceux prélevés après 9 jours de culture. Ceux qui proviennent de cellules de 14 jours sont tantôt activateurs, tantôt inhibiteurs quand ils sont stimulants, cette stimulation de la croissance est de même ordre que celle provoquée par les PPA prélevés au 9ème jour de culture.

L'ensemble de ces résultats montre, d'une part que l'effet des PPA sur la croissance varie selon l'âge des cellules qui les sécrètent (ceci est probablement en rapport avec la nature chimique des composés) et, d'autre part que, les PPA prélevés en fin de culture pourraient soit contenir un inhibiteur, soit avoir été extraits en même temps qu'un inhibiteur de la croissance. Cet inhibiteur pourrait être l'acide abscissique.

En fin de culture (phase stationnaire), le milieu est pauvre en sels minéraux et l'apparition d'un inhibiteur pourrait jouer un rôle important pour arrêter le cycle cellulaire. On peut donc se demander si les cellules de Silène ne produiraient pas en fin de culture, en réaction au stress provoqué par le manque d'éléments nutritifs de l'acide abscissique, lequel jouerait un rôle dans le contrôle de la croissance des cellules.

Comme les variations des effets des PPA selon l'âge des cultures ne sont pas toujours faciles à expliquer, nous avons pensé que la croissance des cellules pourrait résulter du rôle antagoniste de certaines substances stimulantes ou inhibitrices.

C

ROLE PHYSIOLOGIQUE DES POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES
EXTRACELLULAIRES SUR LA CROISSANCE CELLULAIRE.

Quand des cellules d'Erable (Acer pseudoplatanus L.) cultivées en suspension sont prélevées en phase stationnaire et repiquées sur un milieu neuf, il se produit au cours de la phase de latence des changements profonds, correspondant en particulier à une augmentation de DNA, de RNA et de protéines (STREET, 1968).

Lorsque le milieu est conditionné, la culture est favorisée, mais on ne connaît pas la nature ni l'origine des facteurs qui interviennent dans le conditionnement du milieu.

Au cours de nos essais nous avons certes constaté que les PPA extraits du milieu de culture de cellules de Silène en phase stationnaire, augmentaient la biomasse de ces cellules, mais on pouvait se demander si cette stimulation était due à une augmentation du nombre de cellules, ou simplement à l'augmentation de taille de chacune d'elles ou encore à une stimulation à la fois du grandissement et de la division cellulaire.

Pour le vérifier, nous avons cultivé des cellules de Silène sur le milieu habituel auquel nous avons ajouté 50 µg/ml de PPA. Après 5, 9, 12 et 18 jours de culture nous avons déterminé non seulement le P.F. et le P.S. des cellules mais aussi le nombre et la taille de celles-ci (figure 19).

L'examen de la figure (A), permet d'observer une augmentation de la biomasse des cellules (P.F.) plus rapide en présence des PPA à partir du 5ème jour de culture. Cette augmentation continue jusqu'à la fin de la culture, les différences de R.F. sont significatives (seuil de 0,05) à partir du 9ème jour. On note également une augmentation du P.S. en présence

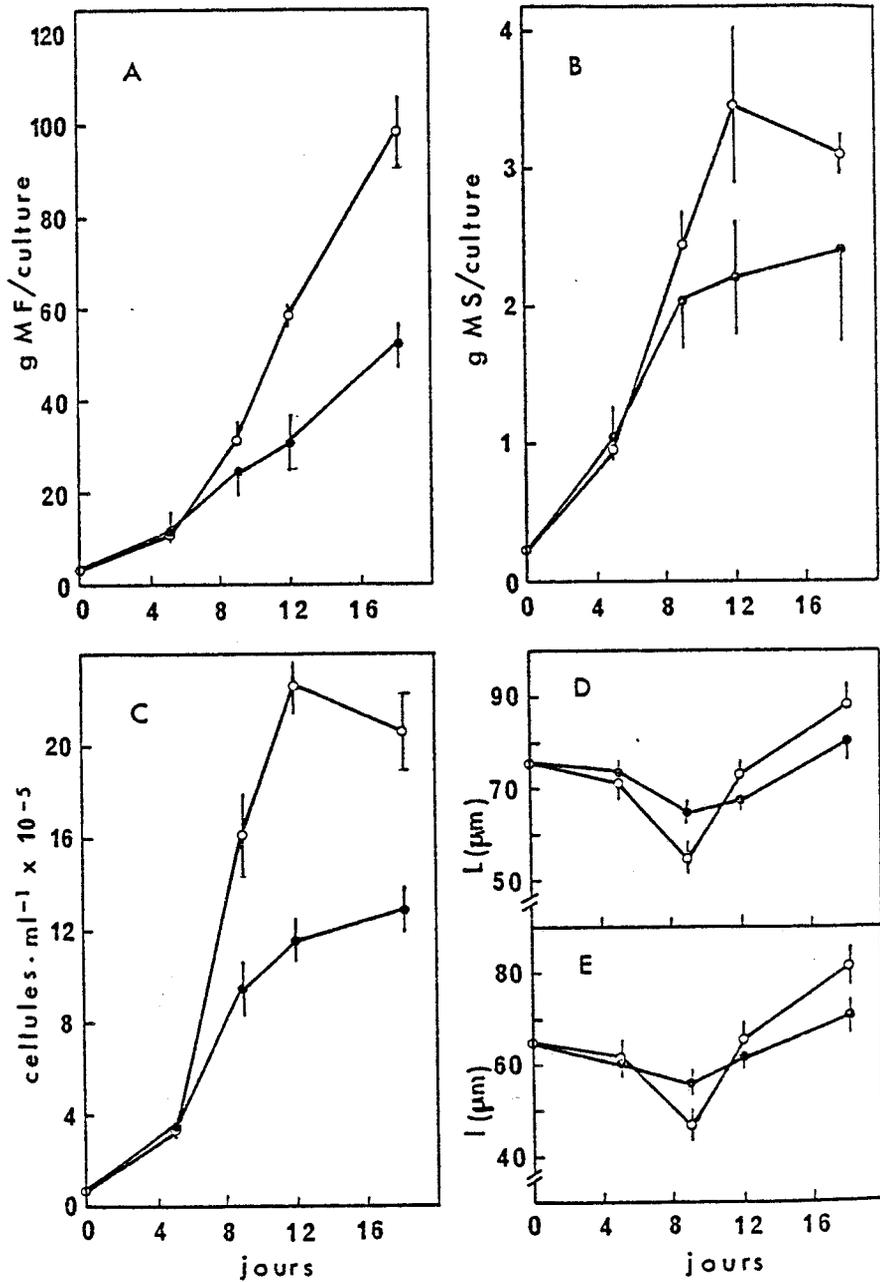


Figure 19:

Effets des PPA sur la croissance de la suspension cellulaire de Silène.

A : masse de matière fraîche (P.F.).

B : masse de matière sèche (P.S.).

C : nombre de cellules par millilitre de suspension.

D et E : taille des cellules.

L et l : représentent respectivement la plus grande et la plus petite dimension.

● milieu témoin

○ milieu contenant des PPA

des PPA à partir du 9ème jour, cette différence est significative (seuil de 0,05) ; le P.S. continue d'augmenter jusqu'au 12ème jour puis diminue ensuite. A l'inverse, celui des témoins continue d'augmenter, cela montre que la teneur en eau des cellules cultivées en présence des PPA est plus élevée au cours de cette dernière période de la croissance. (Tableau 6).

Durée (J)	P.S. (%)		EAU (%)	
	T	PPA	T	PPA
0	6,30	6,30	93,70	93,70
5	8,40	8,09	91,60	91,91
9	8,04	7,46	91,96	92,54
12	7,22	5,91	92,78	94,09
18	4,63	3,15	95,37	96,85



Tableau 6 :

Variation du pourcentage de matière sèche et de la teneur en eau des cellules de Silène cultivées en présence de PPA (50 µg/ml).

T : Témoin

En ce qui concerne le nombre de cellules par millilitre de milieu de culture, on note peu de différence jusqu'au 5ème jour. Du 5ème au 9ème jour, les divisions cellulaires en présence de PPA sont plus rapides (figure C), et bien que la taille des cellules soit plus faible que celle des témoins (figure D, E) à cette phase, les masses de P.F. et P.S. sont plus élevées pour les cultures en présence de PPA ; ces différences sont significatives au seuil de 0,05. Du 9ème au 12ème jour, les cellules continuent à se multiplier plus rapidement en présence des PPA (figure C) mais, paral-

lément, leur taille augmente (figure D et E). Enfin, du 12^{ème} au 18^{ème} jour, le nombre de cellules est plus faible dans les cultures ayant reçu initialement des PPA à cause de la lyse des cellules les plus âgées, qui sont aussi plus grandes et plus riches en eau. Tandis que la taille des cellules demeurant vivantes continue à augmenter, que les cellules soient cultivées ou non en présence de PPA (figure C, D, E). Les PPA interviennent également sur le pH du milieu de culture : Au 14^{ème} jour ; il est de $6,7 \pm 2$ au lieu de $7,4 \pm 2$ chez les témoins.

Ces résultats montrent une double action des PPA de Silène : ils stimulent à la fois la multiplication et le grandissement des cellules de Silène, l'effet sur le pH du milieu au cours de la culture n'est pas à négliger car nous savons que chez le Silène un pH supérieur à sept correspond à un ralentissement ou à un arrêt de la croissance (DUBOIS, 1980).

D

PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES POLYSACCHARIDES PECTIQUES
ACIDES EXTRACELLULAIRES.

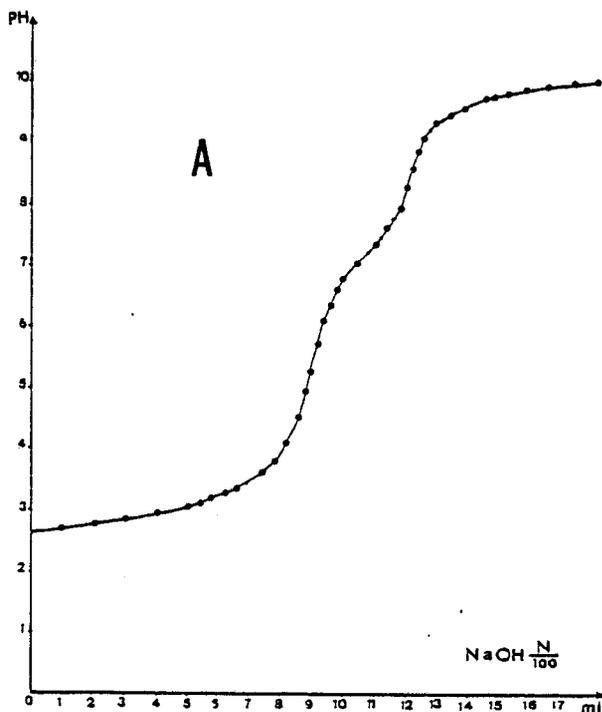
I - LES VARIATIONS DES COURBES DE TITRAGES SELON L'AGE DE LA CULTURE

Dans les essais précédents, nous avons défini les PPA en fonction de leur teneur en acides uroniques dans la mesure où ils sont représentatifs de la fraction précipitable au cetavlon, et où ils évoluent tout à fait parallèlement à la croissance de la suspension cellulaire. C'est en se référant à l'acide uronique également, que nous avons déterminé la quantité qu'il fallait introduire dans le milieu de culture pour stimuler la croissance cellulaire.

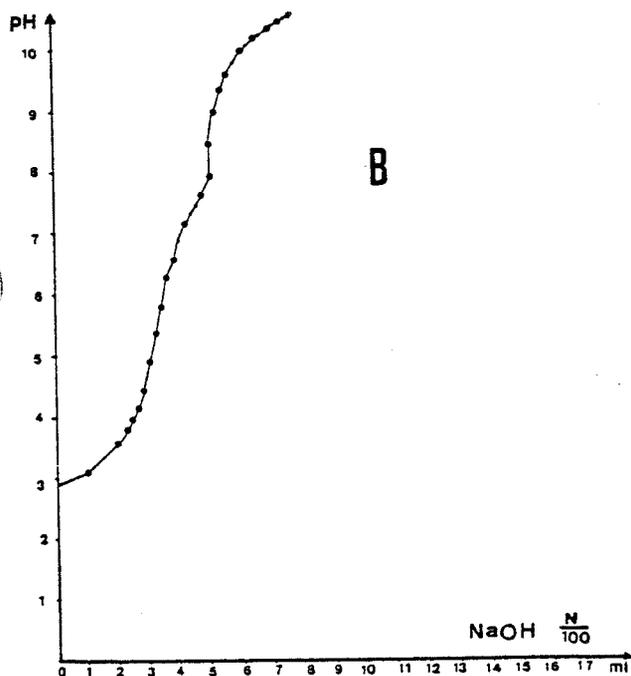
Il est intéressant de pouvoir caractériser aussi simplement que possible les propriétés physicochimiques de ces polymères acides. Nous avons envisagé de neutraliser les polymères extracellulaires provenant de cultures de cellules de Silène âgées de 6 jours (phase exponentielle de la croissance), de 10 jours (fin de la phase exponentielle et début de phase stationnaire), et de 14 jours (fin de culture).

Principe du titrage : Les PPA sont convertis sous forme H^+ par passage sur une résine échangeuse Dowex. Lorsque l'on ajoute la base de titrage, le système est le siège de deux équilibres simultanés : échange de protons métalliques avec les polysaccharides pectiques acides et neutralisation des protons par les OH^- de solution.

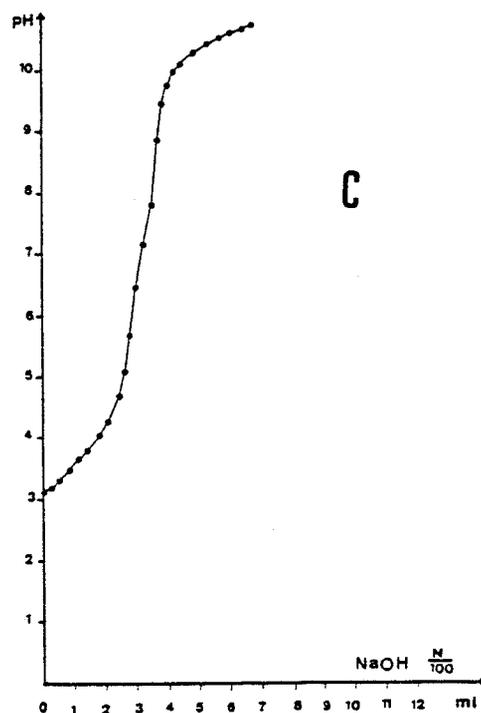
Titration des PPA : Les PPA H^+ sont mis en suspension homogène dans un volume déterminé d'eau désionisée. Cette suspension est titrée directement dans une cellule spéciale à injection automatique dans des conditions parfaitement définies de température et d'agitation en présence d'azote.



PPA prélevés au 6ème jour de la culture
(phase exponentielle).



PPA prélevés au 10ème jour de la culture
(fin de la phase exponentielle).



PPA prélevés au 14ème jour
(fin de culture).

Figure 20 : Courbes de neutralisation des PPA prélevés après différents temps de culture de la suspension cellulaire de Silène.

Après chaque addition de l'agent titrant, ($N \text{ acH } \frac{N}{100}$), le pH de la solution est mesuré après une agitation de 30 secondes et un temps de repos de même durée.

Les résultats obtenus font apparaître deux points essentiels : Pendant la phase exponentielle (6ème jour) la courbe de titration des PPA présente deux points d'inflexion correspondant à deux fonctions acides dont le pKa est respectivement de 5,5 et de 8,7 (figure 20, A). A la fin de la phase exponentielle et au début de la phase stationnaire (10ème jour de culture), la courbe de titration commence à se redresser et elle présente encore deux points d'inflexion, correspondant à des valeurs de pKa de 4,15 et 10,2 (figure 20, B). A la fin de la culture (14ème jour), la courbe de neutralisation s'est considérablement redressée et ne présente plus qu'un seul point d'inflexion pour une valeur de pKa de 6,7 (figure 20, C) (les expériences ont été répétées trois fois).

L'obtention des courbes multiphasiques n'est pas surprenante puisqu'on sait qu'un diacide présente normalement une telle propriété. De plus, ce phénomène a déjà été observé par MORVAN . (1977, 1983) avec des parois isolées de Lentilles d'eau préalablement mises sous forme H^+ . Ces courbes de titrage présentent deux points d'inflexion principaux pour les parois récoltées en phase exponentielle, et un seul point d'inflexion pour les parois récoltées en phase stationnaire. L'auteur suppose qu'il existe deux types d'acides : les premiers, relativement forts, représenteraient les acides uroniques, les seconds, plus faibles, correspondraient à des protéines, des phénols ou des acides gras. Selon lui, un seul point d'inflexion peut aussi correspondre à deux acides différents mais dont les pKa

seraient voisins.

