

50376  
1986  
143

50376  
1986  
143

THESE

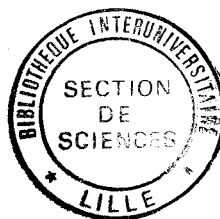
DE

DOCTORAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET  
TECHNIQUES DE LILLE  
FLANDRES-ARTOIS

par



Henri MORVAN

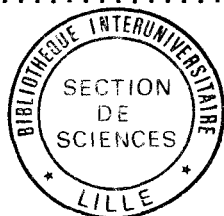
ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES DES POLYMERES PECTIQUES  
ACIDES EXCRETES DANS LE MILIEU DE CULTURE PAR LA  
SUSPENSION CELLULAIRE DE SILENE  
(Silene alba (Miller) E.H.L. Krause)

Soutenu le 26 Septembre 1986

R. BOURIQUET,	Professeur à l'université de Lille	Président
B. FOURNET,	Professeur à l'université de Lille	Rapporteur
M. THELLIER,	Professeur à l'université de Rouen	Rapporteur
F. BARNAUD,	Professeur à l'université de Grenoble	
G. FRANZ,	Professeur à l'université de Regensburg (All.)	
K. TRAN THAN VAN,	Directeur de recherche, CNRS, Gif/Yvette	

## SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
GENERALITES.....	4
I . LES SUSPENSIONS CELLULAIRES.....	5
II . LE MILIEU DE CULTURE.....	6
III . LES PAROIS VEGETALES.....	9
IV . COMPOSITION CHIMIQUE DES POLYSACCHARIDES EXTRACELLULAIRES.....	16
V . ROLE PHYSIOLOGIQUE ET PROPRIETES BIOLOGIQUES DES POLYMERES PARIETAUX.....	19
LES PARAMETRES CULTURAUX DE LA SUSPENSION CELLULAIRE DE SILENE.....	23
I. LA SUSPENSION CELLULAIRE DE SILENE , UN MODELE BIOLOGIQUE.....	23
1 - CROISSANCE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE.....	23
A. Evaluation de la biomasse:.....	24
B. Modification des conditions d'ensemencement. Définition du cycle de culture :.....	26
C. Choix des récipients de culture :.....	29
D. Importance de l'agitation :.....	33
E. Mesure des concentrations ioniques intracellulaires :.....	35
2 - LA PAROI PRIMAIRE DES CELLULES DE SILENE.....	35
A. Structure des parois en microscopie photonique :.....	35
B. Isolement des parois :.....	35



C. Etude ultrastructurale de la paroi :.....	37
a) Apport de matériel pariétal.....	42
b) Emission de fractions pariétales dans le milieu de culture.....	42
D. Etude analytique de la paroi :.....	48
a) L'eau de gonflement des parois.....	48
b) Composition ionique des parois.....	52
c) Composition centésimale en monosaccharides des fractions pectiniques des parois.....	54
d) Capacité d'échange cationique des parois isolées.....	54
II . LE MILIEU DE CULTURE, TEMOIN DES ECHANGES.....	56
1 - COMPOSITION MINERALE ET PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES.....	56
A. Données initiales :.....	56
B. Evolution du volume du milieu de culture :.....	60
C. Evolution de la composition cationique :.....	60
D. Evolution du pH :.....	62
E. Evolution du potentiel osmotique :.....	62
2 - ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES COMPOSES ORGANIQUES. 64	
A. Mesure de la consommation des saccharides par les cellules :.....	67
B. Tamisage moléculaire du milieu :.....	67
C. Extraction et estimation globale des polymères :.....	69
ETUDE DES P.P.A. EXTRACELLULAIRES.....	73
I . DEFINITION DES PPA ET SIGNIFICATION PHYSIOLOGIQUE DE LEUR EXCRETION.....	73
1 - DEFINITION DES POLYMERES PECTIQUES ACIDES (P.P.A.).....	74
A. Précipitations sélectives :.....	74
B. Dosage des acides uroniques :.....	76
C. Mise en évidence cytochimique :.....	78

2 - RELATION ENTRE L'EXCRETION DES P.P.A. ET LA CROISSANCE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE.....	78
A. Variation quantitative des P.P.A. au cours de la culture :	78
B. Influence des variations de la croissance sur l'excrétion des P.P.A. :	81
<b>II . ETUDE BIOCHIMIQUE DES POLYSACCHARIDES EXTRACELLULAIRES.....</b>	<b>86</b>
1 - ANALYSE DE LA COMPOSITION GLOBALE EN MONOSACCHARIDES.....	86
A. Choix des méthodes d'hydrolyse :	86
B. Analyse des oses neutres :	89
C. Analyse des acides uroniques :	92
2 - SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS.....	96
A. Technique de fractionnement :	96
B. Analyse de la composition en monosaccharides :	99
3 - COMPOSITION DES FRAGMENTS SOLIDES.....	101
<b>III . PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES P.P.A.....</b>	<b>104</b>
1 - DETERMINATION DE L'ACIDITE DES P.P.A.....	106
A. Analyse des courbes de neutralisation :	106
B. Estimation de la dissociation :	108
C. Estimation des masses équivalentes :	108
D. Degré d'estérification :	109
2 - DETERMINATION DE LA SELECTIVITE IONIQUE DES P.P.A.....	111
A. Variations des coefficients d'activité du calcium dans le milieu de culture :	113
B. Estimation des coefficients d'activité à neutralisation complète :	113
<b>ACTIVITE BIOLOGIQUE DES POLYMERES PECTIQUES ACIDES.....</b>	<b>116</b>
<b>I . EFFETS DES P.P.A. SUR LA CROISSANCE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE DE SILENE.....</b>	<b>118</b>
1 - EFFETS DES P.P.A. BRUTS.....	118

A.	Caractérisation des effets sur l'ensemble des paramètres de croissance :.....	121
B.	Caractérisation des effets sur les paramètres du milieu de culture :.....	123
C.	Influence de l'origine des P.P.A. :.....	127
D.	Mise en évidence d'effets inhibiteurs :.....	127
2 -	EFFETS DES P.P.A. APRES FRACTIONNEMENT.....	129
A.	Fractionnement par dialyse et tamisage moléculaire :.....	129
B.	Fractionnement par chromatographie d'échange d'ions :.....	135
3 -	EFFETS DES P.P.A. APRES TRAITEMENTS PHYSICOCHIMIQUES.....	139
A.	Protonation des groupements acides :.....	139
B.	Déestérification des groupements carboxyles :.....	141
II .	EFFETS DES P.P.A. SUR D'AUTRES SYSTEMES BIOLOGIQUES.....	141
1 -	EFFETS SUR LA CROISSANCE.....	143
A.	Effets sur la croissance des suspensions cellulaires d'Erable et de Ronce :.....	143
B.	Effets sur la multiplication végétative des Lentilles d'eau :.....	145
2 -	EFFETS ANALOGUES A CEUX DE FACTEURS DE CROISSANCE.....	149
A.	Mise en évidence d'une synergie avec le 2,4-D :.....	149
B.	Mise en évidence d'une action "like-gibberelline" :.....	151
	<b>BILAN ET DISCUSSION.....</b>	<b>158</b>
I .	INTERET ET LIMITES DU MODELE BIOLOGIQUE.....	159
1 -	CARACTERISTIQUES DE LA SUSPENSION CELLULAIRE.....	159
2 -	LES EVENEMENTS DANS LE COMPARTIMENT PARIETAL.....	161
3 -	LE MILIEU DE CULTURE, TEMOIN DES ECHANGES.....	165
4 -	CONCLUSION.....	167

II . CONSIDERATIONS SUR L'EXCRETION DE POLYMERES PECTIQUES ACIDES.....	168
1 - NATURE ET PROPRIETES DES P.P.A.....	168
2 - LES P.P.A. ET LA CROISSANCE CELLULAIRE.....	171
3 - CONSEQUENCES DE LA PRESENCE DES P.P.A. DANS LE MILIEU DE CULTURE.....	174
4 - EFFETS DES P.P.A. SUR LA CROISSANCE.....	176
5 - CONCLUSION.....	180
 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	 181
 BIBLIOGRAPHIE.....	 187
 ANNEXES TECHNIQUES.....	 222

# TABLE DES ILLUSTRATIONS ET DES TABLEAUX

## PLANCHES

Planche I : Aspects généraux des cellules et des parois en microscopie photonique.....	41
Planche II : Intégration de matériel pariétal.....	44
Planche III : Dégradation de la paroi.....	47