D'autres travaux ont été faits sur des fractions pectiques extraites des parois d'une suspension cellulaire de carotte (ASAMIZU et al., 1984). Les auteurs font état d'une évolution du poids moléculaire et de la charge des polymères constituant cette fraction au cours de la culture. Au début de la phase logarithmique, ils observent un acide faible présent à la fois dans les fractions lourdes et légères. En fin de culture, ils trouvent la trace d'un acide faible dans la fraction lourde et d'un acide fort plus ionisable dans la fraction légère. Ces observations ont été expliquées par la déméthylation des acides uroniques au cours de la culture, ce qui montrerait le rôle important des acides déméthylés sur le maintien de la structure pariétale.

La majorité des auteurs (BECKER et al., 1964 ; OLSON et al., 1969 ; BAUER et al., 1973 ; TAKEUCHI et KOMAMINE, 1978, 1980 a) considère que les polymères extracellulaires excrétés dans le milieu de culture sont à l'image de ceux qui constituent la paroi. Nos résultats confirmeraient l'origine pariétale des polymères et la poursuite de la sécrétion de PPA depuis le début jusqu'à la fin de la culture.

Il y a une corrélation entre les courbes de titration et le stade de croissance des cellules.

On peut donc déterminer dans quelle phase de croissance sont les cellules au moyen de la titration de leur PPA.

II - SEPARATION DES POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES DE SILENE, SUR GEL SEPHADEX G25

Des recherches entreprises avec des colonies tissulaires ont permis d'établir que ces colonies émettent dans le milieu de culture des substances susceptibles de chélater le fer, et de maintenir la croissance des racines (HELLER et al., 1968) ; des essais de fractionnement par dialyse et chromatographie sur DOWEX 50 et AMBERLITE IR45 ont montré que les différentes fractions sont toutes capables de maintenir le fer assimilable. Cependant c'est la fraction anionique (acides organiques) qui forme les complexes les plus stables (HELLER et al., 1968).

La découverte des composés polysaccharidiques excrétés dans le milieu de culture des suspensions cellulaires a permis à Mc NEIL et al. (1984) de suggérer que les polysaccharides extracellulaires sont une excellente source pour étudier les polysaccharides pariétaux, parce que ces composés sont identiques à ceux qui proviennent de la paroi cellulaire. Ayant très peu de renseignements sur leur rôle précis sur la croissance cellulaire, YORK et al., (1984) ont fractionné les polysaccharides excrétés dans le milieu de culture d'une suspension cellulaire d'Acer pseudoplatanus.L, puis ils ont étudié l'effet de ces fractions sur la croissance de la plante ; la fraction xyloglucane s'est révélée inhibitrice de la stimulation provoquée par le 2,4-D.

Malgré les essais réalisés pour préciser le rôle physiologique des différentes fractions polysaccharidiques extracellulaires, il est difficile d'expliquer l'effet stimulant des PPA de Silène sur la croissance cellulaire.

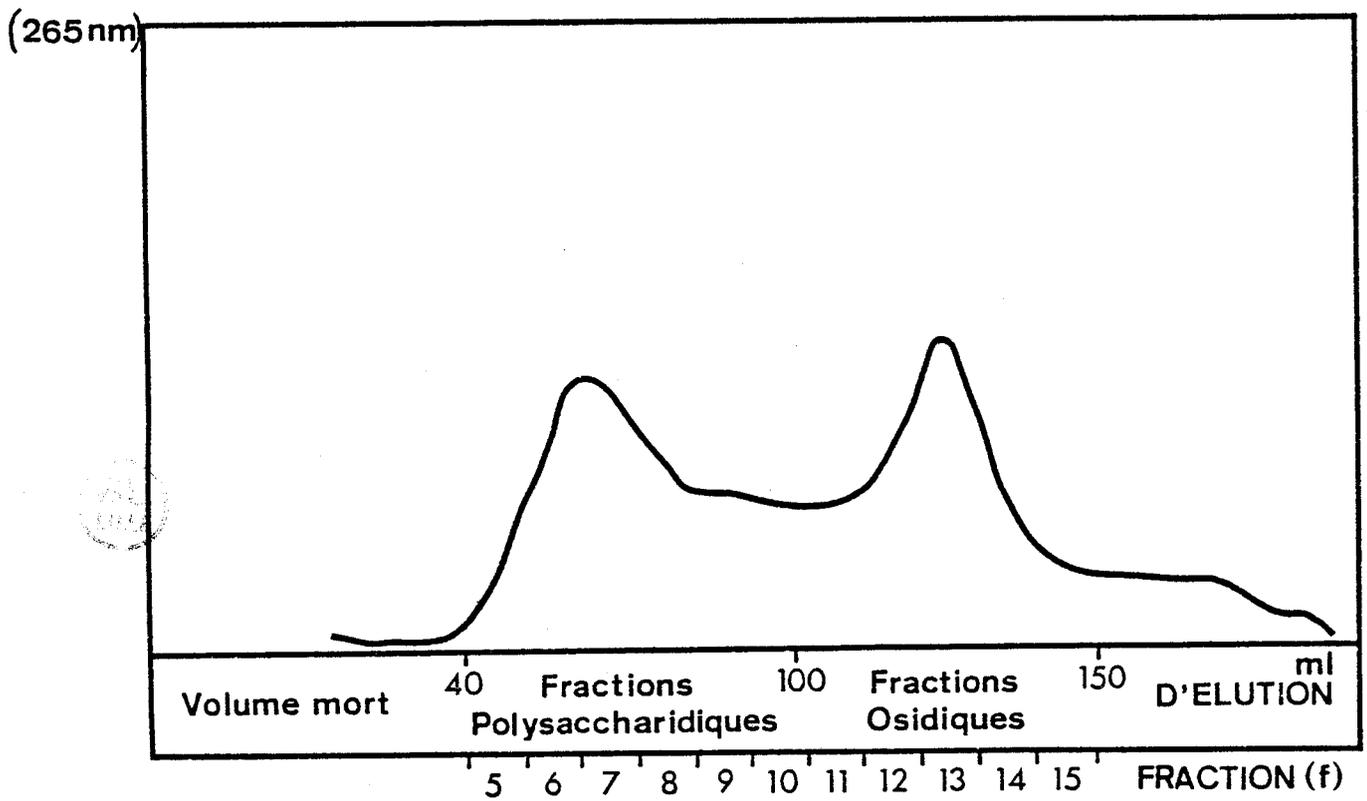


Figure 21 - Chromatogramme de la fraction précipitée au cétavlon des PPA de Silène sur gel de sephadex G25
 f.5, 6, 7... 15 présentent chacune 10 millilitres de volume d'élution.

On pourrait donc se demander si cette stimulation n'était pas due à la nature chimique même de ces polymères. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié successivement l'effet des PPA séparés en plusieurs fractions sur la croissance, afin de savoir, si le fractionnement des PPA peut augmenter, réduire ou supprimer l'effet stimulant, puis en déterminant la nature des fractions actives nous pourrions espérer avoir une idée de leur mode d'action sur la croissance.

On a commencé par une séparation simple du milieu de culture sur une colonne de Sephadex G25, qui permet de séparer les molécules à haut poids moléculaire (polysaccharides extracellulaires) présentes dans les premières fractions des oses rédisuels localisés dans les fractions plus tardives.

Les PPA de Silène sont injectés dans la colonne de G25 reliée à une cellule spectrophotométrique (265 nm). On récupère le volume d'élution : les premiers 40 ml représentent le volume mort et sont éliminés ; puis c'est le volume d'élution qui représente le premier pic et qui correspond aux fractions polysaccharidiques (figure 21) ; à la fin, le reste du volume d'élution représente le deuxième pic qui correspond aux fractions osidiques légères avec les sels minéraux. On recueille les volumes d'élution

dans des tubes de 10 ml correspondant chacun à une fraction (figure 21). après avoir éliminé 40 ml de volume mort. Chaque fraction a été introduite à plusieurs concentrations dans des fioles de culture de Silène, pour étudier leur effet sur la croissance. Les résultats réunis dans le tableau présentent la croissance P.F. et P.S. la plus élevée pour chaque fraction (les autres valeurs n'ont pas été notées sur le tableau).

Référence	P.F. (g)/fiolle de culture	P.S.(g)/fiolle de culture
f.5	103,8	4,3
f.6	63,4	3,3
f.7	62,2	3,2
f.8	80,1	3,6
f.9	80,0	3,7
f.10	61,0	3,5
f.11	75,1	3,6
f.12	85,3	4,2
f.13	70,1	3,4
f.14	72,6	3,5
f.15	69,9	3,1
T	73,3	3,5
T + PPA normaux	86,9	4,1

Tableau 7 :

Effets des fractions du milieu de culture de Silène passées sur une colonne de séphadex G25 sur la croissance de Silène.

f.5, f.6, f.7, ... f.15 correspondent aux fractions des PPA recueillies successivement exprimées chacune par 10 ml de volume d'élution.

P.F. = poids de matière fraîche

P.S. = poids de matière sèche.

Cette expérience préliminaire montre que deux fractions stimulent la croissance des suspensions cellulaires ; la première est une fraction de poids moléculaire lourd (5ème fraction) qui correspond à des polysaccharides (Tableau 7) ; la deuxième est une fraction osidique d'un poids moléculaire léger (12ème fraction), les autres fractions n'exercent qu'une légère stimulation, voire même une faible inhibition. Bien que les PPA stimulent la croissance, cette expérience montre que leur fractionnement sur sephadex G25 donne une fraction f.5 qui stimule encore plus la croissance. Ceci suggère la possibilité d'élimination de certains inhibiteurs.

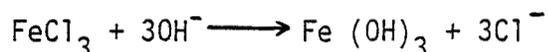
En fait, la séparation des PPA n'a pas donné tous les résultats escomptés, par suite de difficultés techniques qui nous ont empêchés de poursuivre la séparation et de déterminer la nature des fractions actives.

E

MODE D'ACTION DES POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES
SUR LA CROISSANCE.

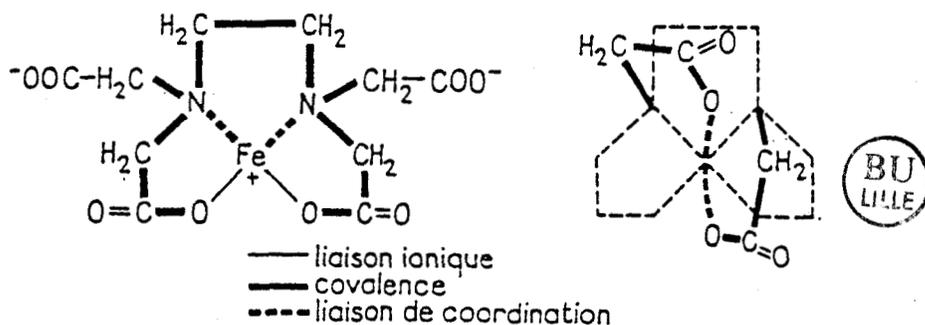
I - EFFET DES POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES SUR LA CHELATION DU FER

L'alimentation en fer des plantes cultivées sur milieu artificiel est toujours délicate dès qu'on atteint un pH supérieur à 5,2, car le fer commence alors à précipiter et à former des hydroxydes insolubles (HELLER et RICHEZ, 1959).



L'existence de certains complexes, les chélats, permet de surmonter cette difficulté. Ce sont des complexes organométalliques très stables où le métal est inséré dans une molécule complexante (chélateur) par des liaisons diverses ioniques, attraction électrostatique et liaison de coordination.

Le chélateur le plus utilisé est l'acide éthylène-diamine-tétra-acétique (EDTA), On a recours aussi parfois à l'acide citrique comme chélateur très léger.



— Chélation du fer par l'EDTA.

A gauche: chélat tétradenté; à droite: chélat hexadenté.

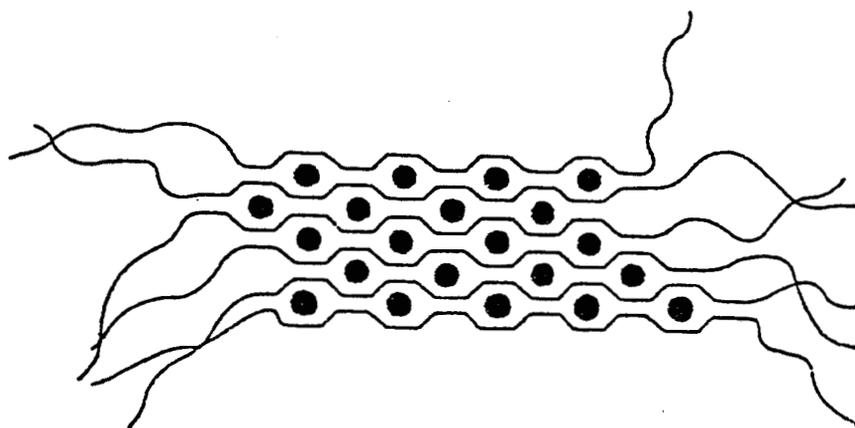


Figure 22 :
Modèle "egg-box" de chélation de Ca⁺⁺ (●) par l'acide
alginique ou par l'acide polygalacturonique.

(d'après GRANT et al., 1973)

Les travaux de GUMINSKI et al., (1977), GUMINSKI et SULEJ (1979) ont montré que les humates ont un rôle biologique important en activant la croissance des plantes et en maintenant le fer en solution grâce aux groupes phénolique, hydroxyle et carboxyle. Par ailleurs, dans la paroi cellulaire les polysaccharides acides peuvent fixer certains ions ou former des liaisons intermoléculaires. Parmi les divers mécanismes suggérés pour expliquer cette fixation, l'un proposé par GRANT et al. (1973) concerne le modèle "egg-box" de REES pour l'acide polygalacturonique et polyglucuronique. En effet l'interaction entre un ion divalent et deux carboxyles appartenant à deux chaînes différentes se traduit par une liaison intermoléculaire (figure 22). De même, WUYTACK et GILLET (1978) montrent que la paroi primaire de Nitella flexilis contient du Ca^{++} probablement chélaté par les anions COO^- et des donneurs comme OH (d'origine polysaccharidique) et NH_4^+ (d'origine protéinique). HELLER et RICHEZ (1959) font état de travaux avec des colonies tissulaires montrant que les tissus végétaux en culture excrètent dans la solution nutritive un produit qui maintient le fer en solution, et qui permet la croissance des racines isolées dans des milieux à pH 5,2 où normalement le fer précipite. Comme les PPA sont d'origine pariétale, qu'ils sont sécrétés dans le milieu de culture, et qu'ils contiennent des groupes COO^- , OH et NH_4^+ , il nous a semblé qu'ils pouvaient être susceptibles de participer aussi à la chélation de certains ions.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons étudié si les PPA de Silène pouvaient remplacer l'EDTA comme chélateur du fer dans les milieux de culture.

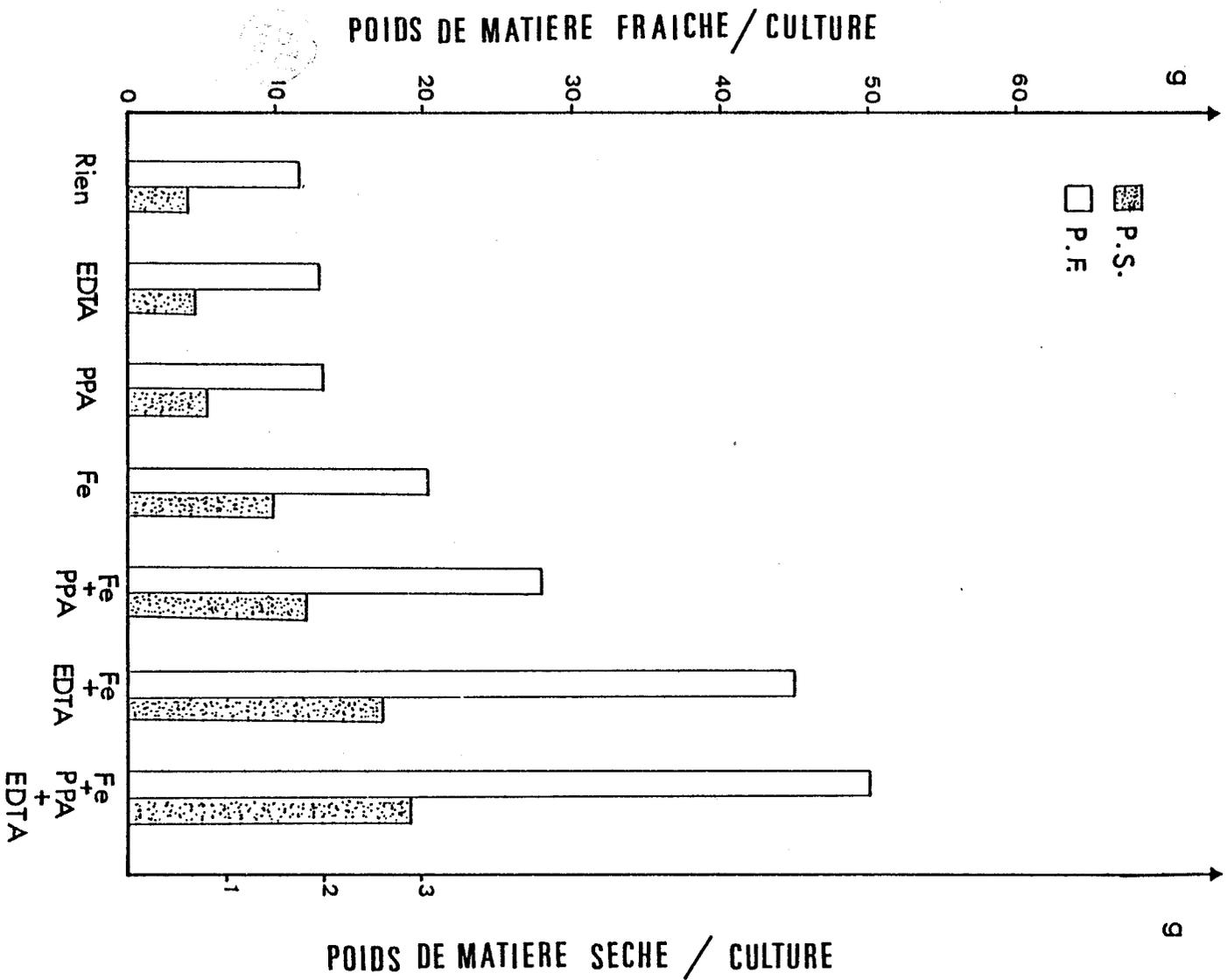


Figure 23 :

Effets des PPA sur la chélation de fer exprimée par l'évolution des poids de matière fraîche (P.F.) et de matière sèche (P.S.).

1. Effet des polysaccharides pectiques acides normaux sur la chélation de fer.

Nous avons doncensemencé des cellules de Silène dans le milieu habituel, mais sans fer ni EDTA, afin de les carencer au cours de deux passages successifs sur le même milieu. Ces cellules ont été utilisées pour effectuer notre expérience. Des PPA de Silène ($50 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) ont été introduits dans le milieu habituel à la place de l'EDTA, en présence de FeSO_4 comme source de fer, le pH est ajusté à 6 . La croissance est comparée à celles obtenues sur les milieux suivants :

- 1 - milieu habituel + EDTA + FeSO_4
- 2 - milieu habituel + FeSO_4 seulement
- 3 - milieu habituel + EDTA seulement
- 4 - milieu habituel + PPA seulement
- 5 - milieu habituel + EDTA + FeSO_4 + PPA
- 6 - milieu + PPA + FeSO_4
- 7 - milieu sans chélateur ni fer

La croissance exprimée en P.F. et P.S. est mesurée au 14ème jour de la culture. Les résultats réunis sur la figure 23 montrent que les cellules carencées par 2 passages sur un milieu sans fer ne prolifèrent plus sur un milieu qui n'en contient pas, d'où le rôle important du fer sur la croissance. Le chélateur seul (EDTA) ou les PPA seuls (sans source de fer) n'ont pas d'effet sur la croissance. Le fer seul, stimule la croissance, mais moins bien qu'en présence d'un chélateur. Cet effet a été signalé par LEGRAND (1975) sur des fragments de feuilles d'Endive. Le fer

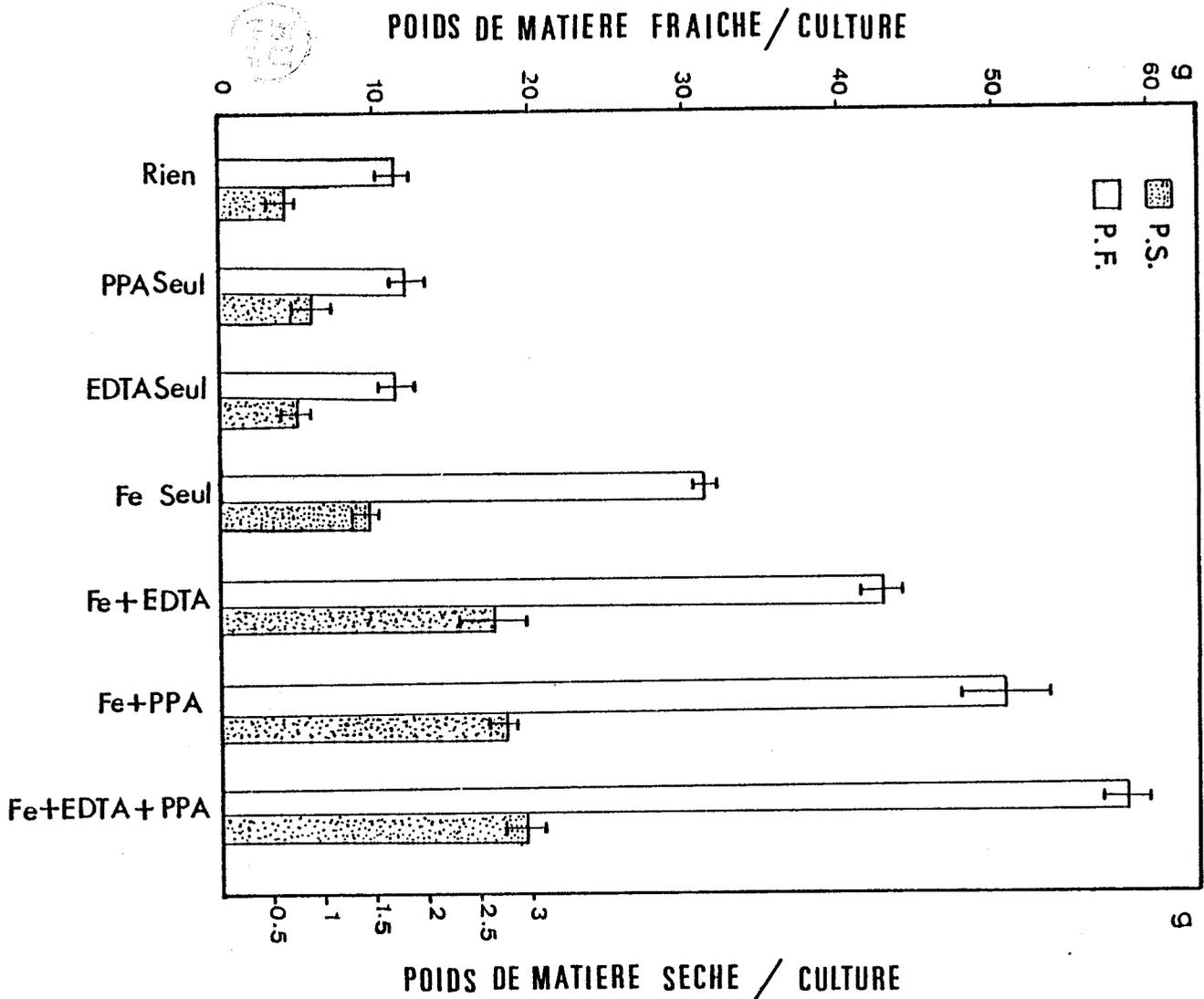


Figure 24 : Effets des PPA passés sur gel sephadex G 25 sur la chélation de fer exprimés par l'augmentation des poids de matière fraîche (P.F.) et de matière sèche (P.S.).

chélaté par l'EDTA stimule mieux la croissance que le fer qui ne l'est pas, ce qui montre le rôle intéressant des chélateurs. Si on remplace l'EDTA par les PPA on retrouve l'effet stimulant de la croissance exprimé en P.F. et P.S. par rapport au fer non chélaté, mais cette stimulation est moins importante qu'en présence d'EDTA. Bien que l'EDTA exerce un effet favorable sur la croissance en maintenant le fer en solution, on constate que l'association EDTA-PPA favorise encore mieux la croissance.

2. Effet des polysaccharides pectiques acides fractionnés sur gel sephadex G25 sur la chélation du fer.

Comme il a été montré précédemment que la séparation des PPA sur gel de Séphadex G25 donne une fraction (f.5) dont l'effet stimulant est plus important sur la croissance que celui des PPA normaux avant séparation, nous avons essayé à partir de ces résultats de chercher si cette réaction peut améliorer ou non l'effet chélateur des PPA vis-à-vis du fer. On a répété l'expérience précédente, qui concerne l'effet chélateur des PPA en remplaçant ces derniers par la fraction des f.5 des PPA obtenue après la séparation tout en maintenant les mêmes conditions expérimentales. La figure 24 permet de constater que la fraction f.5 des PPA favorise la croissance des cellules de Silène en absence de l'EDTA et en présence du $FeSO_4$ comme source de fer ; cet effet sur la croissance est plus intéressant que celui provoqué par l'EDTA et que celui des PPA normaux avant séparation. L'ensemble de nos résultats montre que les PPA ont un rôle physiologique sur la croissance en chélatant le fer, Ce rôle devient plus important après leur fractionnement, ce qui suggère l'élimination de certains inhibiteurs de la croissance après séparation. De même, on remarque qu'en

associant les PPA normaux ou fractionnés à l'EDTA on favorise encore mieux la croissance dans la mesure où leurs effets sont complémentaires, parce que l'EDTA peut avoir un effet toxique sur la croissance. LEGRAND (1975) étudiant l'effet de l'EDTA sur le phénomène d'organogénèse d'Endive, montre qu'une forte dose de l'EDTA a un effet toxique sur le bourgeonnement, précisant ainsi qu'il faut pour la culture de l'endive une concentration 5 fois plus faible que celle utilisée dans la solution nutritive de MURASHIGE et SHOOG (1962).

3. Effets des polysaccharides extracellulaires sur la croissance des racines des plants d'Endive en absence de l'EDTA.

HELLER et al. (1968) montrent que les tissus végétaux excrètent des métabolites organiques qui maintiennent la croissance des racines en absence de chélateur. L'origine et la nature de ces métabolites secrétés dans le milieu n'ont pas été précisées.

Partant de ces données bibliographiques, nous avons vérifié si les PPA de Silène avaient ou non, un effet sur la croissance des racines.

Les PPA à la concentration $100 \mu\text{g/ml}^{-1}$ ont été introduits dans le milieu de culture de HELLER dilué deux fois sans EDTA. Des racines des plants d'Endive ont été plongées dans le milieu liquide à l'aide d'un support de papier filtre, pendant 60 jours (sous condition aseptique).

Les résultats ont montré que les PPA jouent un rôle important sur la croissance des racines d'Endive, exprimée en augmentation du P.F. et

P.S. (tableau 8) confirmant ainsi les résultats de HELLER et al. (1968).

	P.F. mg	P.S. mg
milieu témoin	256	21
milieu + PPA	425	34

Tableau 8 :

Effets des PPA sur la croissance des racines exprimée en poids de matière fraîche (P.F.) et en poids de matière sèche (P.S.). Les résultats correspondent à la moyenne des P.F. et P.S. d'une racine.



II - EFFET TAMPON DES POLYSACCHARIDES EXCRETES PAR LES CELLULES DE SILENE

Comme les colonies tissulaires (GAUTHERET, 1959), les cellules en suspension ont tendance au cours de la culture, à ajuster le pH de leur milieu pour être toujours proche de la neutralité (DUBOIS, 1980) ; c'est-à-dire qu'ils acidifient le pH trop alcalin et alcalisent le pH trop acide (figure 25).

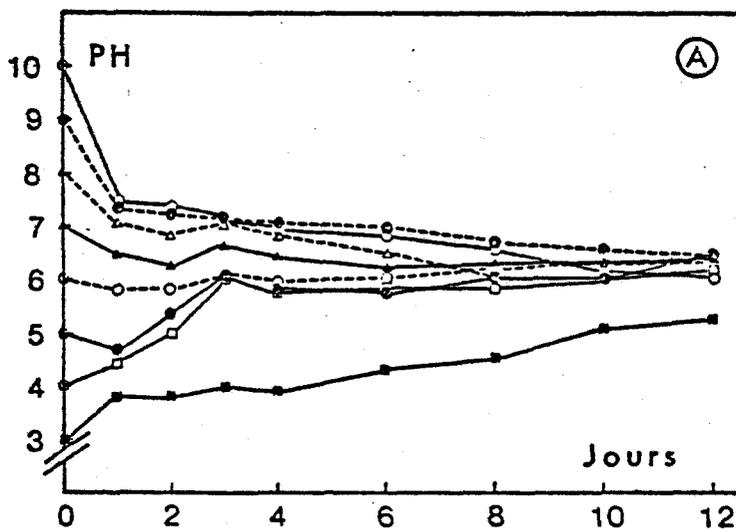


Figure 25:

Effet de la valeur du pH initial du milieu sur l'évolution du pH du milieu, au cours du cycle de croissance.

DUBOIS, 1980.

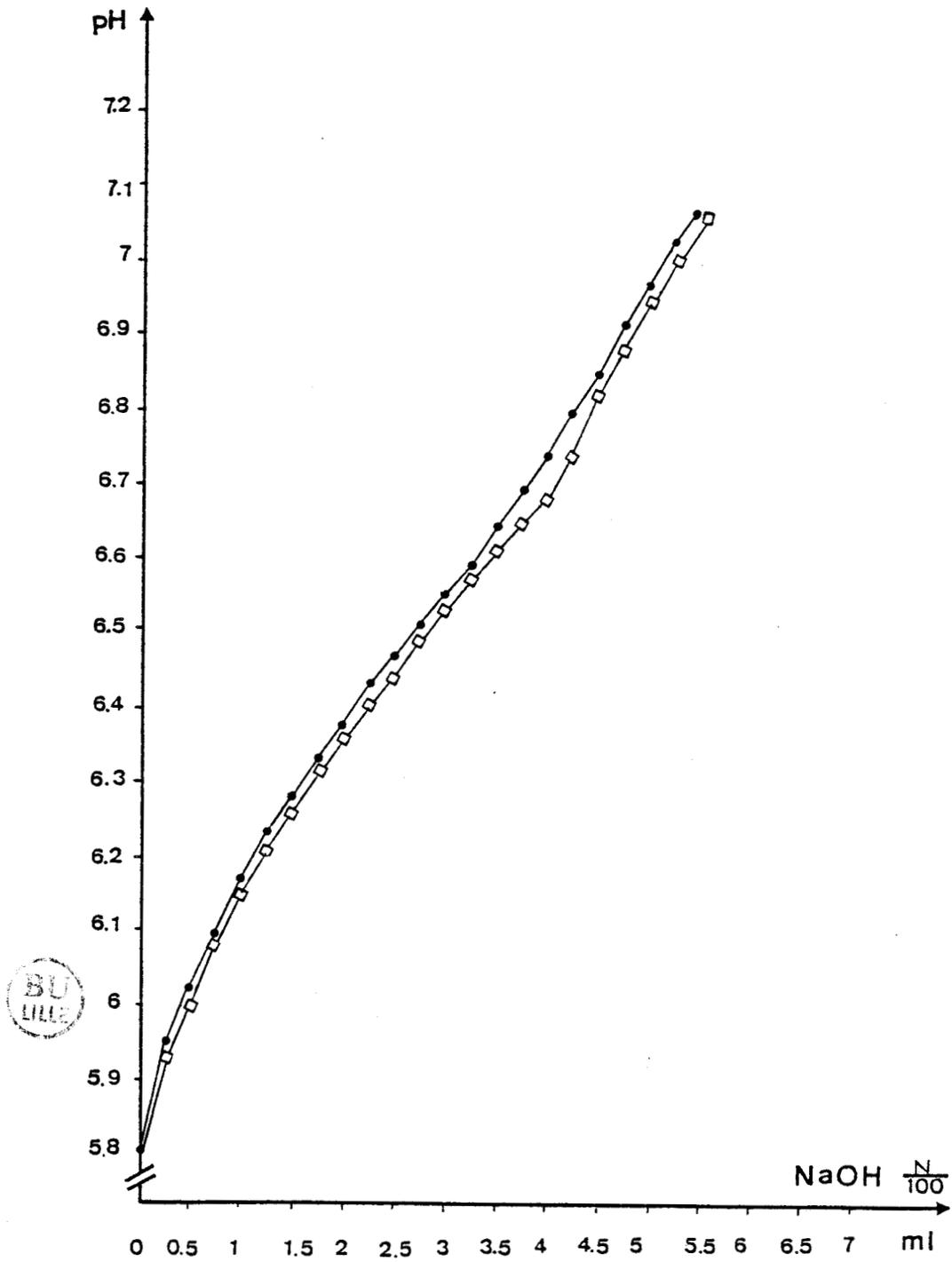


Figure 26 :

Effets des PPA de Silène sur l'évolution du pH du milieu en présence de NaOH N/100.