## FIGURES

Figure 1.1 : Croissance de la suspension cellulaire de silène au cours d'un cycle de culture.....	25
Figure 1.2 : Influence de la masse de l'ensemencement sur la croissance de la suspension cellulaire de silène.....	28
Figure 1.3 : Influence de l'âge des cellules ensemencées sur la croissance de la suspension cellulaire de silène.....	28
Figure 1.4 : Croissances comparées de suspensions cellulaires de silène cultivées en tube ou en fiole.....	31
Figure 1.5 : Variations des concentrations ioniques intracellulaires au cours de la culture de la suspension cellulaire de silène.....	36
Figure 1.6 : Variations du volume du milieu au cours de la culture de la suspension cellulaire de silène.....	58
Figure 1.7 : Variations des concentrations ioniques dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de silène.....	59
Figure 1.8 : Variations du pH du milieu de culture de la suspension cellulaire de silène.....	61
Figure 1.9 : Variations du potentiel osmotique du milieu de culture de la suspension cellulaire de silène.....	63
Figure 1.10 : Variations des saccharides totaux et réducteurs dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de silène...	66
Figure 1.11 : Profils d'éluion des milieux de culture de la suspension cellulaire de silène, après tamisage moléculaire.....	68

Figure I.12 : Répartition des différentes catégories de polysaccharides libérés dans le milieu de culture par les suspensions cellulaires de silène.....	71
Figure II.1 : Aspect des polymères extracellulaires autour des cellules.....	79
Figure II.2 : Variations des acides uroniques excrétés dans le milieu de culture pendant la croissance de la suspension cellulaire de silène.....	80
Figure II.3 : Effets des basses températures sur la croissance de la suspension cellulaire de silène et sur l'excrétion de P.P.A. dans le milieu de culture.....	83
Figure II.4 : Protocole d'hydrolyses des polymères et de préparation des acétates d'alditol pour l'analyse des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse.....	88
Figure II.5 : Composition centésimale (% molaire) en monosaccharides neutres des polymères totaux excrétés par la suspension cellulaire de silène, au cours de la culture.....	90
Figure II.6 : Composition centésimale (% molaire) en monosaccharides neutres des P.P.A excrétés par la suspension cellulaire de silène, au cours de la culture.....	91
Figure II.7 : Etapes de la transformation de l'acide D-galacturonique en L-galactitol, pendant la préparation des acétates d'alditols pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.....	93
Figure II.8 : Analyse par spectrométrie de masse de la distribution des ions constituant l'acétate de galactitol.....	94
Figure II.9 : Séparation et identification par CPG des monosaccharides constituant les P.P.A.....	95
Figure II.10 : Composition centésimale (% molaire) en monosaccharides des P.P.A. en fonction de la durée de culture de la suspension cellulaire de silène.....	97
Figure II.11 : Composition centésimale (% molaire) en monosaccharides des différentes fractions séparées sur DEAE Sephadex de polysaccharides extracellulaires de la suspension cellulaire de silène, après 14 jours de culture.....	100
Figure II.12 : Amas polysaccharidiques dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de silène, âgée de 14 jours.....	102
Figure II.13 : Courbes de neutralisation par NaOH des P.P.A excrétés par la suspension cellulaire de silène après différents temps de culture.....	105
Figure II.14 : Courbes de neutralisation par différentes bases de P.P.A. excrétés par la suspension cellulaire de silène, après 7 jours de culture.....	107



Figure II.15 : Courbes de neutralisation par NaOH des P.P.A. excrétés par la suspension cellulaire de silène (7 jours) avant et après saponification des fonctions esters.....	112
Figure III.1 : Effets des P.P.A. introduits dans un milieu neuf, sur la croissance de la suspension cellulaire de silène et sur l'excrétion de nouveaux P.P.A. dans le milieu de culture..	117
Figure III.2 : Modification du protocole de préparation en quantité P.P.A.....	120
Figure III.3 : Effets des P.P.A. sur la croissance de la suspension cellulaire de silène.....	122
Figure III.4 : Effets de l'addition de P.P.A. bruts ou de P.P.A. (H <sup>+</sup> ) sur l'évolution du pH du milieu, au cours de la culture de la suspension cellulaire de silène.....	126
Figure III.5 : Comparaison entre les effets provoqués sur la croissance et sur l'excrétion de nouveaux P.P.A., par l'introduction de polymères recueillis par différentes voies, à partir de milieux de culture de 14 jours.....	130
Figure III.6 : Distribution des effets provoqués sur la croissance, par les constituants du milieu de culture, après leur fractionnement par tamisage moléculaire.....	132
Figure III.7 : Distribution des effets provoqués sur la croissance, par des P.P.A. extraits par précipitation au C.T.A.B. et fractionnés par tamisage moléculaire.....	133
Figure III.8 : Distribution des effets provoqués sur la croissance, par des polymères du milieu de culture, après fractionnements successifs par tamisage moléculaire puis par chromatographie d'échange d'ions.....	136
Figure III.9 : Distribution des effets provoqués sur la croissance, par des P.P.A. extraits par précipitation au C.T.A.B., après fractionnements successifs par tamisage moléculaire puis par chromatographie d'échange d'ions.....	137
Figure III.10 : Effets provoqués sur la croissance de la suspension cellulaire de silène, par l'addition de P.P.A. bruts ou de P.P.A. (H <sup>+</sup> ).....	138
Figure III.11 : Effets provoqués par l'addition de P.P.A. de silène, dans les milieux de culture neufs des suspensions cellulaires de silène, d'érable et de ronce, sur leur croissance et sur l'excrétion de nouveaux P.P.A.....	144
Figure III.12 : Effets provoqués par l'addition de P.P.A. de silène, sur le développement végétatif des lentilles d'eau.....	147
Figure III.13 : Effets combinés du 2.4-D et des P.P.A. de silène sur la croissance des plantules de concombre.....	150

Figure III.14 : Action de l'acide gibberellique et de l'AMC <sub>1618</sub> sur la croissance de la suspension cellulaire de silène et sur l'excétion des P.P.A. dans le milieu de culture.....	152
Figure III.15 : Mise en évidence des gibberellines et des saccharides associés présents dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de silène (14 jours), après leur séparation par chromatographie sur couche fine.....	153
Figure III.16 : Activité gibberellinique dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de silène.....	156

## TABLEAUX

Tableau I.1 : Evolution de la teneur en eau des cellules au cours de la culture de la suspension cellulaire de silène.....	26
Tableau I.2 : Comparaison entre les volumes et la surface d'échanges gazeux des tubes et des flacons utilisés pour la culture des suspensions cellulaires de silène.....	30
Tableau I.3 : Comparaison de la croissance de suspensions cellulaires de silène cultivées dans des tubes ou dans des flacons.....	32
Tableau I.4 : Influence du mode d'agitation sur la croissance de la suspension cellulaire de silène.....	34
Tableau I.5 : rendements d'extraction des parois isolées par rapport à la M.F. et à la M.S. des cellules de silène, après différents temps de culture.....	38
Tableau I.6 : Evolution des volumes pariétaux et de leur rapport aux volumes cellulaires au cours de la culture des suspensions cellulaires de silène.....	39
Tableau I.7 : taux de gonflement des parois isolées de cellules de silène à différents temps de culture.....	49
Tableau I.8 : Variations de la composition cationique des parois au cours de la culture de la suspension cellulaire de silène.....	50
Tableau I.9 : Variations du rapport Ca/Mg et du coefficient de sélectivité $K(Ca/Mg)$ dans les parois au cours de la culture de la suspension cellulaire de silène.....	51
Tableau I.10 : Composition en monosaccharides des pectines extraites à l'eau bouillante des parois isolées de cellules de silène cultivées en suspension.....	53
Tableau I.11 : Capacités d'échange cationique (CEC) des parois isolées de cellules de silène à différents temps de culture.....	55

Tableau I.12 : composition du milieu de LAMPORT modifié par LESCURE (1966).....	57
Tableau I.13 : Variations des potentiels osmotiques mesurés en fin de culture (14 jours), suite à des modification des conditions de culture provoquant des perturbations de la croissance de la suspension cellulaire de silène.....	65
Tableau I.14 : Evolution des polymères solubles extracellulaires au cours de la culture des suspensions cellulaires de silène.....	70
Tableau II.1 : Influence de la concentration du C.T.A.B., du pH et de la teneur en sels sur le rendement de précipitation des P.P.A. et sur leur teneur en acides uroniques.....	75
Tableau II.2 : Comparaison des résultats de dosage des acides uroniques entre les méthodes de DISCHE au carbazole, avec ou sans correction, de SCOTT au 3,5 dimethylphenol (3,5 DMP) et de BLUMENKRANTZ et ASBOE-HANSEN au meta hydroxydiphenyle.....	77
Tableau II.3 : Excrétion des P.P.A. dans le milieu, au cours de la culture de la suspension cellulaire de silène.....	82
Tableau II.4 : Influence de traitements activateurs ou inhibiteurs sur la croissance de la suspension cellulaire de silène et sur l'excrétion de P.P.A. dans le milieu après 14 jours de culture.....	84
Tableau II.5 : Comparaison entre différentes méthodes d'hydrolyse chimique.....	87
Tableau II.6 : Distribution en masse et composition en oses neutres et acides uroniques des fractions séparées sur DEAE-Sephadex A 50 d'un milieu après 14 jours de culture de la suspension cellulaire de silène.....	98
Tableau II.7 : Composition en monosaccharides (% molaire) des fragments insolubles prélevés dans le milieu de suspensions cellulaires de silène après 14 jours de culture. Comparaison avec les compositions en monosaccharides des P.P.A. et des polymères totaux correspondants.....	103
Tableau II.8 : Détermination des masses équivalentes des P.P.A. excrétés par les suspensions cellulaires de silène après 7 ou 14 jours de culture.....	110
Tableau II.9 : Variations des concentrations, activités et coefficients d'activité du calcium dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de silène.....	114
Tableau III.1 : Influence de la quantité de saccharose et de P.P.A. ajoutés dans le milieu de culture sur la croissance et l'excrétion de P.P.A. par les suspensions cellulaires de silène.....	119