- Témoin : milieu normal.
- Milieu + PPA 50 µg/ml.

En mesurant le pH du milieu au cours de la culture, nous avons constaté que la présence des PPA ralentit ce phénomène puisque le pH était de $6,7 \pm 0,2$ en présence des PPA au lieu de $7,4 \pm 0,3$ chez les témoins. Cela indique un effet favorable sur la croissance des cellules de Silène, qui est optimale normalement à pH compris entre 4 et 6 (DUBOIS, 1980).

Il est bien connu que le tampon évite la modification du pH quand on ajoute un acide ou une base. Les PPA contenant des groupes tels que $-COO^-H^+$; $COO^-C a^{++}$; $COO^-CH_3^+$; COO^- , et des groupements "amphotères" comme les glucoprotéines susceptibles de s'ioniser selon le domaine de pH étudié, pourraient jouer un rôle de tampon dans les conditions défavorables de pH et de force ionique. Pour vérifier cela, on utilise 30 ml de milieu de Lescure renfermant des PPA à la concentration habituelle $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de milieu (dose utilisée pour les essais de stimulation) par rapport à un témoin contenant 30 ml de milieu de Lescure. Ces deux milieux ont reçu des $\text{NaOH} \frac{N}{100}$ directement. Cette expérience a été réalisée dans une cellule spéciale dont la température et l'agitation sont définies, en présence de l'azote, l'addition des $\text{NaOH} \frac{N}{100}$ étant automatique. Quand on ajoute $\text{NaOH} \frac{N}{100}$ le pH est mesuré après une agitation de 30 secondes et un temps de repos de même durée.

On constate que les écarts entre le pH du milieu contenant des PPA et celui du témoin sont effectivement très petits (figure 26), par rapport aux valeurs qui ont été obtenues au cours de nos expériences précédentes, lorsque les PPA étaient introduits dans le milieu de culture à la même concentration ($50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) en présence des cellules de Silène ;

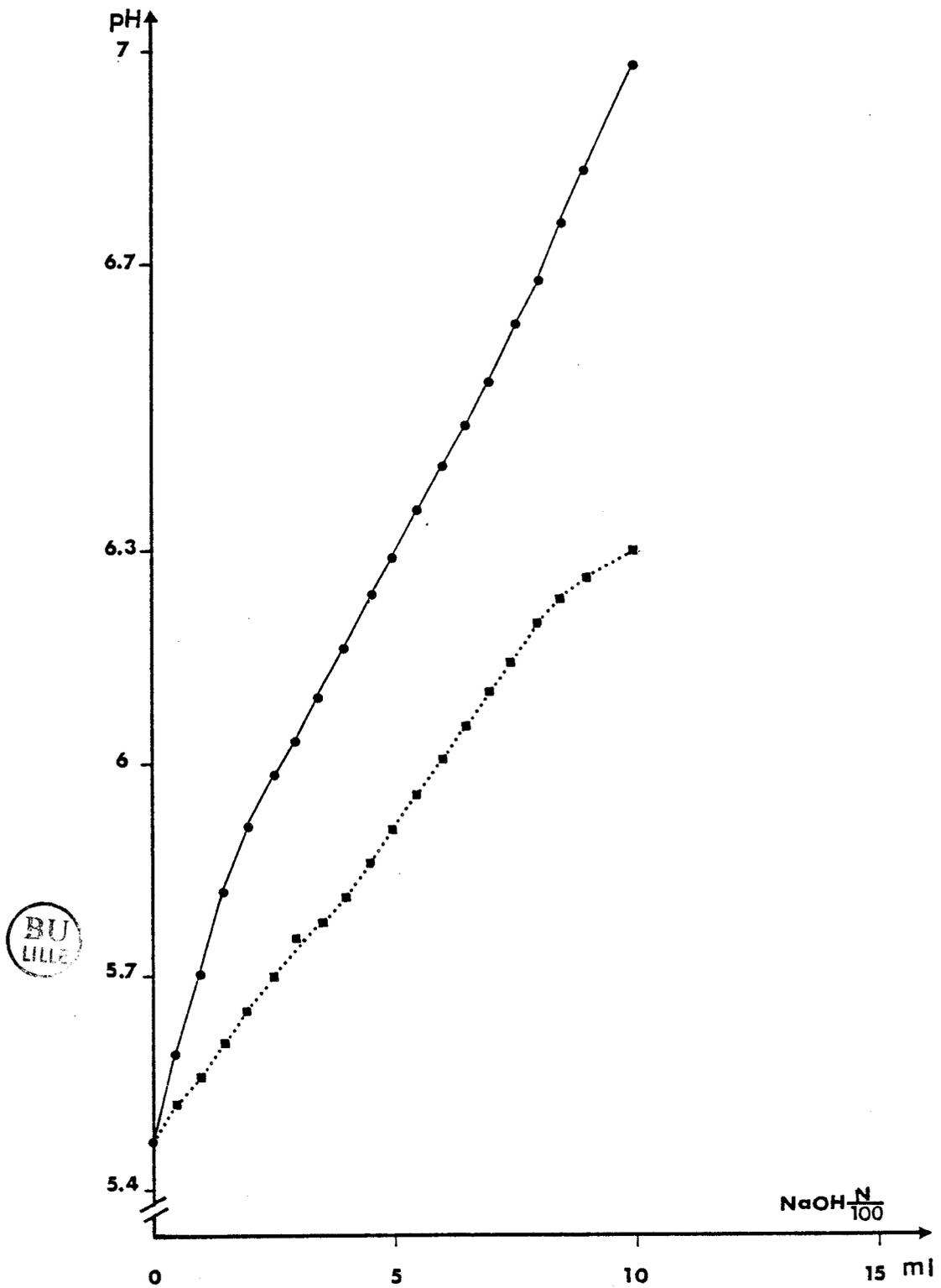


Figure 27 :

Effets des PPA de Silène sur l'évolution du pH du milieu en présence de NaOH N/100.

- Témoïn : milieu normal.
-■ Milieu + PPA 1500 µg/ml.

le pH était alors de $6,7 \pm 0,2$ en présence des PPA et $7,4 \pm 0,3$ dans le milieu témoin. Cette expérience nous permet de penser que les variations du pH observées précédemment pourraient être dues à la modification des conditions d'équilibres ioniques du milieu de culture en présence des cellules, et à l'effet provoqué par les nouveaux PPA sécrétés par ces dernières pendant leur croissance (parce que le pH était mesuré en fin de culture). Cette modification fait apparaître un éventuel effet des PPA sur le changement du pH par rapport aux PPA introduits dans un milieu de culture neuf utilisé dans cette expérience.

Pour bien confirmer l'effet tampon des PPA nous avons répété l'expérience en augmentant la concentration des PPA dans la solution utilisée. On a commencé par 30 ml de milieu habituel renfermant des PPA à la concentration $1500 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ par rapport à un témoin contenant 30 ml de milieu. En ajoutant 10 ml de $\text{NaOH} \frac{\text{N}}{100}$ dans la solution qui contient les PPA on atteint un pH de 6,3, tandis que dans celui du témoin, on atteint un pH de 6,99 en ajoutant la même quantité de $\text{NaOH} \frac{\text{N}}{100}$ (figure 27). La différence des valeurs de pH obtenue confirme l'existence d'un effet tampon pratiqué par les polysaccharides extracellulaires.

III - ACTIVITE GIBBERELLINIQUE

1. Mise en évidence de substances ayant une activité gibbérellinique excrétées dans le milieu de culture.

Il est généralement admis que les végétaux supérieurs contiennent des gibbérellines endogènes. Ces substances sont réparties de façon plus ou moins importante selon les organes. Les sites de synthèse peuvent être divers d'autant plus que la plante possède souvent plusieurs gibbérellines. De nombreux travaux effectués sur des suspensions cellulaires montrent que l'acide gibbérellique stimule le taux des divisions cellulaires et entraîne une réduction de la taille des cellules chez l'Erable (DIGHBY et al., 1964). Cependant, au niveau des cultures de Rosier et d'Epinard, cet acide gibbérellique entraîne surtout un grandissement cellulaire (FRY et STREET, 1980). Chez le Silène il stimule à la fois la multiplication et le grandissement cellulaire (BRASSART et al., 1982).

Les travaux de MARIE et al. (1984) effectués sur le Silène ont révélé un effet semblable à celui observé par BRASSART et al. (1982) en utilisant non pas la gibbérelline mais les PPA (chapitre C). Par ailleurs les travaux de MORVAN (1982), FRY (1980) montraient qu'aussi bien les PPA que l'acide gibbérellique (AG_3) stimulent la croissance et la sécrétion de nouveaux PPA dans le milieu de culture, ce qui suggérerait que ces deux substances ont probablement le même effet. Par ailleurs, au cours de la culture de jeunes plants de Tomate sur la solution minérale de HOAGLAND et SNYDER, les racines libèrent dans le milieu nutritif, des molécules qui présentent une activité de type gibbérellinique décelable

TEST LAITUE

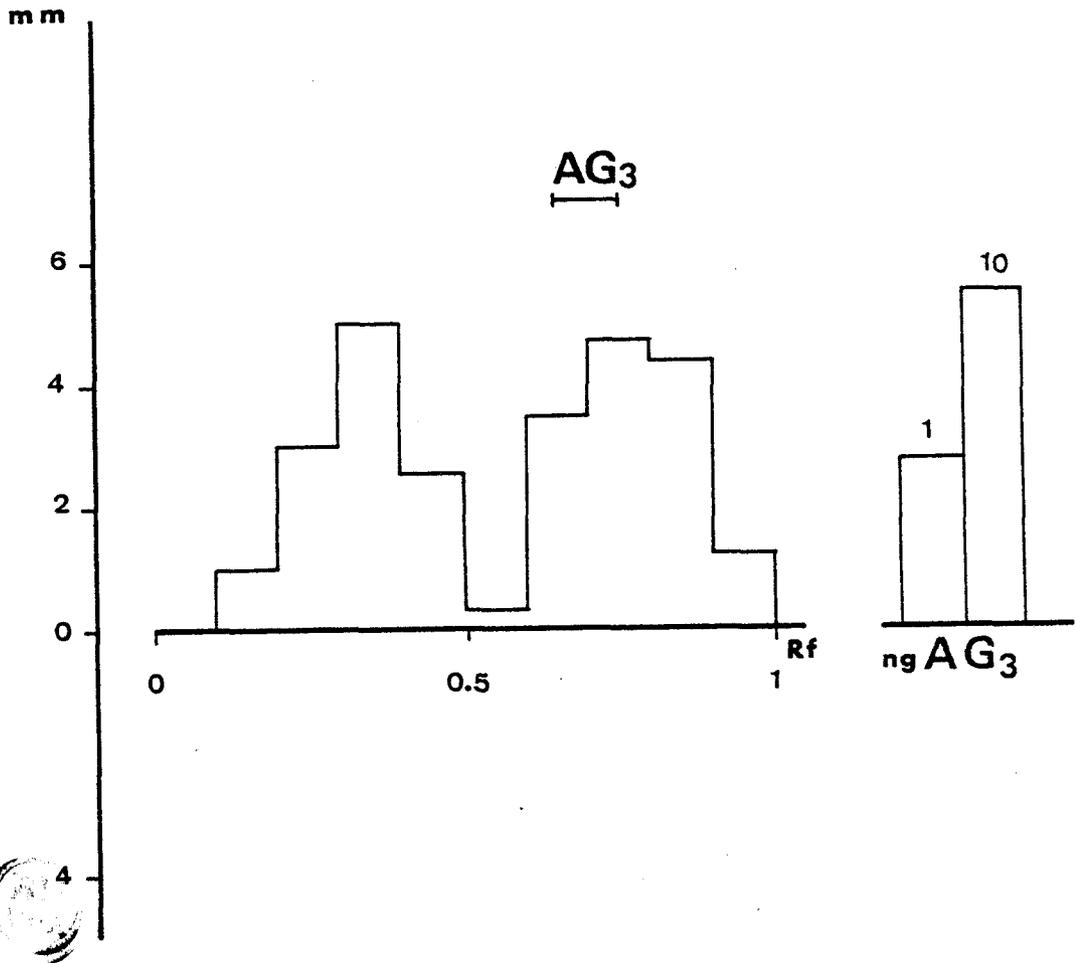


Figure 28:

Activité gibbérellinique déterminée par le test "laitue" (cultivar batavia dorée de printemps) dans le milieu de culture d'une suspension cellulaire de Silène.

en ordonnée : longueur moyenne de 10 hypocotyles de laitue cultivées en présence de l'extrait chromatographié du milieu - Longueur moyenne de 10 hypocotyles de laitues cultivées en présence du solvant chromatographié.

grâce à deux tests biologiques (COUILLEROT et YI, 1985). C'est ce qui nous a amené à penser qu'il pouvait exister une relation entre PPA et gibbérellines ou que les PPA pouvaient être liés à certaines substances de types gibbérelliniques.

Pour confirmer cette hypothèse, on a essayé dans un premier temps de chercher si les cellules de Silène, libèrent une substance de type gibbérelline dans le milieu. Les gibbérellines sont extraites à partir des résidus du milieu de culture de Silène en fin de croissance (14ème jour) obtenus directement après évaporation sous vide du milieu. L'extraction est faite successivement par le méthanol à 80 % qui solubilise certaines gibbérellines ; les gibbérellines-glucosides et les sucres, puis l'acétate d'éthyle qui est également un bon solvant des gibbérellines.

L'activité des extraits est mesurée grâce à deux tests biologiques : "test laitue" et "test d'albumen" d'orge. L'ensemble des résultats réunis sur les figures 28 et 29 montrent que les deux tests utilisés permettent de déceler plusieurs pics d'activité gibbérellinique dans le milieu de culture, et que l'activité globale obtenue par le "test laitue" (déterminé par l'élongation des hypocotyles) est plus importante que celle obtenue avec "l'albumen d'orge" figure 29 ; ce test montre d'une part une activité nette au R.f. (0,8) où migre habituellement le AG_3 , et d'autre part, des substances inhibitrices de l'activité α -amylasique de l'orge qui sont décelées aux R.f. 0,5, 0,6 et 0,7.

L'ensemble de ces résultats amène à conclure que des substances de type gibbérelline sont rejetées par les cellules de Silène au cours de leur croissance.

TEST D'ALBUMEN D'ORGE

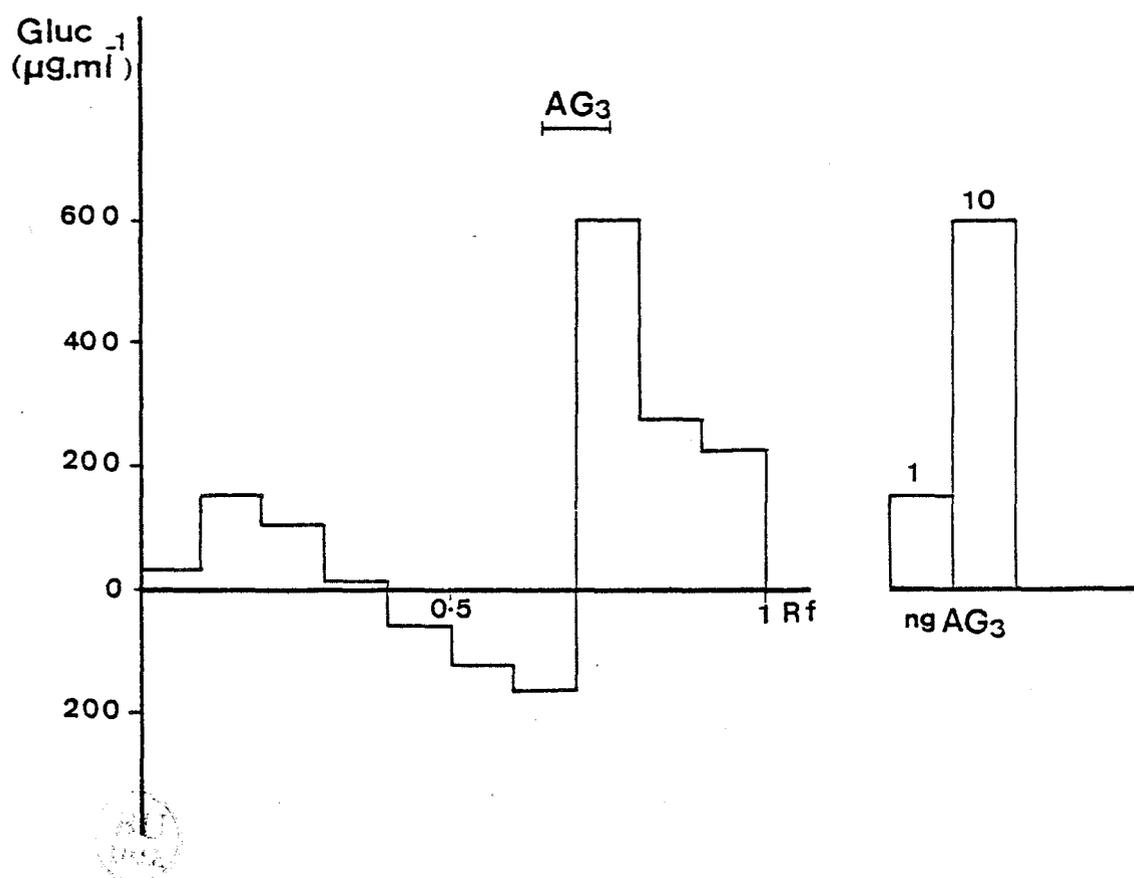


Figure 29:

Activité gibbérellinique dosée par le test "albumen d'orge" dans le milieu de culture d'une suspension cellulaire de Silène.

En ordonnée : (activité α -amylasique des extraits - sucres réducteurs) - activité α -amylasique du Selica gel chromatographié.

2. Recherche d'une activité de type gibbérellinique dans les polysaccharides extracellulaires, avant et après autoclavage.

La présence de substances stimulantes à la fois de l'activité α -amylasique de l'orge et de l'élongation des hypocotyles de laitue nous a conduit dans un premier temps, à rechercher l'existence d'une liaison entre ces substances actives et les PPA, dont on a constaté l'action stimulante à l'égard de la croissance des cellules de Silène et dans un deuxième temps, à vérifier l'éventuelle libération de composés gibbérelliniques de leur liaison avec les PPA lors de l'autoclavage des milieux de culture.

Nous avons donc réalisé le protocole expérimental suivant : les composés gibbérelliniques sont obtenus à partir des PPA extraits du milieu de culture de Silène (14ème jour) par le cétavlon. Ces PPA sont re-dissous ensuite dans un milieu de culture neuf, on en extrait alors deux catégories de composés gibbérelliniques, la première catégorie est obtenue avant le passage à l'autoclave et la deuxième après l'autoclavage (120°, 20 mn). Dans ces deux conditions d'extraction différente, nous avons ensuite recherché l'effet stimulant de l'activité α -amylasique de l'orge, et l'effet stimulateur de l'élongation des hypocotyles de laitue.

La figure 30 montre que l'activité gibbérellinique globale dosée grâce au test d'albumen d'orge est augmentée après passage à l'autoclave du milieu de culture. Cette augmentation est d'environ 71 % par rapport à l'activité gibbérellinique obtenue avant l'autoclavage.

TEST D'ALBUMEN D'ORGE

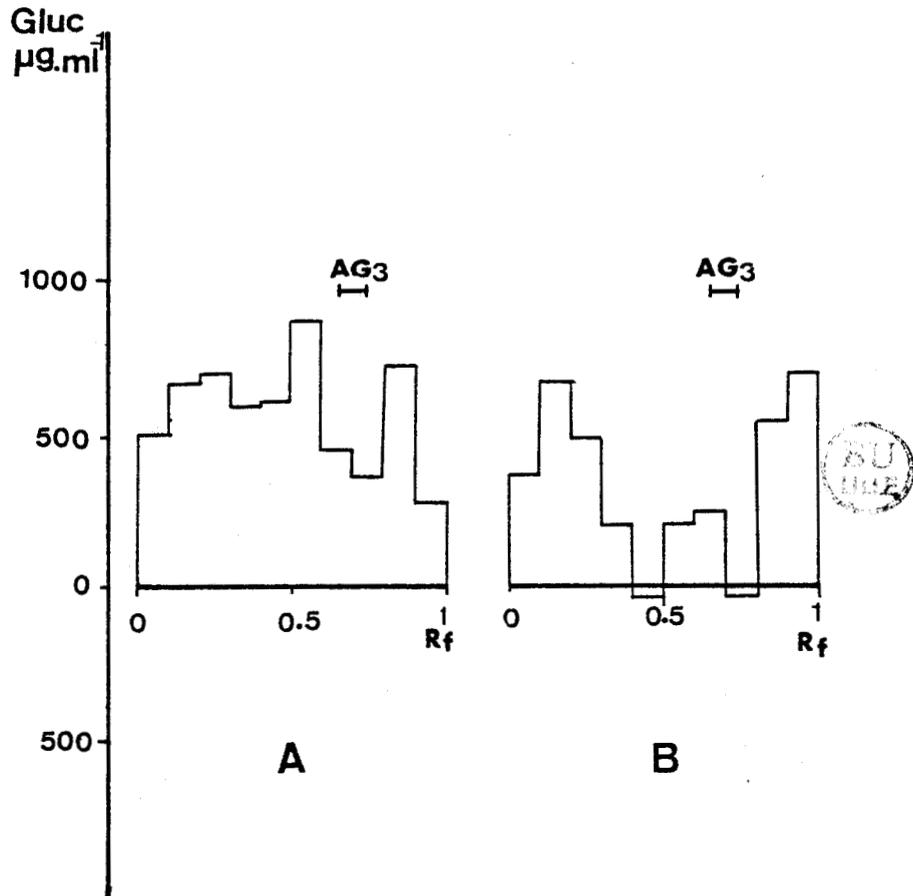


Figure 30 :

Activité gibbérélinique déterminée grâce au test "albumen d'orge" dans une solution de PPA de Silène avant et après passage à l'autoclave.

- A : PPA passés à l'autoclave
- B : PPA non passés à l'autoclave.

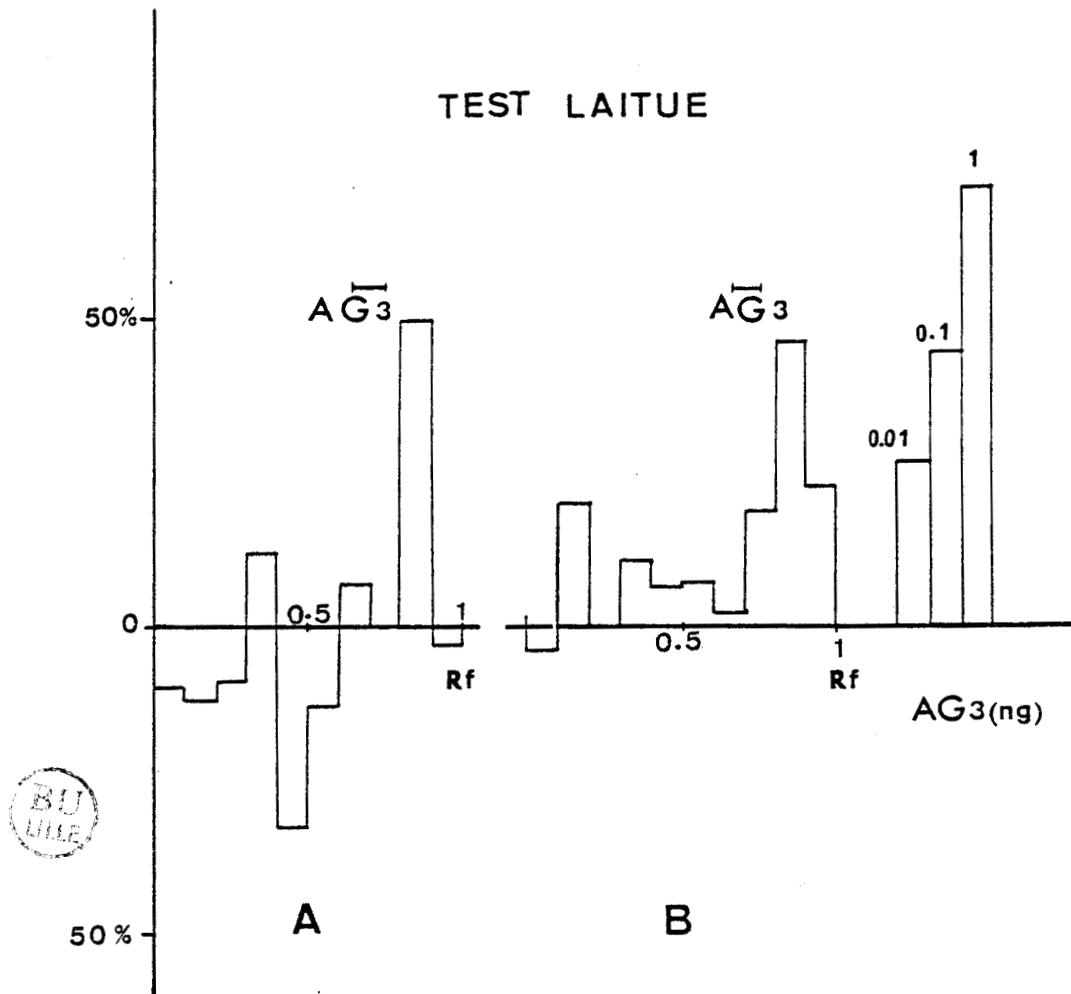


Figure 31:

Activité gibbérellinique déterminée grâce au test "laitue" dans une solution de PPA de Silène.

A : avant passage à l'autoclave.

B : après passage à l'autoclave.

En ordonnée : la différence entre la longueur moyenne de 10 hypocotyles de laitues cultivées en présence de l'extrait chromatographié et la longueur moyenne de 10 hypocotyles cultivés en présence du solvant chromatographié exprimé en pourcentage.

Le test biologique laitue (figure 31) montre que l'activité gibbérellinique globale est augmentée par autoclavage à 160 °C dans la mesure où les pics importants correspondent aux R.f.(2-8-9-10). Par ailleurs, la figure 31 indique que l'autoclavage supprime l'effet inhibiteur correspondant aux R.f.(1-2-3-5-6 et 10). L'ensemble de ces résultats montre que des substances ayant une activité gibbérellinique sont probablement liées aux polymères polysaccharidiques, libérés dans le milieu au cours de la culture.

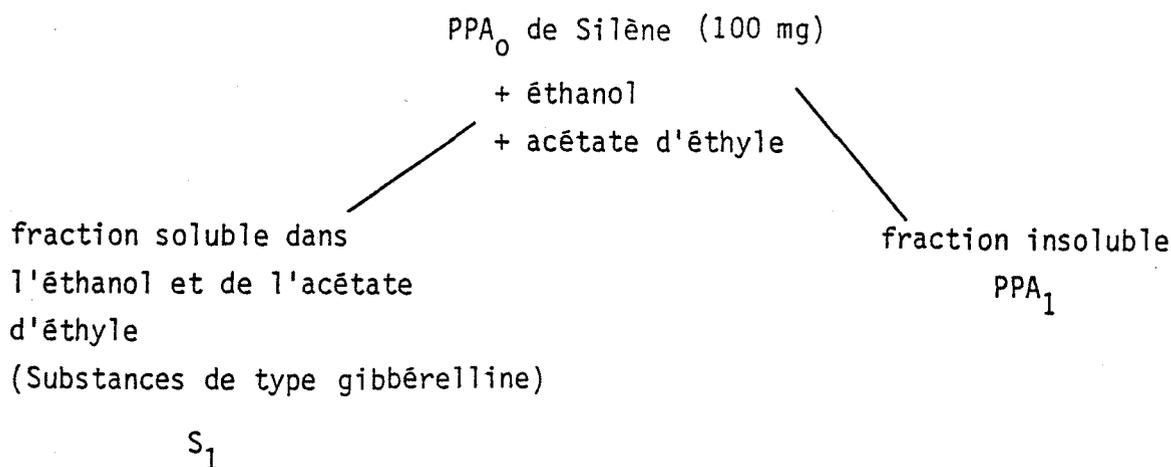
Afin de vérifier que les substances de type gibbérellinique, liées à la fraction PPA ne sont pas emprisonnées au moment de la précipitation par le cétavlon, ce qui entraînerait leur protection au cours d'une solubilisation ultérieure par l'éthanol, nous avons introduit la AG_3 marquée C^{14} dans un milieu de culture de Silène en fin de culture puis, on a récupéré les PPA de ce milieu par précipitation au cétavlon habituellement utilisé. La répartition de la radioactivité entre les PPA et le surnageant indique qu'une proportion infime (0,1 % de la radioactivité) se retrouve dans la fraction précipitée (PPA). De ce fait, on peut conclure que les substances de type gibbérellinique liées aux PPA excrétés dans le milieu de culture des suspensions cellulaires de Silène, sont probablement attachées aux polymères au moment où ils sont libérés des parois.

3. Effet des différentes fractions des PPA obtenues par solubilisation dans l'éthanol et l'acétate d'éthyle.

Dans ces conditions, il convient d'examiner les arguments précédents et de préciser les effets des différentes fractions obtenues par solubili-

sation successives des PPA (voir schéma) par l'éthanol et l'acétate d'éthyle.

Ces fractions ont été introduites dans un nouveau milieu de culture de cellules de Silène afin de déterminer leurs actions.



Pour réaliser cette expérience, on a appliqué le protocole

suisant :

- 1 - témoins milieu habituel
- 2 - milieu habituel + PPA₀ (50 µg.ml⁻¹)
- 3 - milieu habituel + PPA₁ (50 µg.ml⁻¹)
- 4 - milieu habituel + S₁ (1,01 ng.l⁻¹) et S₁ (2,02 ng.l⁻¹) estimé en équivalent de AG₃
- 5 - milieu habituel + PPA₁ (50 µg.ml⁻¹) + S₁ (1,01 ng.l⁻¹) estimé en équivalent de AG₃

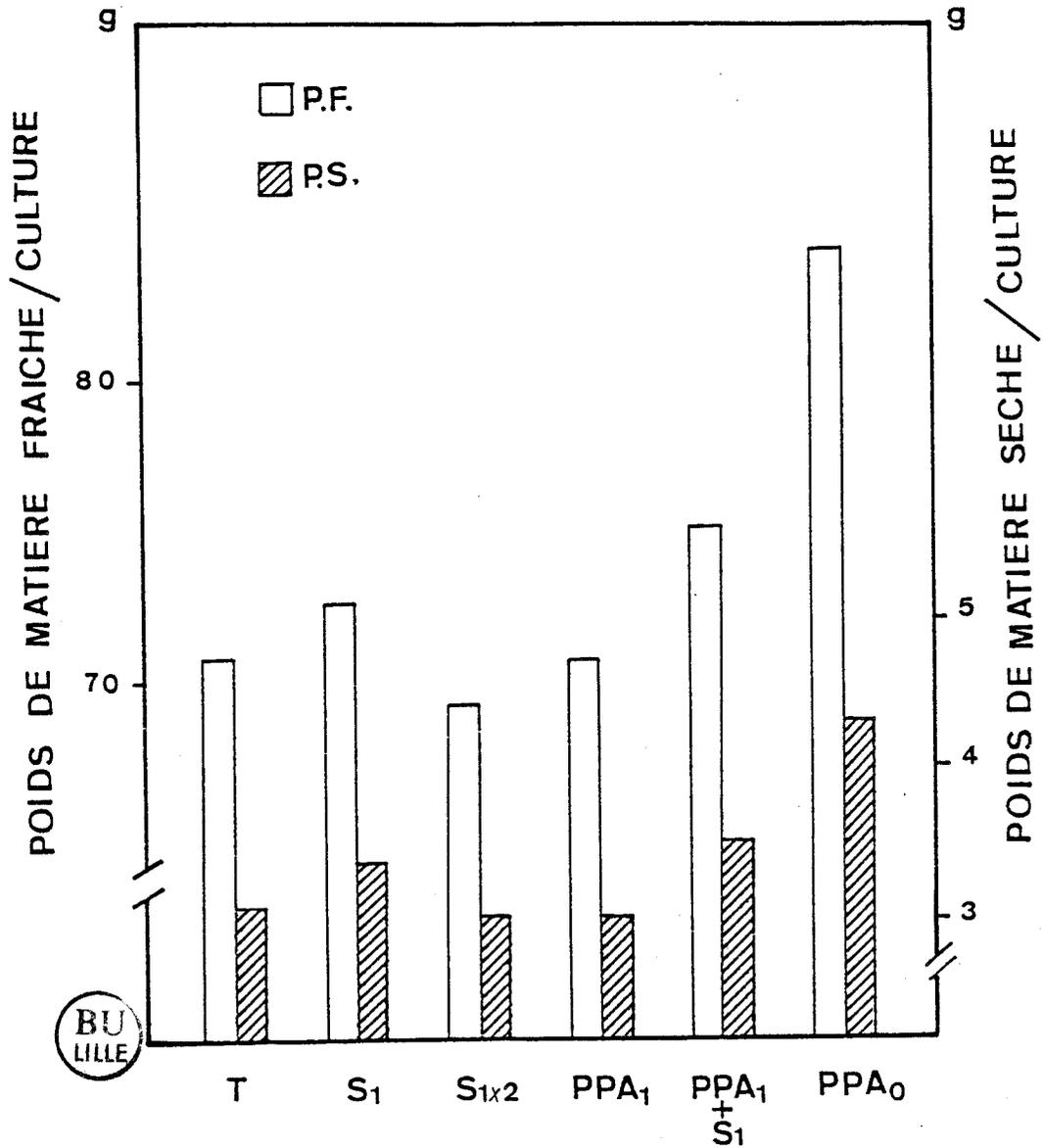


Figure 32:

Effets des différentes fractions obtenues, par solubilisation des PPA de Silène, par l'éthanol et l'acétate d'éthyle, sur la croissance des cellules de Silène,

T = témoins.