Tableau III.2 : effets des P.P.A. introduits dans le milieu sur l'évolution de ses paramètres (volume, potentiel osmotique, pH) après 14 jours de culture de la suspension cellulaire de silène.....	124
Tableau III.3 : Concentrations des cations ( $K^+$ , $Na^+$ , $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ ) dans le milieu après 14 jours de culture de la suspension cellulaire de silène, en présence ou non de P.P.A.....	125
Tableau III.4 : Effet des P.P.A. extraits après différents temps de culture et introduits dans les milieux neufs avant l'ensemencement, sur la croissance (MF en g) des suspensions cellulaires de silène et sur l'excretion de P.P.A., après 14 jours de culture.....	128
Tableau III.5 : Comparaison des effets respectifs provoqués par les P.P.A. bruts et dialysés sur la croissance de la suspension cellulaire de silène (14 jours de culture).....	134
Tableau III.6 : Comparaison des effets produits sur la croissance par des P.P.A. séparés par chromatographie d'échange ionique (DEAE Séphadex A 50) puis modifiés (forme H) ou non.....	140
Tableau III.7 : Influence d'un traitement de déestérification des acides uroniques sur les effets produits par les P.P.A. sur la croissance de la suspension cellulaire de silène.....	142
Tableau III.8 : Effets des P.P.A., extraits des milieux de culture des suspensions cellulaires de silène, érable et ronce et réintroduits dans les milieux neufs sur la croissance de ces trois souches.....	146
Tableau III.9 : Croissance des plantules de concombre mises à germer sur différentes solution de 2,4-D. La croissance est exprimée par la longueur totale des plantules après 2, 3 et 4 jours de culture.....	148
Tableau III.10 : Répartition de la radioactivité ( $^{14}C$ ) introduite sous forme de $GA_3$ dans le milieu de culture de suspensions cellulaire de silène âgées de 14 jours, après précipitation de l'ensemble des polymères par l'éthanol (1) et des P.P.A. par le cétavlon (2,3,4).....	154

## INTRODUCTION

La cellule est définie comme l'entité fondamentale, morphologique et fonctionnelle de tous les organismes vivants. A ce titre, elle établit des relations avec son environnement et avec d'autres cellules. Ces rapports se traduisent par des échanges de substances dissoutes et par des contacts intercellulaires qui aboutissent parfois à la pénétration d'une cellule dans l'autre (fécondation, parasitisme).

Chez les végétaux, les études relatives aux échanges, notamment celles qui concernent la nutrition, ont commencé au niveau de la racine. La fonction principale de cet organe est d'assurer l'approvisionnement de la plante en eau et sels minéraux. Toutefois, l'extrapolation des résultats à l'ensemble des cellules de l'organisme est délicate en raison des différences de localisation et de fonction.

La culture des tissus et des cellules in vitro a permis d'avancer vers une uniformisation de ces dernières qui perdent partiellement leur caractère différencié. De rapides progrès ont été accomplis dans la description détaillée de la nutrition minérale mais également dans la connaissance des processus qui gouvernent la division et l'élongation des cellules. Outre la meilleure homogénéité du matériel biologique, l'accès direct au milieu de culture dont la composition peut être vérifiée et ajustée à tout moment est un atout supplémentaire. La simplification des systèmes biologiques est une étape nécessaire pour parvenir à la modélisation des structures et des fonctions étudiées. Cette approche impose la maîtrise ou à défaut le blocage du plus grand nombre de paramètres, pour permettre le traitement par le calcul des données quantitatives.

A mi-chemin entre les colonies tissulaires qui ont servi de point de départ à la démarche simplificatrice et les protoplastes qui en constituent l'étape ultime, les suspensions cellulaires représentent un système biologique dont l'entretien dans un milieu nutritif liquide offre de nombreux avantages. Globalement toutes les cellules d'un lot cultural se trouvent dans des conditions comparables d'échanges, ce qui permet de déduire un comportement cellulaire moyen à partir de l'étude du collectif que constituent ces suspensions. En outre, le potentiel de biosynthèse des cellules peut être exploité pour la production de métabolites primaires et secondaires. Parmi les nombreux composés organiques qui sont rejetés dans le milieu de culture, les polysaccharides d'origine pariétale ont été très étudiés au niveau de leur structure chimique car les auteurs les ont considérés comme des images partielles de la matrice des parois.

Premier rempart cellulaire, la paroi des végétaux est la structure directement exposée aux conditions extérieures et ses propriétés mécaniques ont motivé les premières études de son ultrastructure et de sa composition chimique. La présence de macromolécules, polysaccharides et protéines, dotées de propriétés physicochimiques liées à leurs charges électrostatiques, permet de la considérer comme le compartiment cellulaire où s'effectue la première étape des échanges ioniques. Par ailleurs, le rôle et le comportement de la paroi au cours de la croissance ou lors de la reconnaissance entre cellules constituent les aspects de son métabolisme qui intéresse actuellement les chercheurs. A ce titre, la structure pariétale est considérée comme un carrefour où interfèrent les facteurs de croissance, traduisant leurs effets par l'intermédiaire de clés métaboliques telles que les enzymes, le calcium et les constituants pariétaux eux-mêmes. Les perspectives offertes par la caractérisation des propriétés des "oligosaccharines" (ALBERSHEIM et DARVILL, 1985), accentuent encore l'importance de la paroi dans la physiologie cellulaire. Ces molécules sont capables, entre autre, d'initier l'autolyse cellulaire, la synthèse de substances de défense et d'induire des modifications de l'expression organogénétique des tissus.

A l'origine de notre démarche, les suspensions cellulaires ont été choisies pour caractériser les échanges ioniques. La mesure des potentiels intracellulaires a constitué une première étape destinée à apprécier leur participation dans les équilibres et dans les mouvements des solutés chargés électriquement. Quel que soit le modèle envisagé, la paroi participe à cette distribution car elle est dotée de charges

électronégatives peu ou pas diffusibles. Les contacts privilégiés qu'elle a avec le milieu de culture apparaissent comme un centre d'intérêt, en tant que tel et sont à l'origine de l'orientation actuelle de ce travail.

Le premier objectif est de sélectionner, parmi les composés organiques rejetés dans le milieu de culture, les polysaccharides susceptibles de modifier ses paramètres (distribution ionique, pH...) en raison de leurs propriétés acides. L'étude détaillée de ces polysaccharides doit permettre : i) de préciser leur origine ; ii) d'apprécier la signification de leur excretion par rapport au métabolisme de la paroi au cours de la croissance cellulaire ; iii) de mettre en évidence les modifications qu'ils provoquent dans le milieu de culture ; iiiii) de mesurer leurs effets sur la croissance de la suspension cellulaire qui les produit.

L'approche expérimentale permettant d'atteindre ces buts ne peut se concevoir qu'en terme de relations fonctionnelles avec les parois, considérées à la fois comme l'origine probable des polymères libérés dans le milieu de culture et comme le premier compartiment cellulaire directement en contact avec lui. Parmi les moyens mis en oeuvre, l'analyse biochimique et la caractérisation des propriétés physico-chimiques sont menées, en parallèle, sur les polysaccharides extracellulaires et sur ceux extraits des parois isolées. Pour cerner la nature des effets provoqués par les polymères sur la croissance, les essais sont étendus à d'autres systèmes biologiques, notamment à ceux qui sont connus pour leur sensibilité aux facteurs de croissance.

Le travail a été réalisé avec la suspension cellulaire de silène (Silene alba (Miller) E.H.L. Krause). Par souci de rigueur, les conditions de culture ont été vérifiées puis délimitées précisément. La présentation des résultats est précédée d'un résumé des travaux figurant dans la littérature et qui sont directement liés au thème de cette étude.

## GENERALITES

Depuis un demi-siècle, la culture "in vitro" des tissus végétaux s'est progressivement imposée comme outil méthodologique en raison des nombreux résultats qu'elle a apporté dans divers domaines, notamment la nutrition minérale, la croissance et la division cellulaire, l'organogénèse et l'embryogénèse. Parmi les différentes méthodes mises au point, la culture de suspensions cellulaires en milieu liquide a permis la réalisation de certaines expérimentations impossibles sur la plante entière .