S₁ et S₂ = fractions solubles de $1,01 \text{ ng.l}^{-1}$ et de $2,02 \text{ ng.l}^{-1}$ estimées en équivalent d'AG₇

PPA₁ = fraction insoluble, PPA₀ = PPA intégraux.

Comme nous l'avons déjà démontré, l'addition de $50 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de PPA stimule continuellement la croissance des cellules de Silène (figure 32) Par contre l'addition au milieu de culture de la fraction insoluble PPA₁ n'exerce aucun effet sur la croissance cellulaire ce qui indique que les PPA₀ de Silène débarrassés de la fraction soluble (S₁) perdent la totalité de leur effet stimulant. La fraction soluble (S₁) réintroduite dans le milieu de culture favorise légèrement la croissance ; toutefois, si on double sa concentration l'effet est légèrement défavorable, ce qui indique que l'augmentation du taux de S₁ entraîne une inhibition par excès de substrat ($2,02 \text{ ng}.\text{l}^{-1}$) ; mais les travaux de BRASSART et al. (1982) montrent que l'addition de AG₃ à des concentrations comprises entre 0,01 et $10 \text{ mg}.\text{l}^{-1}$ favorise la croissance des cellules de Silène ; ce qui suggère que l'inhibition obtenue avec S₁ est probablement liée à l'existence d'un inhibiteur extrait avec S₁ dont la nature et l'origine sont inconnues.

L'ensemble de ces résultats permet de supposer que l'activation de croissance provoquée par les PPA est due partiellement à la présence d'une substance de type gibbérelline liée aux PPA et qui serait libérée dans le milieu de culture au cours de l'autoclavage.

I - EXCRETION DES POLYSACCHARIDES PECTIQUES ACIDES DANS LE MILIEU DE
CULTURE DES SUSPENSIONS CELLULAIRES.

La mise en évidence de l'excrétion de PPA par les suspensions cellulaires de Silène et de Ronce cultivées dans un milieu nutritif liquide confirme les résultats obtenus avec d'autres espèces végétales (BECKER et al., 1964 ; ASPINALL et al., 1969 ; OLSON et al., 1969 ; BARNOUD et al., 1977). Il semble qu'une relation existe entre cette excrétion et la croissance de la suspension cellulaire.

Les résultats des mesures effectuées au cours des différentes phases de la croissance d'une suspension de cellules de Silène constituent des références pour essayer de situer chronologiquement la libération de P P A ; si la diminution de taille des cellules observées pendant les premiers jours de culture (fig. 19) est liée à l'intensité des divisions cellulaires, l'augmentation de taille qui lui succède correspond à un phénomène de grandissement de ces cellules. Le fait que l'excrétion des P P A ~~s'accroît~~ avant que la taille des cellules augmente, traduit une activité intense au niveau de la paroi cellulaire (en particulier en ce qui concerne la fraction hémicellulosique) pendant la phase d'élongation qu'il est d'ailleurs difficile de séparer totalement de la phase de division. Cette activité d'excrétion peut s'expliquer par les conditions de culture des suspensions cellulaires qui entraînent d'ailleurs des modifications morphologiques importantes, telle qu'une très grande vacuole et souvent une paroi plus mince. D'autre part, le milieu extérieur est en contact avec toute la surface de la cellule, ce qui facilite les échanges, qu'il s'agisse de l'absorption des éléments nutritifs ou de l'excrétion des méta-

bolites qui constituent la paroi primaire. Au cours de la croissance, LABAVITCH et RAY (1974), suggèrent qu'il pourrait y avoir une transformation des xyloglucanes pariétaux d'une forme insoluble à une forme soluble entraînant le glissement des microfibrilles indispensables à l'élongation cellulaire. La séparation des constituants pariétaux provoque leur libération par suite de la facilité des échanges. Les composés pectiques des parois étant très sensibles à l'action des enzymes hydrolytiques, on peut donc penser par suite du changement des conditions de milieu, de lumière ou de température, à une modification du fonctionnement d'une ou plusieurs enzymes au sein de la paroi, qui entraînerait la rupture des liaisons qui maintiennent habituellement la cohésion des polysaccharides pariétaux. La structure de ces derniers peut être modifiée sous l'action des enzymes, ce qui pourrait être à l'origine de la libération de fragments de chaînes polysaccharidiques. Cette hypothèse plaiderait en faveur de celle de TA KEUCHI et KOMAMINE (1980 b) concernant les suspensions cellulaires de Vinca Rosea.

OLSON (1971) suggère que la libération de polysaccharides acides dans le milieu de culture pourrait être due au fait qu'à la suite des divisions, les cellules ont tendance à se séparer. Les pectines, qui sont des polysaccharides acides localisés à la périphérie de la paroi et qui jouent un rôle important dans la jonction intercellulaire, sont ainsi libérées. En effet nos résultats confirment ceux d'OLSON. Cependant, nous pensons que l'excrétion des P P A qui est plus intense au cours de la phase de division cellulaire, résulte de la division et des modifications de la paroi cellulaire qui précèdent l'élongation. Par ailleurs, l'addition de 2,4-D dans le milieu

de culture d'une suspension cellulaire de Phaseolus vulgaris, augmente l'excrétion de composés pectiques acides et neutres (MANTE et BOLL, 1978). Au cours de nos expériences, nous avons utilisé le 2,4-D comme substance de croissance, parce qu'il favorise la séparation des cellules en suspension, ce qui confirme l'hypothèse précédente. Lorsque les suspensions cellulaires sont placées à basse température, les cellules ne se divisent que très lentement (DUBOIS et MORVAN, 1978) et ne libèrent que très peu de polysaccharides acides (MORVAN, 1982). Ceci se comprend si on attribue l'excrétion à une activité enzymatique qui est réduite à basse température.

D'autre part, la majorité des auteurs (BECKER et al., 1964 ; OLSON et al., 1969 ; BAUER et al., 1973 ; TAKEUCHIE et KOMAMINE, 1978, 1980 a) considèrent que les polymères extracellulaires excrétés dans le milieu de culture sont comparables à ceux qui constituent la paroi.

Les courbes de titrage des P P A que nous avons obtenues sont identiques aux courbes de titrage des polysaccharides pariétaux (MORVAN, 1977, 1983) : elles confirment donc l'origine pariétale des polymères. L'excrétion se produit du début à la fin de la culture. Mais les courbes de titrage sont différentes selon les phases de croissance cellulaire considérées ; elles permettent donc de caractériser chacune de ces phases. L'analyse préliminaire des P P A de Silène (JACQUES, 1984) montre que leur composition est comparable à celle des parois étudiées par de nombreux auteurs. Ils sont principalement constitués de rhamnogalacturonanes (pectines) auxquels sont associés des arabinogalactanes, des glucomaunanes et des protéines (hémicelluloses). En dehors de ces considérations sur l'origine des excrétions, il faut signaler que les suspensions de cellules

de Ronce et de Silène se comportent différemment. La suspension de Silène, qui croît vite, n'excrète dans son milieu de culture que de faibles quantités de polysaccharides acides ($150 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$), alors que celle de Ronce, qui prolifère plus lentement, libère beaucoup plus de polysaccharides acides ($500 \mu\text{g}$ à $1 \text{mg}.\text{ml}^{-1}$). Ceci permet de supposer que les polysaccharides acides libérés dans le milieu de culture peuvent intervenir dans le contrôle de la croissance ultérieure de la suspension cellulaire qui les excrète.

II - EFFETS DES POLYSACCHARIDES EXTRACELLULAIRES SUR LA CROISSANCE CELLULAIRE.

La mise en évidence de l'effet favorable des polysaccharides de Silène et de Tabac sur la croissance suscite un grand intérêt, mais amène à se poser de nombreuses questions sur les propriétés physiologiques des P P A d'origines différentes, à l'égard de la croissance des suspensions cellulaires, et éventuellement sur le rôle des P P A émis par les racines sur la croissance de la coiffe ou de la racine entière. De plus, nos observations nous ont montré que les P P A de Silène et de Tabac favorisent la croissance des cellules de Silène et que ceux de Ronce inhibent la prolifération des cellules de Ronce et de Silène. Le rôle physiologique des P P A semble donc lié à leur origine. Par ailleurs, nous avons constaté que la quantité de P P A excrétés dans le milieu de culture est strictement liée à la croissance des cellules : les souches qui présentent une croissance rapide, comme le Silène, sécrètent une petite quantité de P P A ; alors que les souches à croissance lente, comme la Ronce et l'Erable, en sécrètent une grande quantité.

On a également remarqué que l'effet des P P A sur la cellule varie selon la vitesse de croissance des souches qui les produisent. Ainsi, les cellules qui croissent vite, excrètent des P P A qui stimulent la croissance, tandis que les cellules, qui croissent lentement, excrètent des P P A qui sont inhibiteurs. Ces observations ne paraissent pas surprenantes, dans la mesure où elles peuvent s'expliquer par la différence de nature de la paroi des cellules appartenant à des espèces distinctes. De tels résultats sont récemment obtenus par l'équipe d'ALBERSHEIM qui, étudiant l'effet de fragments pariétaux sur les tissus végétaux, note une inhibition de la croissance qu'elle attribue à des composés d'origine pectique.

Afin de préciser ce rôle physiologique des P P A , on peut se demander si l'effet des P P A est spécifique, se limitant aux cellules qui les produisent. En effet, nous avons montré que les P P A de Silène et de Tabac stimulent la croissance des cellules de Silène et des racines d'Endive ; à l'inverse, ceux de Ronce inhibent fortement la croissance de la suspension cellulaire de Ronce et de Silène. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de BENBADIS (1965, 1968) obtenus au cours d'expériences de conditionnement de milieu. Cet auteur a montré que les colonies tissulaires de Ronce excrètent dans le milieu des métabolites de nature et d'origine inconnues, qui inhibent la croissance de ces colonies, mais favorisent la prolifération des cellules de Crowngall de vigne qui ont, elles aussi, une grande sensibilité à l'égard des produits qu'elles excrètent.

Les effets inhibiteurs et/ou stimulateurs des P P A confèrent à ces derniers un rôle de contrôle de la croissance cellulaire et du dévelop-

pement des plantes : les premiers expliqueraient la croissance lente des tissus des plantes ligneuses (Ronce et Erable) par inhibition de la prolifération cellulaire, les seconds seraient à l'origine de la croissance rapide des cellules de Silène et de Tabac.

GAUTHERET (1937) constate que la durée de vie des cellules de coiffe augmente en présence des métabolites libérés par un fragment de racine.

De plus, nous avons noté que les P P A produits par les cellules en fin de phase stationnaire se comportent tantôt comme stimulants, tantôt comme inhibiteurs. On peut penser que l'inhibiteur, produit au cours de la sénescence des cellules, serait l'acide abscissique produit à la suite du stress que peut entraîner le manque d'éléments nutritifs. La séparation des constituants du milieu en fin de culture, sur un gel Sephadex G25, permet de montrer qu'il existe deux facteurs, l'un stimulant et l'autre inhibiteur. Ce dernier pourrait être si important qu'il masque l'effet stimulant. L'effet inhibiteur des P P A de cellules de Ronce et d'Erable reste difficile à interpréter. On peut cependant noter que MOLLARD et ROBERT (1984) ont montré que la souche anergiée de Rosa Glauca, cultivée en suspension cellulaire, synthétise un polymère de type lignine qui a été caractérisé en fin de phase stationnaire dans les parois cellulaires et dans le milieu de culture. Par ailleurs, les sucres neutres qui représentent 60 à 74 % des P.P.A. (TALMADGE et al., 1973) peuvent aussi intervenir sur la croissance; c'est ainsi que les galactanes sont considérés comme ayant un rôle déterminant sur la croissance des cellules et l'extensibilité des parois (NISHITANI et MASUDA, 1980). Enfin, BRASSART (1976) a montré que le

galactose et l'arabinose ont un effet inhibiteur marqué sur la croissance des cellules de Silène

III - ROLE PHYSIOLOGIQUE ET MODE D'ACTION DES POLYSACCHARIDES ACIDES DE SILENE .

L'analyse cinétique de la croissance montre que les P P A de Silène stimulent la multiplication de ces cellules du 5ème au 9ème jour, et leur grandissement du 9ème au 18ème jour. Au cours de cette dernière période, la teneur en eau des cellules cultivées en présence des P P A est plus importante. Si les sécrétions cellulaires contrôlent la croissance en agissant à la fois sur la division et le grandissement cellulaires, l'effet stimulant de ces complexes reste difficile à expliquer. On peut penser que les P P A sont des précurseurs de la paroi (OLSON, 1971 ; KATO et NOGUCHI, 1976 ; TAKEUCHI et KOMAMINE, 1980a), leur introduction dans le milieu nutritif permettrait aux cellules, en les utilisant directement, d'édifier leurs parois. Ceci n'explique pas toutefois que les faibles quantités de P P A ont aussi un effet stimulant.

1. Effet tampon des polysaccharides extracellulaires de Silène.

Les polysaccharides en solution ont des propriétés polyélectrolytes. Ils pourraient intervenir en modifiant l'activité ionique et développer ainsi un véritable tampon dans le milieu. Cette hypothèse est confirmée par l'effet des P P A sur l'évolution du pH en présence de NaOH, en maintenant le pH constamment inférieur à celui des témoins. Ce rôle "tampon" est favorable à la croissance des cellules de Silène, qui sont sensibles à

l'évolution du pH (DUBOIS, 1980). Ces observations concordent avec celles de MORVAN (1983) qui a montré que la présence dans les parois végétales, de plusieurs espèces d'acides d'accessibilité et de structure différentes influe sur la sélectivité des parois à l'égard des principaux cations en la modifiant en fonction du pH en milieu extérieur. De plus, les P P A contenant des acides pectiques et des pectates, la présence des groupements amphotères (glycoprotéines) susceptibles de s'ioniser, pourraient jouer un rôle de tampon dans les conditions défavorables de pH et de force ionique.