Les souches de tabac, de carotte et d'érable sont les mieux connues parce qu'elles ont été utilisées pour réaliser un très grand nombre de travaux. L'espoir d'exploiter le potentiel de biosynthèse des cellules pour produire des métabolites d'intérêt industriel ou médical justifie les efforts consacrés aux études appliquées (MISAWA, 1980). Le nombre considérable de composés susceptibles d'être produits par cette voie a été recensé (NICHELL, 1980). En dépit du manque de rentabilité économique des procédés (PETIARD, 1979), les travaux se poursuivent avec pour but d'obtenir des métabolites rares ou nouveaux, difficiles à fabriquer par synthèse chimique. D'un point de vue plus fondamental, tous les grands secteurs du métabolisme cellulaire ont été abordés, notamment la nutrition (DOUGALL, 1980) et les biotransformations (STABA, 1980). Les suspensions cellulaires ont également servi à caractériser les mécanismes d'absorption (GRIGNON, 1974 ; PENNARUM, 1980 ; THOIRON, 1984), les propriétés électrophysiologiques (MORVAN, 1973 ; RONA, 1982) et les paramètres physicochimiques des parois (MORVAN Cl., 1983) aboutissant à la définition de modèles fonctionnels pour la description des échanges cellulaires.



## I - LES SUSPENSIONS CELLULAIRES

Les suspensions cellulaires sont des systèmes biologiques généralement formés d'un ensemble de cellules isolées et d'aggrégats cultivés en mélange. La présence de massifs cellulaires plus ou moins développés résulte de la difficulté qu'ont les cellules à se séparer après chaque division. L'intervention du calcium comme élément stabilisant des pectines qui constituent le ciment intercellulaire est souvent invoquée (NORTHCOTE, 1963). Pour résoudre cette difficulté, des enzymes pectino- et cellulolytiques (STREET et al., 1970) ou des agents chélatants (EL HINNAWY, 1974) sont introduits dans les milieux de culture. Par ailleurs, le fer et le cuivre sont signalés comme participant à la stabilisation de protéines intrapariétales (GINZBURG, 1961). Ces dernières participent à la stabilisation des parois par les liaisons covalentes qu'elles établissent avec les pectines (LAMPART, 1965 ; KEEGSTRA et al., 1973). Des composés phénoliques participent également au renforcement de la structure pariétale (FRY, 1979 et 1982-a). Inversement, l'agitation permanente qui règne dans la culture impose des contraintes mécaniques qui facilitent le détachement des cellules, individuellement ou par petits groupes, à la périphérie des amas. Le degré de dissociation varie naturellement au cours de la culture (TORREY et REINERT, 1961 ; HENSHAW et al., 1966 ; KING et STREET, 1973 ; DUBOIS, 1980). En modifiant la composition du milieu de culture WALLNER et NEVINS (1973) améliorent la dissociation des cellules. Les facteurs de croissance, notamment le 2,4-D, facilitent également la séparation et l'élongation des cellules (CARCELLER et al., 1971 ; LEGUAY et GUERN, 1975 ; KING, 1976 ; WITHERS, 1976). Les basses températures et les gibbérellines produisent les mêmes effets sur la suspension cellulaire de silène (DUBOIS et MORVAN, 1978 ; BRASSART et al., 1982).

A partir des descriptions morphologiques figurant dans la littérature, il est possible d'établir un état signalétique des cellules végétales cultivées en suspension:

- Le diamètre des cellules atteint en moyenne 50  $\mu\text{m}$ .
- Le compartiment vacuolaire occupe 80 à 90% du volume de la cellule.
- Le cytoplasme est généralement réduit à une mince pellicule appliquée contre la paroi dont l'épaisseur est comprise entre 0,5 et 1  $\mu\text{m}$ .
- A partir de ces données, le volume et la surface des cellules sont estimés respectivement à  $6,5 \cdot 10^{-14} \text{ m}^3$  et  $7,5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2$ .

L'intérêt de mener une telle évaluation à l'échelon d'une seule cellule est de pouvoir exploiter les résultats d'analyses biochimiques acquis au niveau de la population. Dès lors, la comparaison entre des cellules très différentes peut fournir des indications inattendues. A titre d'exemple, la vitesse de synthèse des polysaccharides dans les parois des cellules en suspension ou dans celles des bactéries est similaire ( $10^{-15}$  g. $\mu\text{m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ), bien que la vitesse de croissance de ces dernières soit 50 fois supérieure (GUERN 1979). Les suspensions cellulaires ne sont pas toujours homogènes et les cellules peuvent présenter des tailles et des formes variées, notamment chez le haricot (NICHELL, 1956) et la carotte (STEWART et al., 1958). Chez le silène, elles sont ovoïdes et leurs diamètres sont compris entre 35 et 100  $\mu\text{m}$  ou atteignent occasionnellement 300  $\mu\text{m}$  dans des cellules géantes (DUBOIS 1980).

Les méthodes utilisées pour caractériser la croissance des suspensions cellulaires et sa régulation découlent des stratégies d'étude développées avec les microorganismes. Les grandeurs mesurées telles la masse fraîche (MF), la masse sèche (MS), le nombre de cellules (NC) et/ou l'azote protéique permettent la construction de courbes de croissance. En culture discontinue, il est possible de maintenir, par des ensemencements successifs convenablement espacés, une culture cellulaire en phase exponentielle et de définir sa croissance par son temps de doublement et son taux de croissance spécifique. La validité respective des différentes mesures et des paramètres calculés est présentée et discutée lorsque les suspensions cellulaires sont stabilisées (KING et STREET, 1973 ; ROSE et MARTIN, 1974 ; DUBOIS, 1980). Actuellement, la croissance n'est plus guère étudiée pour elle-même et quelques critères sont généralement sélectionnés en fonction de l'intérêt qu'ils présentent pour les études effectuées.

## II - LE MILIEU DE CULTURE

Le choix des suspensions cellulaire comme matériel d'expérimentation et comme modèle biologique se justifie en raison des possibilités offertes à l'expérimentateur de contrôler et de modifier la composition de leur milieu de culture. Ce système biologique est particulièrement favorable à la définition des exigences nutritionnelles et à la modélisation des propriétés d'échanges.

Le milieu de culture est le témoin de l'excrétion d'un certain nombre de composés organiques, ceux qui ont été considérés dès les premiers travaux sur la suspension cellulaire d'Acer pseudoplatanus L. (STREET, 1966) comme les facteurs de conditionnement du milieu.

MUIR et al. (1958) ont obtenu pour la première fois une prolifération de cellules isolées en établissant un contact par un papier filtre avec un tissu nourricier. Ils ont ensuite systématisé la technique alors que JONES et al. (1960) définissaient la notion de conditionnement en introduisant des cellules isolées dans un milieu où avaient déjà séjourné des colonies tissulaires. Cette initiation du milieu de culture peut être attribuée à la diffusion de substances non spécifiques, à partir des cals nourriciers (BENBADIS, 1965). Dans le même temps, STREET (1966) montre que les cellules cultivées en suspension dans un milieu liquide, y secrètent différentes substances parmi lesquelles des enzymes ; il en résulte une stimulation de la croissance. L'analyse biochimique des milieux conditionnés révèle la présence d'acides aminés ; ceux-ci peuvent être combinés à l'acide gibberellique et permettre la réduction de la concentration de l'inoculum cellulaire (STUART et STREET, 1969 et 1971).

L'importance de la densité de l'ensemencement, entrevue par BLACKELY et STEWARD (1964) s'est trouvée confirmée par les travaux de KAO et MICHAYLUK (1975) qui ont réussi à réduire progressivement le rapport volume cellulaire/ volume du milieu jusqu'à la limite de 25 à 50 cellules par ml. Par la suite GLEBA (1978) est parvenu à faire se développer un seul protoplaste dans 1 ml de milieu nutritif.

Ces notions sont ensuite tombées dans l'oubli après s'être enlisées dans la recherche de molécules analogues aux facteurs de croissance ou dans la mise en évidence d'effets s'y apparentant. Comme les difficultés méthodologiques étaient résolues, notamment par l'utilisation d'extraits naturels (lait de coco, hydrolysate de caseine, jus de fruit...), l'idée même de conditionnement a progressivement disparu comme sujet d'étude.

Les besoins en éléments minéraux et l'importance du pH ont été précisés. En général, le pH initial des milieux de culture est ajusté entre 5 et 6. Au cours de la culture, il évolue, notamment en fonction de la nature de la source azotée : il augmente lorsque les ions nitrates sont rapidement absorbés (VELIKY et ROSE, 1973 ; MORVAN, 1974) et diminue en présence d'azote ammoniacal (MARTIN et al., 1977 ; BRASSART et al., 1978). Ces

variations de pH sont dues à l'absorption préférentielle de certains ions et au faible pouvoir tampon des solutions. De plus, elles influencent la croissance des cellules (MARTIN et ROSE, 1976 ; DUBOIS, 1980). La composition en éléments minéraux des formules nutritives proposées pour la culture des suspensions cellulaires s'est progressivement enrichie en nitrate, potassium et phosphate (HELLER, 1953 ; MURASHIGE et SKOOG, 1962 ; LESCURE, 1966 ; GAMBORG et al., 1968 ; GAMBORG, 1970 ; SCHENK et HILDEBRANDT, 1972 ; KATO A. et al., 1977) interviennent dans différents secteurs du métabolisme tels que la régulation osmotique pour le potassium et les activités enzymatiques pour le phosphore (UEKI et SATO, 1971). Bien qu'ils ne soient pas pris en compte dans ce travail, les microéléments peuvent jouer un rôle important dans la croissance (NEUMANN et STEWARD, 1968 ; OHIRA et al., 1975).

Le calcium intervient comme agent structurant des parois et des membranes cellulaires et comme messenger intracellulaire (MARME, 1982 et 1984). Selon ce dernier concept, le calcium influe sur l'action des phytohormones (LEOPOLD, 1977) en traduisant les signaux extracytoplasmiques dans un langage assimilable par la cellule. Il jouerait le rôle de clé métabolique, les phytohormones apparaissant comme des effecteurs périphériques (KELLY, 1984).

Dans la paroi le calcium établit des liaisons particulières avec les acides pectiques et stabilise la matrice pariétale grâce à des ponts inter- et intra-chaines (GRANT et al., 1973 ; WUYTACK et GILLET, 1978 ; SENTENAC et GRIGNON, 1981 ; DEMARTY et al., 1984). Le calcium est donc directement impliqué dans le processus de l'expansion cellulaire soit au travers de ses liaisons ioniques (BENNET et CLARK, 1956 ; CLELAND et RAYLE, 1977 ; THOMAS et al., 1984), soit en intervenant dans la régulation des activités enzymatiques (CRASNIER et al., 1980) et en particulier des glucanases pariétales (MASUDA ET SATOMURA, 1970 ; GOLDBERG, 1977 ; GOLDBERG et PRAT 1982).

L'ensemble des effets du calcium sur l'expansion cellulaire est pris en compte dans le cadre de la théorie de la croissance acide (FISHER et ALBERSHEIM, 1974 ; COHEN et NADLER, 1976 ; BATES et RAY, 1981 ; CLELAND, 1983 ; TAIZ, 1984). L'auxine favorise l'émission de protons à travers le plasmalemma. Dans la paroi, il en résulte un abaissement local du pH dont dépend le fonctionnement des enzymes qui hydrolysent les

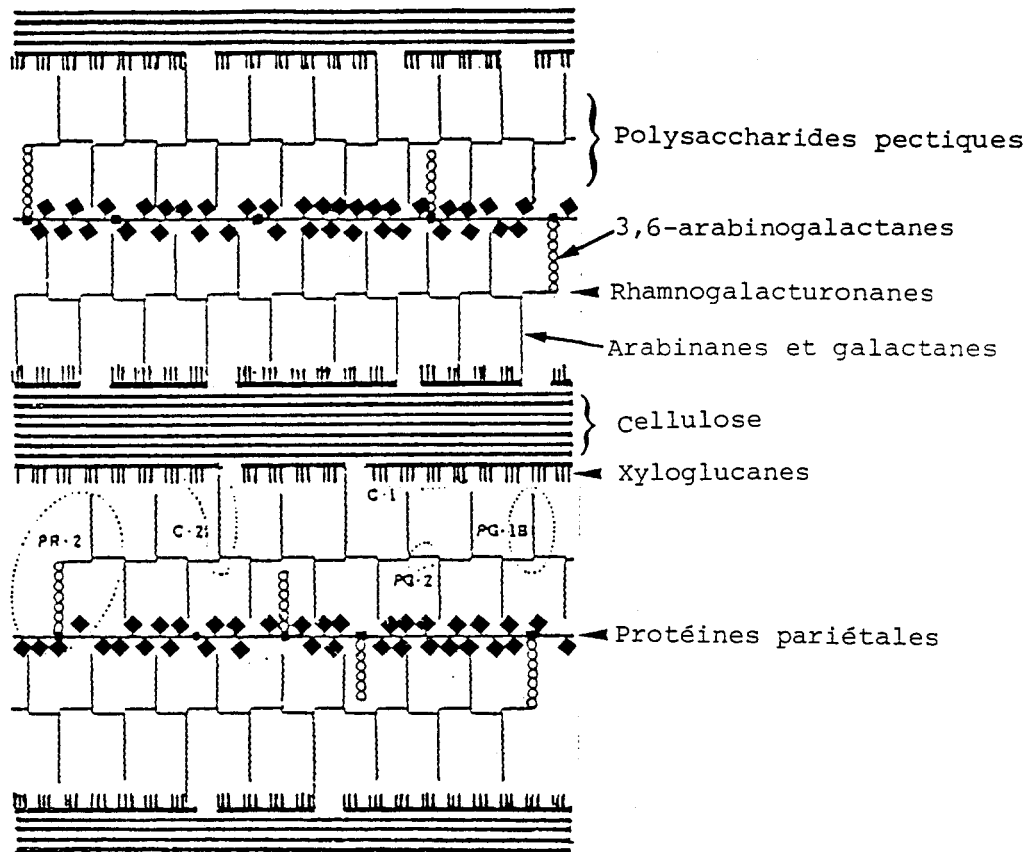
polysaccharides matriciels. Cette théorie repose en partie sur l'action stimulante de la fusicoccine sur la pompe à protons de la membrane plasmique (HANSON et TREWAVAS, 1982 ; KUTSCHERA et SCHOPFER, 1985). Elle est néanmoins controversée en raison du caractère exclusif de l'effecteur fongique (BRUMMER et PARISH, 1983 ; BRUMMER et al., 1984) et parce que l'acidification peut avoir des conséquences inverses selon les enzymes qui sont effectivement présentes dans la paroi. Quoi qu'il en soit, le calcium intervient dans la régulation de la croissance cellulaire selon la concentration à laquelle il est introduit dans les milieux de culture (OHIRA et al., 1973 ; KATO A. et al., 1977 ; MORRIS et NORTHCOTE, 1977). Enfin, le calcium est considéré comme un des éléments minéraux intervenant sur l'excrétion de composés pariétaux dans les milieux de culture (MORRIS et NORTHCOTE, 1977 ; SMITH et al., 1984).

### III - LES PAROIS VEGETALES

A la périphérie des cellules, la paroi est le lieu de passage obligatoire pour toutes les substances nécessaires à leur métabolisme. Dans les suspensions cellulaires, les parois sont essentiellement primaires, comme l'indiquent les études ultrastructurales (NOUGAREDE et al., 1968-a et -b ; BAKER et al., 1980).

Selon MC. NEIL et al., 1984 la composition des parois doit être variée, au moins quantitativement, étant donné la multitude des formes et des dimensions des organismes végétaux. Bien qu'il existe une diversité dans la structure fine des polymères pariétaux isolés de différentes sources, la paroi primaire des plantes supérieures contient les mêmes familles de polysaccharides, qui représentent jusqu'à 90% de la masse sèche de la paroi. Des protéines constituent le complément.

Le squelette des parois primaires est constituée de fibrilles cellulosiques enrobées par une matrice amorphe de polysaccharides pectiques et hémicellulosiques, associés à des glycoprotéines. L'agencement de ces composés est décrit par le schéma de structure proposé par KEEGSTRA et al. (1973), pour la paroi primaire des cellules d'érable (figure page suivante). Ce modèle constitue la référence de base pour les études qui sont consacrées à l'élucidation de la composition chimique et de la structure des constituants pariétaux. Les résultats publiés dans la littérature ont été réunis et discutés récemment par Mc NEIL et al. (1984). Ils sont récapitulés dans le tableau, page 12.



Modèle de la structure pariétale des cellules d'érable,  
d'après KEEGSTRA et al. (1973)

La cellulose représente entre 10 et 25% de la paroi (KEEGSTRA et al., 1973). Elle est constituée d'un enchainement linéaire de résidus  $\beta$ -4-D-glucopyranosyls. Les différentes chaînes sont liées latéralement entre elles par des liaisons hydrogène pour former les microfibrilles. Des études ultrastructurales ont permis aux auteurs de décrire en détail l'agencement des microfibrilles, en strates apposées les unes sur les autres. Les sites de polymérisation ont été localisés sur la membrane plasmique. Un certain nombre de théories contradictoires tentent d'expliquer la mise en place et les restructurations du squelette pariétal au cours de l'élongation (WILSON, 1964 ; ROELOFSON, 1965 ; FREY-WISSLING, 1969 ; PRESTON, 1974 ; ALBERSHEIM et al., 1976 ; ROLAND et VIAN, 1979).

La matrice de la paroi est constituée d'au moins huit familles de polysaccharides, qui sont regroupés en deux catégories principales : les pectines et les hémicelluloses. Les premières sont distinguées par leur caractère acide, leur affinité pour le calcium, leurs propriétés gélifiantes et par l'extraordinaire complexité de certains de leurs constituants. Les secondes doivent leur appellation au fait qu'elles comprennent des glucanes non cellulosiques. Elles sont riches en monosaccharides neutres, notamment le xylose mais recèlent également des radicaux d'acide glucuronique.