2. Effet chélateur des polysaccharides extracellulaires.

En culture des cellules, le pH habituellement adopté est de l'ordre de 5,5. A ce pH, la disponibilité des ions de Fer est insuffisante. De plus, les cellules de culture, au cours de leur croissance, tendent à ajuster le pH du milieu vers la neutralité (DUBOIS, 1980). Afin d'augmenter la disponibilité en Fer soluble, on le chélate par l'E.D.T.A. Le rôle chélateur de cette substance peut être joué par les P P A qui, associés à du FeSO_4 , favorisent la croissance des cellules. En outre, l'effet tampon des P P A retarde la précipitation des ions de Fer dans le milieu de culture. Cependant, les travaux de HELLER et RICHEZ (1959) réalisés sur deux milieux à pH identiques (Témoin et milieu de culture de tissus) ont montré que les métabolites excrétés par les tissus végétaux maintiennent le Fer en solution dans le milieu de culture ; la nature et l'origine de ces métabolites n'étaient pas connues. Par ailleurs, dans la paroi cellulaire, les polysaccharides acides peuvent fixer des ions et former des liaisons intermoléculaires (GRANT et al., 1973). De même, WIYTACK et GILLET (1978) montrent que la paroi primaire contient du calcium probablement chélaté par les anions (COO^-), par des donneurs comme OH (d'origine polysaccharidique) et par NH_4^+ (d'origine protéinique).

Les P P A d'origine pariétale, excrétés dans le milieu de culture, contiennent des groupes COO^- , OH et NH_4^+ . Ils sont donc susceptibles de participer aussi à la chélation de certains ions tels que le fer.

En absence d'E.D.T.A., nous avons constaté que les P P A favorisent la croissance des tissus de racine d'endive. Ceci confirme les travaux de HELLER et al., (1968) qui ont montré que les tissus végétaux cultivés "in vitro" excrètent dans la solution nutritive un produit permettant la croissance des racines isolées. De plus, nous avons montré que l'association des P P A et d'E.D.T.A dans le milieu de culture, augmente la croissance de façon plus importante qu'en présence de P P A seuls.

En résumé, on peut donc penser que ce sont les substances polysaccharidiques d'origine pariétale, excrétées dans le milieu, qui assurent la chélation du fer.

3..Effets de type gibbèrellinique.

Les effets de l'acide gibbèrellique sur les suspensions cellulaires de Silène a été étudié par BRASSART et al. (1982). La similitude de ces effets avec ceux provoqués par la présence de P P A , nous a conduit à envisager que les P P A pouvaient présenter un effet de type gibbèrellinique. Les tests "laitue" et "d'albumen d'orge" ont montré l'existence d'une activité de ce type. Cette activité est augmentée lorsque les P P A ont subi un passage à l'autoclave (120°C pendant 20 mn), ce qui suggère la libération d'une gibbèrelline liée aux PPA. Nous avons également constaté certains

phénomènes d'inhibition à l'égard de l'élongation des hypocotyles de laitue ou de l' α -amylase d'orge. Ces résultats semblent en accord avec ceux obtenus par COUILLEROT et YI (1985) sur de jeunes plants de tomate dont les racines libèrent dans leur milieu nutritif des substances ayant une activité de type gibbérellinique décelée par deux tests biologiques, "test laitue" et "test d'albumen d'orge".

Par ailleurs, l'extraction des substances à activité gibbérellinique à partir des P P A entraîne une perte partielle de l'effet stimulant. Ceci s'expliquerait par la décomposition d'une partie des P P A au cours de l'extraction, ou par la présence de substances inhibitrices extraites en même temps que les substances gibbérelliniques.

CONCLUSIONS

Conclusions.

Le but de ce travail était d'étudier les polysaccharides acides d'origine pariétale excrétés dans le milieu de culture des suspensions cellulaires et de préciser leur rôle sur la croissance des cellules.

Les résultats que nous avons obtenus, établissent que les suspensions cellulaires de Silène, de Ronce et de Tabac excrètent dans le milieu de culture des métabolites polysaccharidiques d'origine pariétale. Cette excrétion est un phénomène continu qui influe sur la division et le grandissement cellulaire.

L'activité intense des échanges entre la paroi cellulaire et le milieu liquide qui l'entoure pourrait être la cause de cette excrétion.

La quantité des polysaccharides extracellulaires est en relation inverse avec la vitesse de la croissance des cellules. La quantité et la nature des P P A produits varient selon l'âge et l'origine des souches qui les produisent. Les courbes de titrations des P P A constituent un nouveau moyen pour déterminer la phase de croissance des suspensions cellulaires.

Le rôle des P P A n'est pas spécifique. Toutefois, ceux qui proviennent du milieu de culture des cellules de Ronce dont la croissance est lente, inhibent fortement la croissance des cellules de Ronce et de

Silène tandis que ceux qui proviennent du milieu de culture des cellules de Silène ou de Tabac stimulent la croissance des cellules en agissant à la fois sur la division et sur le grandissement des cellules. L'effet stimulant, que présentent les P P A de Silène, pourrait s'expliquer par leur pouvoir tampon, par leur effet chélateur à l'égard du fer et par leur activité gibbérellinique. Ces substances de type gibbérellinique pourraient être liées aux P P A et libérées, soit au cours de l'autoclavage, soit au cours de la croissance des suspensions cellulaires. Ceci tendrait à souligner l'importance de la paroi cellulaire dans la régulation de la teneur en gibbérellines endogènes.

En résumé, les polysaccharides pectiques acides peuvent donc être considérés comme un facteur important de la régulation de la croissance des cellules végétales.

Cependant, les résultats obtenus sont incomplets pour expliquer le mode d'action de ces P P A. De nombreuses recherches seront encore nécessaires ; il faudrait, en particulier, pouvoir analyser la composition chimique des fractions ayant un effet soit stimulant, soit inhibiteur, pour avoir une idée plus précise sur le rôle exact de ces composés provenant de la paroi cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- ALBERSHEIM, P., McNEIL, M. et LABAVITCH, J.M. (1976).
The wall of growing cells. I - The molecular structure of the primary cell wall and elongation growth.
In : PILET (Ed.), Plant growth regulation, Springer Verlag, Berlin, Pp. 1-11.
- ASPINALL, G.O. (1970).
Pectins plant gums and other plant polysaccharides.
In : W. PIGMAN et D. HORTON, (Eds.), The carbohydrates, vol II B. Academic press, New York, Pp. 515-536.
- ASPINALL, G.O., CRAIG, J.W.T. et WHITE, J.L. (1968).
Lemon-Peel pectin. I. Fractionation and partial hydrolysis of water soluble pectin.
Carbohydr. Res, 7, 442-452.
- ASPINALL, G.O. et GREENWOOD, C.T. (1962).
Aspects of the chemistry of cereal polysaccharides
J. Inst. Brew, 68, 167-178.
- ASPINALL, G.O., MOLLOY, J.A., et CRAIG, J.W.T. (1969).
Extracellular polysaccharides from suspension cultured sycamore cells.
Can. J. Biochem., 47, 1063-1070.
- AZAMIZU, T., NAKAYAMA, N. et NISHI, A. (1984).
Pectic polysaccharides in carrot cells growing in suspension culture.
Planta, 160, 469-473.
- BARNOUD, F., MOLLARD, A. et DUTTON, G.G.S. (1977).
Une xyloglucane β - 1 - 4 présente dans le milieu de culture des suspensions cellulaires de Rosa glauca.
Physiol. Vég., 15, 153-161.
- BATES, G.W. et RAY, P.M. (1981).
Dependant interactions between cell wall polymers possibly involved in wall deposition and growth.
Plant Physiol., 61, 158-164.
- BAUER, W.D., TALMADGE, K.W., KEEGSTRA, K. et ALBERS HEIM, P. (1973).
The structure of plant cell walls. II - The hemicellulose of walls of suspension cultured sycamore cells.
Plant Physiol., 51, 174-187.

- BECKER, G.E., HUI, P.A. et ALBERS HEIM, P. (1964).
Synthesis of extracellular polysaccharide by suspension of Acer pseudoplatanus L. cells.
Plant Physiol., 31, 913-920.
- BENBADIS, A. (1965).
Croissance de cellules isolées de Ronce sur des milieux nutritifs "conditionnés" par des quantités variables de tissu
C.R. Acad. Sci. Paris, 261 (11), 4829-4832.
- BENBADIS, A. (1968).
Culture des cellules isolées : le problème du conditionnement des milieux de culture.
In : Colloque national, La culture de tissus de plantes, Colloque national, C.N.R.S. (Ed), Paris, P. 121-129.
- BIGOT, J et BINET, P. (1984).
Etude comparative, par titrage, de quelques caractéristiques électrochimiques de parois isolées des racines de Cochlearia anglica et de Phaseolus vulgaris.
Physiol. Vég., 22, (1) 83-92.
- BLACKELY, L.M. et STEWARD, F.C. (1964).
Growth and organized development cells. V. The growth of colonies from free cells on nutrient Agar.
Amer. J. Bot., 51, 780-791.
- BRASSART, C. (1976).
Culture de cellules végétales en fermenteurs. Essais avec les cellules du Silene alba (Miller) E.H.L. Krause.
Mémoire D.E.A., Lille, 54p.
- BRASSART, C., DUBOIS, J. et BOURIQUET, R. (1982).
Effets de l'acide gibberellique sur la croissance des cellules de Silène.
Bull. Soc. Bot. Fr., 129, (4-5), 259-269.
- BUCKHOUT, J., YOUNG, K.A., LOW, P.S. et MORRE, J. (1981).
In vitro promotion by auxin of divalent ion release from soybean membranes.
Plant Physiol., 68, 512-515.
- BURKE, D., KAUFMAN, P., McNEIL, M. et ALBERSHEIM, P. (1974).
The structure of plant cell walls. VI - A survey of the walls of suspension cultured monocots.
Plant Physiol., 54, 109-115.

- CHABOUD, A. (1983).
Isolation, purification and chemical composition of maize root cap
slime.
Plant and soil, 73, 395-402.
- CHABOUD, A. et ROUGIER, M. (1981).
Secrétions racinaires mucilagineuses et rôle dans la Rhizosphère.
Ann. Biol, 4, 313-326.
- CHAMBAT, G., BARNOUD, F. et JOSELEAU, J.P. (1984).
Structure of the primary cell walls of suspension cultured Rosa
glauca cells. I - Polysaccharides associated with cellulose.
Plant Physiol., 74, 687-693.
- CHRISPEELS, M.J. (1976).
Biosynthesis, intracellular transport and secretion of
extracellular macromolecules.
Ann. Rev. Plant Physiol., 27, 19-38.
- CLELAND, R.E. (1971).
Cell wall extension
Ann. Rev. Plant Physiol., 22, 197-222.
- COOMBE, B., COHEN, D. et PALEG, L. (1967)..
The barley endosperm bioassay for gibberellins. I - Parameters of
the response system.
Plant Physiol., 42, 105-112.
- COUILLEROT, J.P. (1976).
Transport et devenir des molécules ¹⁴C après l'application de AG3
¹⁴C sur les feuilles et les racines de Lycopersicon esculentum
Mill.
Thèse de 3ème cycle, Lille, 57 P.
- COUILLEROT, J.P. et YI, Y.B. (1985).
Exsudation racinaire de gibbérelline lors de la culture
hydroponique de Lycopersicon exculentum Mill.
C.R. Acad. Sci. Paris, 3, 99-102.
- DARVILL, A.G., McNEIL, M. et ALBERSHEIM, P. (1978).
Structure of plant cell walls.
Plant Physiol., 62, 418-422.

- DARVILL, J.E., McNEIL, M., DARVILL, A.G. et ALBERSHEIM, P. (1980).
The structure of the plant cell walls. XI - Glucuronoarabinoxylan,
a second hemicellulose in the primary cell wall of suspension
cultures sycamore cells.
Plant Physiol., 66, 1135-1139.
- DE JONG, D.W., OLSON, A.C., HAWKER, K.M. et LANSEN, E.F. (1968).
Effect of cultivation temperature on peroxydase isoenzymes of
plant cells grown in suspension.
Plant Physiol., 43, 841-844.
- DIGHBY, J., THOMAS, T.H. et WAREING, P.F. (1964).
Promotion of cell division in tissue cultures by gibberellic acid.
Nature, 203, 547-548.
- DISCHE, Z. (1947).
A new specific reaction of hexuronic acids.
J. Biol. Chem., 167, 189-198.
- DREYER, S.A., SEYMOUR, V. et CLELAND, R.E. (1981).
Low proton conductance of plant cuticles and its relevance to the
acid growth theory.
Plant Physiol., 68, 644-667.
- DUBOIS, J. (1980).
Composés sulfhydriques et croissance de tissus isolés de Carotte
(Daucus carota L.) et de suspensions cellulaires de Silène (Silene
alba (Miller) E.H.L. Krause).
Thèse Doct. Sci., Lille, 335 p.
- DUBOIS, J. et BOURIQUET, R. (1974).
Culture in vitro de tissus et de suspensions cellulaires du
Silene alba (Miller) E.H.L. Krause.
Bull. Soc. Bot. Nord Fr., 26 - 27, 70-88
- DUBOIS, J. et MORVAN, H. (1978).
Effet de la température et de la lumière sur la croissance des
suspensions cellulaires de Silène et d'Erable.
Bull. Soc. Bot., 125, 407-420.
- DUBOIS, J., RAMBOUR, S. et VASSEUR, J. (1976).
Croissance d'une suspension cellulaire du Silène (Silene alba
(Miller) E.H.L. Krause) et évolution des acides nucléiques.
Actes du 101ème cong. Nat. Soc. Sav., I, 441-454.
- ESQUERRE, T.M.T. et MAZAU, D. (1981).
Les glucoprotéines à hydroxyproline de la paroi végétale.
Physiol. Vég., 19, 415-426.

- EVANS, L.V. et VESPER, M.J. (1980).
An amprove method for deteting auxin induced hydrogen efflux from
corn cleoptile segments.
Plant Physiol., 66, 561-565.
- FERRIER, J.M. et DAINTY, J. (1977).
A new method for measurement of hydraulic conductivity and elastic
coefficients in higher plant cells using an external force.
Can. J. Bot., 55, 858-866.
- FRANKLAND, B. et WAREING, P.F. (1960).
Effect of gibberellic acid on hypocotyl growth et lettuce
seedlings.
Nature, 185, 255-256.
- FRY, S.C. (1980).
Gibberellin - corolled pectinic acid and protein secretion in
growng cells.
Phytochemistry, 19, 735-740.
- FRY, S.C. et STREET, H.E. (1980).
Gibberellin - sensitive suspension cultures.
Plant Physiol., 65, 472-477.
- GAMBORG, O.L. et EVELEIGH, D.E. (1968).
Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures
of wheat and barley.
Can. J. Biochem., 46, 417-421.
- GAUTHERET, R.J. (1937).
Action de la racine sur la survie des cellules isolées de coiffe
de Lupinus albus.
C.R. Acad. Sc. 204, 887.
- GAUTHERET, R.J. (1959).
La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisations
Masson et cie, (Eds), Paris, 863 p.
- GLEBA, Y.Y. (1978).
Microplet culture of tobacco plants from single mesophyl
protoplast.
Naturwiss., 65, 158-159.