Les hémicelluloses sont essentiellement composées de deux familles de macromolécules. Les xyloglucanes sont abondants chez les dicotylédones (20 à 30%) et les xylanes (glucuronoarabinoxylanes) sont principalement présents chez les monocotylédones (20 à 40 %). La structure de ces dernières est connue grâce aux travaux d'ASPINALL et GREENWOOD (1962), WHISTLER et RICHARDS (1970), Mc NEIL et al. (1975), WILKIE (1979) et DARVILL et al. (1980-a). Les xyloglucanes dont la présence a été rapportée dans les parois des cellules en suspension (Mc NEIL et al., 1979;

HAYASHY et al., 1980 ; JOSELEAU et CHAMBAT 1984-a) sont formés d'un squelette  $\beta$ -4-D glucopyranosyls portant de nombreuses et petites ramifications de  $\alpha$ -xylopyranosyls sur le C<sub>6</sub> des radicaux glucopyranosyls (BAUER et al., 1973). Il existe en outre des résidus  $\beta$  2-D-galactopyranosyls et  $\alpha$  -2-L-fucopyranosyls (WILDER et ALBERSHEIM, 1973 ; SHIBUYA et MISAKI, 1978 ; TAKEUCHI et KOMAMINE, 1978 ; KATO et MATSUDA, 1980-a et -b) et occasionnellement du L-arabinofuranosyl (EDA et KATO, 1978 ; JOSELEAU et CHAMBAT, 1984-a).

La propriété essentielle des hémicelluloses est leur capacité à établir de puissantes liaisons hydrogènes inter-moléculaires avec la cellulose ou entre elles (PRESTON, 1979). De plus les xyloglucanes sont liées par covalence aux polysaccharides pectiques par l'intermédiaire de ponts glycosidiques (BAUER et al., 1973). Cette situation particulière, à la jonction entre les pectines et les fibrilles de cellulose, leur confère un rôle important dans les processus intervenant dans la matrice pariétale pendant l'élongation (ALBERSHEIM, 1974-a et -b ; Mc NEIL et al., 1979).

Les polysaccharides pectiques sont probablement les polymères matriciels les plus abondants dans la paroi primaire de la plupart des phanérogames (JARVIS, 1984). Leur structure et leurs propriétés ont fait

Principaux polymères de la paroi primaire.

D : Dicotylédones

M : Monocotylédones

Glc : glucopyranosyl      Manp : mannopyranosyl      Xylp : xylopyranosyl  
 Galp : galactopyranosyl      Fucp : fucopyranosyl      Araf : arabinofuranosyl  
 Rhap : rhamnopyranosyl      Arap : arabinopyranosyl      Apif : apiofuranosyl  
 Hyp : hydroxyproline      Ser : sérine      Gly : glycine  
 GlcpAU : acide glucuronique      Val : valine  
 GalpAU : acide galacturonique      Tyr : tyrosine  
 Ace : acide acétique  
 KDO : acide 3-deoxy-manno-octulosonique

POLYMERES (% paroi)	PRINCIPAUX MONOMERES	LIAISONS & SEQUENCES	REMARQUES
<u>CELLULOSE</u> (20-30)	$\beta$ -Glc ( $\beta$ -Manp )	$\text{---}^4\text{Glc}^1\text{---}^4\text{Glc}^1\text{---}^4\text{Glc}^1\text{---}$	(non greffé)
<u>HEMICELLULOSES</u>			
Xyloglucanes (D : 20-30) (M : 1-5)	$\beta$ -Glc $\alpha$ -Xylp $\beta$ -Galp $\alpha$ -Fucp (Araf)	$\text{---}^4\text{Glc}^1\text{---}^4\text{Glc}^1\text{---}^4\text{Glc}^1\text{---}(\text{Glc})^1_n\text{---}$ $\begin{array}{c}   \\ \text{Xyl}^1 \\   \\ \text{Xyl}^1 \\   \\ \text{Xyl}^1 \\   \\ \text{Fuc}^1\text{---}^2\text{Gal}^1 \end{array}$	
Xylanes (D : 5 ) (M : 20-40)	$\beta$ -Xylp $\alpha$ -Araf $\alpha$ -GlcAU (4-O-Me-GlcAU)	$\text{---}^4\text{Xyl}^1\text{---}^4\text{Xyl}^1\text{---}^4\text{Xyl}^1\text{---}$	chaines latérales courtes + acétyls + féruloyls
Callose	$\beta$ -Glc	$\text{---}^3\text{Glc}^1\text{---}^3\text{Glc}^1\text{---}^3\text{Glc}^1\text{---}$	
<u>PECTINES</u>			
Homogalacturonanes (D : 10 ) (M : $\pm$ )	$\alpha$ -GalpAU $\alpha$ -Rhap	$\text{---}^4(\text{GalAU})^1_n\text{---}^2\text{Rha}^1\text{---}$	(n = 25) non greffé GalAU Me-estérifié
Rhamnogalacturonane I (D : 10-20) (M : $\pm$ )	$\alpha$ -GalpAU $\alpha$ -Rhap $\beta$ -Galp $\alpha$ -Araf (Xyl)	$\text{---}^4(\text{GalAU}^1\text{---}^2\text{Rha})^1\text{---}$	Gal et Ara greffés sur Rha GalAU + Me-estérifié féruloyls sur Gal et Ara
Rhamnogalacturonane II (D : 2-5) (M : $\pm$ )	$\alpha$ -GalpAU $\beta$ -Rhap $\alpha$ -Galp $\alpha$ -Fucp $\alpha$ -Araf $\beta$ -Galp $\alpha$ -Araf $\beta$ -GlcAU $\alpha$ -Apif Ace      KDO	$\text{---}^1\text{Rha}^1\text{---}^2\text{Ara}^1\text{---}^4\text{Gal}^1\text{---}^2\text{Ace}^1\text{---}^3\text{Rha}^1\text{---}^3\text{Api}^1\text{---}$ $\begin{array}{c}   \\ \text{Me-Fuc}^1 \\   \\ \text{GalAU} \end{array}$ $\text{---}^1\text{Gal}^1\text{---}^2\text{GlcAU}^1\text{---}^4\text{Fuc}^1\text{---}^4\text{Rha}^1\text{---}^3\text{Api}^1\text{---}$ $\begin{array}{c}   \\ \text{GalAU} \end{array}$	
<u>GLYCOPROTEINES</u>			
Arabinogalactane-protéines	$\beta$ -Galp      Araf $\alpha$ -Araf      GalpAU $\alpha$ -GlcAU Hyp, Ser, Gly	Gal $\begin{array}{c}   \\ \text{Ara} \\   \\ \text{Ara} \\   \\ \text{Ara} \\   \\ \text{Ara} \\   \\ \text{Ara} \\   \\ \text{Ara} \end{array}$	
Extensine (D : 1-10) (M : < 2 )	$\beta$ -Araf $\alpha$ -Araf $\alpha$ -Galp Hyp, Ser, Lys, Val, Tyr	$\text{---}^1\text{Ser}^1\text{---}^1\text{Hyp}^1\text{---}^1\text{Hyp}^1\text{---}^1\text{Hyp}^1\text{---}^1\text{Hyp}^1\text{---}^1\text{Ser}^1\text{---}^1\text{Hyp}^1\text{---}^1\text{Lys}^1\text{---}$ $\begin{array}{c}   \\ \text{Ara} \\   \\ \text{Ara} \\   \\ \text{Ara} \end{array}$ $\begin{array}{c}   \\ \text{Gal} \\   \\ \text{Ara} \end{array}$	



l'objet de révisions régulières (NORTHCOTE, 1972 ; ASPINALL, 1980 ; DARVILL et al., 1980-b ; PILNIK, 1981 ; SELVENDRAN, 1983 et 1985). Ils ont comme point commun de contenir des radicaux  $\alpha$ -4-D galacturonopyranosyls qui forment des enchainements dans lesquels viennent s'intercaler des résidus  $\alpha$ -2- rhamnopyranosyls. In situ, ils forment des blocs qui sont répartis d'une manière plus ou moins homogène le long des chaines pectiques. Les techniques d'hydrolyses enzymatiques et chimiques, utilisées ensemble ou séparément, permettent de séparer ces différentes séquences (TALMADGE et al., 1973 ; KNEE et al., 1975 ; JARVIS et al., 1981-a ; DE VRIES et al., 1982 ; ISHII, 1982 ; THIBAUT, 1983). Trois classes sont distinguées en fonction de la nature et de la disposition des radicaux neutres qui y sont associés.

Les homogalacturonanes sont des polymères presque uniquement composés d'acide D-galacturonique. Ils sont difficiles à isoler car très peu solubles. Des hydrolyses partielles de la paroi des cellules cultivées en suspension donnent des fragments comprenant plus de 15 radicaux chez l'érable (NOTHNAGEL et al., 1983) et plus de 100 chez la rose (CHAMBAT et JOSELEAU, 1980). Les homogalacturonanes sont également signalés dans les milieux de culture, avec des proportions d'acide galacturonique comprises entre 87 % chez le tabac (YAMAOKA et SATO, 1977) et 95 % chez l'érable (NOTHNAGEL et al., 1983). Des études de conformation, entreprises sur les pectines de citron, aboutissent à définir les homogalacturonanes, comme des segments, non branchés, de 25 unités d'acide galacturonique, entrecoupés par un seul rhamnose et disposés en anneau (POWELL et al., 1982). La propriété essentielle attribuée à ces composés est de former des gels rigides en présence de calcium, ce qui permet de supposer qu'ils jouent un rôle important dans la stabilité de la matrice pariétale (REES, 1977).

Le rhamnogalcturonane I (RG I) a été défini grâce aux travaux effectués sur la suspension cellulaire d'érable (TALMADGE et al., 1973 ; Mc NEIL et al., 1980). Il comporte une chaîne principale formée de  $\alpha$ -4-D galacturonopyranosyls et de  $\alpha$ -2-L rhamnopyranosyls répartis alternativement (Mc NEIL et al., 1980 ; LAU et al., 1983). Des radicaux  $\beta$ -4-D galactopyranosyls et  $\alpha$ -5-L arabinofuranosyls forment des chaines latérales plus ou moins longues, attachées sur le rhamnose (Mc NEIL et al., 1982). Plus rarement, des résidus de xylose, de fucose ou d'apiose sont signalés. Cette structure détaillée est en accord avec celles qui avaient

été proposées dans des travaux antérieurs (ASPINALL et al., 1968 KNEE et al., 1975 ; SIDDIQUI et WOOD, 1976). Elle est confirmée par les résultats obtenus ensuite sur d'autres végétaux (SHIBUYA et IWASAKI, 1978 ; EDA et KATO, 1980 ; ISHII, 1981 et 1982 ; JARVIS, 1981-b). Toutefois, la longueur des chaînes latérales de galactanes peu varier selon l'origine des pectines (JARVIS et al., 1981-a ; BRILLOUET et CARRE, 1983 ; THIBAUT, 1983). Les fragments de RG I sont plus ou moins estérifiés par des groupements méthyles ou acétyls (PILNIK, 1981 ; SOUTY et al., 1981), probablement parce que les zones où se greffent les chaînes latérales sont moins accessibles à l'action des méthyl-estérases (JARVIS, 1984).

Le troisième composant pectique est le rhamnogalacturonan II (RG II) (DARVILL et al., 1978). C'est un polysaccharide très complexe, constitué de dix monosaccharides différents dont certains rarement observés: apiose, 2-O-méthyl-xylose, 2-O-méthyl-fucose (DARVILL et al., 1978), l'acide acérique (SPELLMAN et al., 1983) et l'acide 3-déoxy-manno-octulosonique (KDO) (YORK et al., 1984-b). De taille homogène le RG II contient une soixantaine de résidus glycosidiques par molécule (DARVILL et al., 1978). Des méthodes d'hydrolyses sélectives permettent d'aboutir à la détermination de la structure caractéristique qui est un heptasaccharide. Bien que très original, le RG II ne représente que 2 à 5 % de la matrice des parois dans lesquelles il a été identifié.

Outre les constituants majeurs, la matrice pariétale des mono- et dicotylédones contient également des arabinanes (Mc NEIL et al., 1979 ; STEVENS et SELVENDRAN, 1980), des galactanes (EDA et KATO, 1978) et des arabinogalactanes (CLARKE et al., 1979). Ils constituent des ponts entre les hémicelluloses et les composés pectiques. Ils portent parfois des esters phénoliques tels que le férulate et le p-coumarate (FRY, 1979 et 1983).

Les arabinogalactanes sont souvent liées à des protéines riches en hydroxyproline (FINCHER et al., 1983 ; KARACSONYI et al., 1984). L'ensemble forme une glycoprotéine acide où la partie protéique est minoritaire (2 à 10 %). Comme elles sont aisément solubilisables, ces glycoprotéines appartiennent aux composés extracellulaires qui sont présents dans les espaces intercellulaires ou dans les milieux de culture des suspensions cellulaires.

La glycoprotéine principale des parois est celle que LAMPORT (1965) a qualifié d'extensine. La partie protéique représente 2 à 10 % de la paroi et comprend jusqu'à 30 % d'hydroxyproline. La protéine et le glycane sont en proportion équivalente et l'ensemble est fortement basique. L'extensine est impliquée dans les phénomènes de croissance (LAMPORT, 1970) et de reconnaissance inter-cellulaire (ESQUERRE-TUGAYE et MAZAU, 1981). Elle est reliée aux pectines par l'intermédiaire des arabinogalactanes (POPE et LAMPORT, 1974 et est fortement associée aux microfibrilles de cellulose (BLASCHEK et al., 1981). De plus, l'extensine devient insoluble dans de nombreux solvants d'extraction lorsqu'elle porte de la tyrosine (jusqu'à 10 %). En effet, ces radicaux s'associent par couplage oxydatif et forment des ponts isodityrosine qui sont impliqués dans les relations avec les microfibrilles de cellulose (FRY, 1982-b et 1984 ; EPSTEIN et LAMPORT, 1984).

Les galactomannanes sont une autre catégorie de polysaccharides pariétaux qui sont présents dans les graines (DEA et MORRISON, 1975) et dans la paroi des gymnospermes (TIMELL, 1961). Ils constituent des gélifiants tels que le guar et la gomme de caroube (Mc CLEARLY et al., 1981).

La présence de composés d'origine pariétale a été signalée dans le milieu de culture des suspensions cellulaires de Tabac (DE JONG et al., 1968 ; OLSON et al., 1969) et d'Erable (BECKER et al., 1964 ; ASPINALL et al., 1969 ; SIMPKINS et STREET, 1970). Il s'agissait principalement de composés pectiques et de protéines dont certaines étaient dotées d'activités enzymatiques. Parmi celles-ci, l' $\alpha$ -amylase (JASPERS et VELDSTRA, 1965), la phosphatase acide (UEKI et SATO, 1971 ; PARISH, 1975-b ; YAMAYA et al., 1982), l'AIA-oxydase (GAMBORG et EVELEIGH, 1968), les peroxydases (OLSON et al., 1969 ; PARISH, 1975-a ; LEGRAND et DUBOIS, 1977), les xylanases (KOYAMA et al., 1983), les pectinases (KONNO et al., 1983), les cellulases et les polygalacturonases (JOSELEAU et CHAMBAT, 1981). L'étude des polysaccharides excrétés dans le milieu a été poursuivie sur le plan biochimique, car les auteurs ont d'abord considéré qu'ils représentaient des copies de la paroi, aisément accessibles.

#### IV - COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES POLYSACCHARIDES EXTRACELLULAIRES

Les suspensions cellulaires ont été largement utilisées comme source de matériel pariétal primaire (BURKE et al, 1974 ; YAMAOKA et SATO, 1977 ; HAYASHI et al, 1980 ; CHAMBAT et al, 1981). Le fait qu'elles secrètent dans leur milieu de culture des polysaccharides qui sont analogues à ceux trouvés dans la paroi accentue leur intérêt (BAUER et al, 1973). Il est donc très facile d'obtenir de grandes quantités de polysaccharides extracellulaires sans nécessairement passer par une extraction chimique ou enzymatique.

Des études structurales ont permis d'isoler et de caractériser trois familles de molécules dans le milieu de culture des suspensions cellulaires d'Erable (BECKER et al., 1964 ; ASPINALL et al., 1969 ; BAUER et al., 1973; WILDER et ALBERSHEIM, 1973). Les principaux constituants sont des xyloglucanes (ASPINALL et al., 1969 ; BAUER et al., 1973) analogues à ceux identifiés dans les parois de ces cellules. Les arabinogalactanes qui forment la seconde catégorie de polymères sont également composés d'oses neutres. La troisième présente des propriétés acides. Elle est assimilée à un acide pectique comprenant 67 % d'acide galacturonique dont 30 % sous forme ester-méthylée. La composition des polysaccharides extracellulaires a été étudiée dans d'autres suspensions cellulaires : le tabac (OLSON et al, 1969 ; KATO et NOGUCHI, 1976; AKYAMA et KATO, 1982), la pervenche de Madagascar (TAKEUCHI et KOMAMINE, 1978, 1980-a et -b), le soja (MOORE, 1973 ; HAYASHI et al, 1980 ; KATO et MATSUDA, 1985-a) la rose (WALLNER et NEVINS, 1973 et 1974 ; BARNOUD et al, 1977 ; CHAMBAT et al., 1984 ; MOLLARD et ROBERT, 1984), le haricot (MANTE et BOLL, 1975, 1976 et 1978), la carotte (VERMA et DOUGALL, 1979 ; ASAMIZU et al, 1984), la patate douce (SASAKI et KAINUMA, 1984), et le riz (KATO et MATSUDA, 1985-b).