- GRANT, G.T., MORRIS, E.R, RESS, D.A., SMITH, P.J.S. et THOM, D. (1973).
Biological interactions between polysaccharides and divalent cations. Egg - box model.
FEBS Letters, 32, 195-198.
- GUERN, J. (1979).
Les cellules de plante cultivées en milieu liquide, et la croissance de leurs populations.
In : Production de substances naturelles par culture in vitro de tissus et de cellules de végétaux. D.G.R.S.T. journées d'études, Pp. 91-108
- GUMINSKI, S., AUGUSTIN, D. et SULEJ, J. (1977).
Comparison of some chemical and physico - Chemical properties of natural and model sodium humates and of the Biological activity of both substances in Tomato Water cultures.
Acta. Soc. Bot. Polon., 46, 437-448.
- GUMINSKI, S. et SULEJ, J. (1979).
About the cause of the stimulative effect of humate in yeast culture.
Acta. Soc. Bot. Polon., 48, 279-293.
- HAGER, A., MENZEL, H. et KRAUSS, A. (1971).
Versuche und hypothese zur primärwirkung des auxins beim streckungswachstum.
Planta, 100, 47-75.
- HALL, D., MOLLENHAUER, H.H. et MORRE, D.J. (1966).
Evidence for secretion of cell dispersing enzymes from maize root cap end epidermis.
Am. J. Bot., 75, 65-69.
- HARRIS, P.J. et NORTHCOTE, D.H. (1970).
Patterns of polysaccharide biosynthesis in differentiating cells of maize root tips.
Biochem. J. 120, 479-491.
- HELLER, R. (1953).
Recherche sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés "in vitro".
Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Vég., 14, 1-223.
- HELLER, R., DARPAS, A., DEVILLERS, P. et RICHEZ, M. (1968).
Absorption et exportation des tissus et fragments végétaux en culture.
Colloque national Strasbourg. P. 149-169

- HELLER, R. et RICHEZ, M. (1959).
Sur l'alimentation en fer des tissus végétaux en culture.
C.R.Acad. Sci. Paris, 249, 295-297.
- HENGELSON, J.P. et UPPER, C.D. (1970).
Modification of logarithmic growth of tobacco callus by gibberellic acid.
Plant Physiol., 46, 113-117.
- JACOBS, M. et RAY, P.M. (1975).
Promotion of Xyloglucan metabolism by acid pH.
Plant Physiol. 56, 373-376.
- JACQUES, F. (1984).
Contribution à l'étude biochimique des polysaccharides acides excrétés dans le milieu des suspensions cellulaires de Silène. (Silène alba (Miller) E.H.L. Krause) cultivées en tubes.
Mémoire D.E.A., Lille, 76 P.
- JASPERS, E.M.J. et VELDSTRA, H. (1965).
An α -amylase Tabacco grown from gall tissue cultures II - Measurement of the activity in media and tissues.
Physiol. Plant. 18, 626-634.
- JOSELEAU, J.P. et CHAMBAT, G. (1984).
Structure of the primary cell walls of suspension cultured Rosa glauca cells.
Plant Physiol., 74, 694-700.
- JONES, L.E., HILDEBRANDT, A.C., RIKER, A.J. et WU, J.H. (1960).
Growth of somatic tobacco cells in microculture.
Am. J. Bot., 47, 468-475.
- JONES, D.D. et MORRE, D.J. (1973).
Golgi apparatus mediated polysaccharide secretion by outer root cap cells of Zea mays. III - Control by exogenous sugars.
Physiol. Plant., 29, 68-75.
- KAMIYA, N., TAZAKA, M. et TAKATA, T. (1962).
Water permeability of the cell wall in Nitella.
Plant and Cell Physiol., 3, 285-289.
- KATO, K. et NOGUCHI, M. (1976).
Sugar composition of cell wall polysaccharides of suspension cultured tobacco cells.
Agr. Biol. Chem., 40, 1923-1928.

- KATSU, N. et KAMISKA, S. (1983).
Quantitative changes in cell wall polysaccharides in relation to growth and cell wall loosening in Lactuca sativa hypocotyls.
Physiol. Plant., 58, 33-40.
- KEEGSTRA, K., TALMADGE, K.M., BAUER, W.D. et ALBERSHEIM, P. (1973).
The structure of the plant cell wall. III - A model of the walls of the suspension cultured sycamore cells based on the interconnections of the macro-molecular components.
Plant Physiol., 51, 188-197.
- LABAVITCH, J.M. et RAY, P.M. (1974).
Relationship between promotion of xyloglucan metabolism and induction of elongation by indolacetic acid.
Plant Physiol., 54, 499-502.
- LAMPORT, D.T.A. (1965).
The protein component of primary cell walls.
Advan. Bot. Res., 2, 151-218.
- LAMPORT, D.T.A. et MILLER, D.H. (1971).
Hydroxyproline arabinosides in the plant kingdom.
Plant Physiol., 48, 454-456.
- 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. et DUBOIS, J. (1977).
Evolution des peroxydases et auxines - oxydases au cours de la croissance d'une suspension cellulaire de Silène (Silène alba (Miller) E.H.L. Krause).
C.R. Acad. Sci. Paris (D)., 285, 661-664.
- LEPPART, G.G. (1974).
Rhizoplant fibrils in wheat : demonstration and derivation.
Science (Wash)., 185, 1066-1067.
- LEPPART, G.G. et RAMAMOORTHY, S. (1975).
The aggregation of wheat rhizoplant fibrils and the accumulation of soil - bound cations.
Can. J. Bot., 53, 1729-1735.
- LESCURE, A.M. (1966).
Etude quantitative de la croissance d'une culture d' Acer pseudoplatanus L.
Physiol. Vég., 4, 365-378.

- LUTZ, A. (1966).
Culture de tissus d'origine unicellulaire : importance des cultures nourrices.
C.R. Acad. Sci., 262, 993-996.
- MANTE, S. et BOLL, W.G. (1976).
Changes in the amount and composition of fraction from extracellular polysaccharide during the culture cycle of cotyledon cell suspension culture of bush bean (Phaseolus vulgaris C.V. Contender).
Can. J. Bot., 54, 198-201.
- MANTE, S. et BOLL, W.G. (1978).
Effect of either 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid or kinetin on production and composition of various fractions from extracellular polysaccharides produced by cotyledon cell of bush bean (Phaseolus vulgaris C. V. contender).
Can. J. Bot., 56, 1816-1822.
- MARETZKI, A., THOM, M. et NICKELL, L.G. (1974).
Utilization and metabolism of carbohydrates in cell and callus cultures.
In : H.E. STREET, (Ed.), Tissues culture and plant science. Academic press, New York, Pp. 329-361.
- MARIE, F.A., MORVAN, H., DUBOIS, J. et BOURIQUET, R. (1984).
Effets des polymères pectiques acides libérés au cours de la culture de cellules végétales sur la croissance de suspensions cellulaires de Silène.
C.R. Acad. Sci. Paris., 298, 301-304.
- McNEIL, M., DARVILL, A.G. et ALBERSHEIM, P. (1979).
The structural polymers of the primary cell walls of dicots.
In : W. HERZ., H. GRISEBACH., G.W. KIRBY. (Eds), Progress in the chemistry of organic natural products, vol. 37, Springer - verlag, New York, Pp. 191-249.
- McNEIL, M., DARVILL, A.G. et ALBERSHEIM, P. (1980).
The structure of the plant cell walls. X - Rhamnogalacturonan. I - A structure complex pectic polysaccharides in the wall of suspension cultured sycamore cells.
Plant Physiol., 66, 1128-1134.

- McNEIL, M. DARVILL, A.G. , FRY, S.C. et ALBERSHEIM, P. (1984).
Structure and function of the primary cell walls of plants.
Ann. Rev. Plant Physiol., 53, 625-686.
- METRAUX, J.P., RICHMOND, P.A. et TAIZ, L. (1980).
Control of cell elongation of Nitella by endogenous cell wall pH.
gradients, multi-axial extensibility and growth studies.
Plant Physiol., 65, 204-210.
- MIKI, N.K., CLARKE, K.J. et MACULLY, E.M. (1980).
A histological and histochemical comparison of the mucilages on
the root tips of several grasses.
Can. J. Bot., 58, 2581-2593.
- MOLLARD, A. et ROBERT, D. (1984).
Etude de la lignine pariétale et extracellulaire des suspensions
cellulaires de Rosa glauca.
Physiol. Vég., 22, 3-17.
- MONTREUIL, J., SPIK, G., FOURNET, B. et TOLLIER, M.T. (1981).
Glucides
In : B. DEYMIE, J.L. MULTON et D. SIMON (Eds.), Techniques
d'analyse et de contrôle dans les industries alimentaires, vol.
4. Apria, Pp. 85-143.
- MOORE, T.S.Jr. (1973).
An extracellular macromolecular complex from the surface of
soybean suspension cultures.
Plant Physiol., 51, 529-536.
- MORRE, D.J., JONES, D.D. et MOLLENHAUER, H.H. (1967).
Golgi apparatus mediated polysaccharide secretion by outer root
cap cells of Zea mays. I - Kinetics and secretory pathway.
Planta, 74, 286-301.
- MORVAN, C. (1977).
Etude de quelques propriétés physicochimiques de la paroi de
Lemna minor L.
Thèse de 3ème cycle. Rouen.
- MORVAN, C. (1983).
Etude de quelques propriétés physicochimiques de parois végétales.
Influence de la structure de leurs polysaccharides acides.
Thèse Doct. Sci., Rouen, 167 P.
- MORVAN, H. (1982).
Libération de polymères pectiques acides au cours de la croissance
de la suspension cellulaire de Silène.
Physiol. Vég., 20, 671-678.

- MUIR, W.H., HILDEBRANDT, A.C. et RICKER, A.J. (1958).
The preparation, isolation and growth, in culture of single cells from higher plants.
Ann. J. Bot., 45, 589-597.
- MURASHIGE, T. et SKOOG, F. (1962).
A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.
Plant Physiol., 15, 473-497.
- NELSON (1944).
A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose.
J. Biol. Chem., 153, 375-380.
- NEVINS, D.J. ENGLISH, P.D. et ALBERSHEIM, P. (1967).
The specific nature of plant cell walls polysaccharides.
Plant Physiol., 42, 900-906.
- NISHITANI, K. et MASUDA, Y. (1979).
Growth and cell wall changes in azuki bean epicotyls. I - Changes in wall polysaccharides during intact growth.
Plant and Cell Physiol., 20, 63-74.
- NISHITANI, K. et MASUDA, Y. (1980).
Modification of cell wall polysaccharides during auxin induced growth in azuki bean epicotyl segments.
Plant and Cell Physiol., 21, 169-181.
- OLSON, A.C. (1971).
Secreted polysaccharides and proteins from Nicotiana tabacum suspension cultures.
In : Les cultures de tissus de Plantes, Colloques Internationaux C.N.R.S., N°193, Paris, Pp. 41-420.
- OLSON, A.C., EVANS, J.J., FREDERICK, D.P. et JANSEN, E.F. (1969).
Plant suspension culture medium macromolecules. Pectic substances, proteins and peroxydases.
Plant Physiol., 44, 1594-1600.

PAULL, R.E. et JONES, R.L. (1975).

Studies on the secretion of maize root cap slim III - Histochemical and autoradiographic localization of incorporated fucose.

Planta, 127, 97-110.

RIMINGTON, C. (1931).

The carbohydrate complex of serum protein. II - Improved method for isolation and redetermination of structure. Isolation of glucosaminodimannose from proteins of ox blood.

Biochem. J., 25, 1062-1071.

ROUGIER, M. (1981).

Secretory activity of the root cap.

In : W. TANNER et F.A. LOEWUS (Eds) Plant carbohydrates II, Encyclopedia of plant physiology, New Series, vol. 13B. Springer Verlage, Berlin, Heidelberg, New York, Pp. 542-574.

SAKURAI, N. et MASUDA, Y. (1977).

Effect of IAA on cell wall lossening changes in mechanical properties and non cellulosic glucose content of Avena coleoptile cell wall.

Plant and Cell Physiol., 18, 587-594.

SASAKI, T. et KAINUMA, K. (1984).

Control of starch and exocellular polysaccharides biosynthesis by gibberellic acid with cells of sweet potato cultured "in vitro".

Plant Cell Reports, 3, 23-26.

SCOTT, J.E. (1965).

Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts.

In : R.L. WHISTLER (Ed), Methods of carbohydrate chemistry, vol. 5, Academic Press, New York, Pp. 38-44.

SIDDIQUI, I.R. et WOOD, P.J. (1976).

Structural investigation of oxalate soluble rapessed, Brassica campestris. IV - Pectic polysaccharides.

Carbohydr. Res., 50, 97-107.

SIMPKINS, I. et STREET, H.E. (1970).

Studies on the growth in culture of plant cell. VII - Effects of kinetin on the carbohydrate and nitrogen metabolism of Acer pseudoplatanus L. cells grown in suspension culture.

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

- SPELLMAN, M.W., McNEIL, M., DARVILL, A.G. et ALBERSHEIM, P. (1983).
Characterization of a structurally complex heptasaccharide isolated
from the pectic polysaccharide Rhamnogalacturonan.
II - Carbohydr. Res., 122, 131-153.
- STODDART, R.W. et NORTHCOTE, D.H. (1967).
Metabolic relationships of isolated fraction of the pectic
substances of actively growing sycamore cells.
Biochem. J., 105, 45-59.
- STREET, H.E. (1966).
The nutrition and metabolism of plant tissue and organ cultures.
In : E.N. WILLMER (Ed), Cells and tissues in culture. vol 3,
Academic Press, New York, Pp. 533-629.
- STREET, H.E. (1968).
The induction of cell division in plant suspension cultures.
Colloques nationaux du C.N.R.S. Les cultures de tissus de plantes.
Strasbourg. Pp. 177-193.
- STUART, D.A. et JONES, R.L. (1977).
Roles of extensibility and turgor in gibberellin - and dark -
stimulated growth.
Plant Physiol., 59, 61-68.
- STUART, R. et STREET, H.E. (1969).
Studies on the growth in culture of plant cells. IV - The
initiation of division in suspensions of stationary-phase cells of
Acer pseudoplatanus L..
J. Exp. Bot., 20, 556-571.
- STUART, R. et STREET, H.E. (1971).
Studies on the growth in culture of plant cells.
J. Exp. bot., 22, 96-106.
- TAKEUCHI, Y. et KOMAMINE, A. (1978).
Changes in the composition of cell wall polysaccharides of
suspension cultured Vinca rosea cells during culture.
Plant Physiol., 42, 21-28.
- TAKEUCHI, Y. et KOMAMINE, A. (1980 a).
Turnover of cell wall polysaccharides of a Vinca rosea suspension
culture. I - Synthesis and degradation of cell wall components.
Plant Physiol., 48, 271-277.

- TAKEUCHI, Y. et KOMAMINE, A (1980 b).
Turnover of cell wall polysaccharides of *Vinca rosea* suspension culture. III - Turnover of arabinogalactan.
Plant Physiol., 50, 113-118.
- TALMADGE, K.W., KEEGSTRA, K., BAUER, W.D. et ALBERSHEIM, P. (1973).
The structure of plant cell walls. I - The macromolecular components of the walls of suspension cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides.
Plant Physiol., 51, 158-173.
- TAN, K.T. et NOPAMORNBODY, O. (1979).
Electron microbeam scanning of element distribution zones in soil rhizosphere and plant tissue.
Soil Sci., 127, 235-241.
- TERRY, M.E. et JONES, R.L. (1981).
Soluble cell wall polysaccharides released from pea stems by centrifugation.
Plant Physiol., 68, 531-537.
- TILLMANS, J. et PHILIPPI, K. (1929).
The carbohydrate content of the important proteins of foodstuffs on a colorimetric procedure for the determination of nitrogen free sugar in protein.
Biochem. Z., 215, 36-60.
- VINTERS, H., DAINTY, J. et TYREE, M.T. (1977).
Cell wall elastic properties of *Chara corallina*.
Can. J. Bot., 55, 1933-1939.
- WILDER, M.M. et ALBERSHEIM, P. (1973).
The structure of the plant cell walls. VII - A structural comparison of the wall hemicellulose of cell suspension cultured of sycamore and of red kidney bean.
Plant Physiol., 51, 889-893.
- WILKIE, K.C.B. et WOO, S.L. (1977).
A heteroxylan and hemicellulosic materials from Bambou leaves, and a reconsideration of the general nature of commonly occurring xylans and other hemicellulose.
Carbohydr. Res., 57, 145-162.
- WILSON, K. (1964).
The growth of plant cell wall.
Int. Rev. Cyt., 17, 1-49

- WRIGHT, K. et NORTHCOTE, D.H. (1974).
The relationship of root cap slimes to pectins.
Biochem. J., 139, 525-534.
- WRIGHT, K. et NORTHCOTE, D.H. (1975).
An acidic oligosaccharide from maize slime.
Phytochem ., 14, 1793-1798.
- WUYTACK, R et GILLET, C (1978).
Nature des liaisons de l'ion calcium dans la paroi de Nitella
flexilis.
Can. J. Bot., 56, 1439-1443.
- YORK, W.S., DARVILL, A.G. et ALBERSHEIM, P. (1984).
Inhibition of 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid-stimulated
elongation of pea stem segments by xyloglucan oligosaccharide.
Plant Physiol., 75, 295-297.

RESUME

Au cours de la croissance des suspensions cellulaires de Silène (Silene alba (Miller) E.H.L. Krause), de Ronce (*Rubus fruticosus* L.) et de Tabac (*Nicotiana tabacum*), il se produit une excrétion de polysaccharides d'origine pariétale dans le milieu de culture.

Les polymères pectiques acides (PPA) sont caractérisés par leur contenu en acide uronique. La quantité libérée dans le milieu évolue parallèlement à la croissance.

Réintroduits dans des milieux de culture neufs, les PPA modifient la croissance en la favorisant (PPA Silène et Tabac) ou en l'inhibant (PPA Ronce), sans spécificité apparente.

L'effet stimulant des PPA de Silène pourrait s'expliquer par leur pouvoir tampon, leur effet chélateur à l'égard du fer et la présence d'une activité de type gibbérellinique.

Les PPA peuvent donc être considérés comme un facteur important de la régulation de la croissance des cellules végétales.