Les polysaccharides extracellulaires sont en fait un mélange complexe qui peut être fractionné par gel filtration et par chromatographie d'échange ionique. Un traitement préalable par une endo- $\beta$ -1-4-polygalacturonase conduit à l'amélioration de la séparation des polymères. Des analyses détaillées (RMN, spectroscopie de masse ...) permettent d'identifier les constituants les moins fréquents, de préciser la nature des liaisons et la disposition relative des oses les uns par rapport aux autres. Les acides uroniques représentent environ 25% des

polysaccharides, les monosaccharides neutres comprennent principalement le glucose, l'arabinose, le galactose et le xylose en proportions variables et une fraction proteique riche en hydroxyproline. Outre les xyloglucanes (BARNOUD et al., 1977 ; ) et les arabinogalactanes (ASPINALL et al., 1969 ; AKIYAMA et KATO, 1981), d'autres polymères ont été identifiés tels que des fucoxyloglucanes (ASPINALL et al., 1969), des glucuronoarabinoxylanes (AKIYAMA et KATO, 1982), des galactomannanes (AKIYAMA et al., 1983), des arabinoglucuronomannanes (KATO K. et al., 1977) similaires à celles qui sont extraites de la paroi par des solutions salines (MORI et KATO, 1981), des homogalacturonanes (YAMAOKA et SATO, 1977), des rhamnogalacturonanes II et éventuellement le rhamnogalacturonane I. La découverte de ces polysaccharides dans les milieux de culture, atteste que la fraction extracellulaire est un excellent témoin des polymères non celluloses de la paroi.

L'extensine, glycoprotéine de la paroi primaire, n'a pas été signalée dans la fraction extracellulaire, bien que des arabinogalactane-proteines, riches en hydroxyproline, y soient présentes (KEEGSTRA et al., 1973 ; HORI et SATO, 1977 ; POPE, 1977). En outre, une glycoprotéine qui contient les radicaux hydroxyproline-tri et tétra-arabinosyls caractéristiques de l'extensine a été isolée à partir des polymères sécrétés par la suspension cellulaire de tabac (YAMAOKA et SATO, 1977). Cette glycoprotéine est particulière car elle ne contient que 8% d'oses.

Récemment, des techniques de centrifugation ont permis de collecter des polysaccharides des espaces libres de tissus (TERRY et JONES, 1981 et TERRY et al, 1981) dont la composition est identique à celles des polysaccharides extracellulaires. Les mucilages d'origine racinaire sont également des polysaccharides extracellulaires qui sont libérés dans le sol ou dans les solutions nutritives lorsque les végétaux sont cultivés in vitro (HALL et al, 1966 ; MORRE et al, 1967 ; MIKI et al, 1980 ; CHABOUD et ROUGIER, 1981). Ce sont des macromolécules de haut poids moléculaire (HARRIS et NORTHCOTE, 1970 ; JONES et MORRE, 1973) comprenant une fraction proteique (LEPPART, 1974 ; WRIGHT et NORTHCOTE, 1974 et 1975). Ces sécrétions se produisent lors de l'exfoliation des cellules de la coiffe racinaire (ROUGIER, 1981) et leur composition est comparable à celle des parois primaires des cellules en suspension (CHABOUD, 1983).

La quantité et la composition des polysaccharides extracellulaires changent considérablement avec l'âge de la culture. Comme le mentionne OLSON (1971), les protéines et l'acide galacturonique représentent respectivement 1 et 4% du poids sec de la sécrétion pour une culture d'un jour et passe à 14 et 24% au quinzième jour de culture. Dans le même temps la quantité de glucose décroît de 40 à 10% pendant 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. Par ailleurs TAKEUCHI et KOMAMINE (1978) observent que l'augmentation des acides uroniques s'accompagne d'une variation dans le même sens de l'arabinose et du galactose et d'une diminution du glucose et du xylose. Selon ces auteurs (1980-a), la libération de composés pectiques dans le milieu de culture est plus active pendant la phase de division que pendant la phase de croissance exponentielle.

MOORE (1973) établit que la quantité et la nature des polysaccharides extracellulaires dépendent de la composition du milieu de culture et en particulier des régulateurs de croissance employés. FRY (1980), FRY et STREET (1980), MORVAN (1982), SASAKI et KAINUMA (1984) signalent l'action stimulante de l'acide gibbérellique sur la sécrétion de polymères pectiques acides par les suspensions cellulaires d'érable, de silène et de patate douce. MANTE et BOLL (1978) montrent que l'addition de 2,4-D dans le milieu de culture d'une suspension cellulaire de haricot augmente la sécrétion de composés pectiques et de polysaccharides neutres. Au contraire, MASUDA et al. (1984) notent que l'absence de 2,4-D favorise l'élongation des cellules de carotte et qu'il en résulte une augmentation de l'excrétion d'acides uroniques et d'arabinogalactanes. Par ailleurs, TERRY et al. (1981) mettent en évidence que la stimulation de la croissance des tiges de pois par l'auxine s'accompagne d'une augmentation d'acides uroniques, de xylose et de glucose dans les espaces intercellulaires. L'action de l'auxine sur l'extensibilité des parois et les changements biochimiques qu'elle provoque a fait l'objet de nombreux travaux. Parmi les hypothèses et/ou les interprétations proposées, certaines mettent directement en cause les composés pariétaux. Selon LABAVITCH et RAY (1974), l'élongation résulte d'une rupture des liaisons hydrogènes entre la cellulose et les xyloglucanes provoquant la libération de ces derniers à l'extérieur des cellules.

Ainsi, la présence de polymères extracellulaires dans le milieu de culture des suspensions, dans les espaces intercellulaires des tissus et au voisinage des racines est le résultat du fonctionnement métabolique des parois primaires que traduisent les modifications morphologiques et biochimiques observées.

## V - ROLE PHYSIOLOGIQUE ET PROPRIETES BIOLOGIQUES DES POLYMERES PARIETAUX

Le fait que les fragments pariétaux présentent des effets régulateurs sur les tissus végétaux est un domaine d'étude relativement nouveau pour les physiologistes. Quelques dizaines de travaux émanant d'un nombre réduit d'équipes de recherche montrent l'intervention de tels composés (ALBERSHEIM et al, 1984). Ces oligosaccharides sont impliqués dans les mécanismes de résistance aux infections et dans la régulation du développement des organes reproducteurs.

Lors de l'infection des plantes par des champignons ou des bactéries pathogènes, le mécanisme de défense des cellules infectées se traduit par la synthèse de substances antibiotiques, les phytoalexines. Les messages chimiques, portés par les oligosaccharides, modifient le métabolisme des cellules réceptrices en agissant sur les ARNm et les enzymes responsables de la synthèse des phytoalexines. Néanmoins le mécanisme n'est pas encore élucidé (BAILEY, 1982). Deux classes d'oligosaccharines sont actuellement connues, les oligoglucosides présents dans la paroi de l'agent infectieux, d'une part (AYERS et al 1976-a et -b; DARVILL et ALBERSHEIM, 1985) et les fragments d'homogalacturonanes provenant de la paroi même des végétaux infectés, d'autre part. Ces derniers, généralement libérés sous l'action d'une enzyme sécrétée par l'agent infectieux, peuvent être également produits suite à une blessure. Dans ce cas, la cellule synthétise elle même l'enzyme qui hydrolyse sa paroi et libère l'oligosaccharide. Par des méthodes de fractionnement enzymatiques et chimiques, les auteurs montrent que les fragments actifs sont des heptagluco-sides (SHARP et al., 1983), des dodécagalacturonanes (HAHN et al., 1981) ou un décacaccharide terminé par un acide galacturonique insaturé (DAVIS et al., 1982). Ces différents composés sont séparés par des enzymes (endogalacturonase ou endopolygalacturonate-lyase) excrétés par les champignons (LEE et WEST, 1981-a et -b ; BRUCE et WEST, 1982) ou des bactéries (DAVIS et al., 1984).

RYAN (1978) montre que les blessures mécaniques initient la synthèse de protéines (FIIP) capables d'inhiber l'action des protéases d'insectes ou de microorganismes. Le principe actif extrait des feuilles de tomate blessées est essentiellement composé de résidus galacturonosyls (BISHOP et al., 1981). Des fragments de polymères pectiques (rhamnogalacturonane I), également efficaces contre les invasions microbiennes, agissent selon le même processus (RYAN et al., 1981).

Un autre type d'action de protection contre les pathogènes potentiels a été identifié récemment. Des composés pariétaux isolés de suspensions d'érable sont capables de provoquer l'autolyse des cellules (YAMASAKI et al., 1983). Cette autodestruction, apparentée à une hypersensibilisation, est interprétée comme un moyen pour ralentir l'invasion des microorganismes et permettre la mise en oeuvre de stratégies de défense chimique plus efficaces. Cette observation est à rapprocher de l'action létale provoquée par les enzymes pectiques (HISLOP et al., 1979).

Un fragment de xyloglucane obtenu par traitement des polymères excrétés dans le milieu de culture de la suspension cellulaire d'érable inhibe l'effet stimulant du 2,4-D sur la croissance d'épicotyle de pois (YORK et al., 1984-a). C'est un nonasaccharide qui s'avère actif à la concentration très faible de  $10^{-2}$  à  $10^{-1}$  mg/l, c'est à dire 1% de la concentration molaire de 2,4-D nécessaire pour obtenir un effet optimal. Au cours de la stimulation de la croissance des tiges de pois par l'auxine, une enzyme qui découpe les xyloglucanes de la matrice pariétale en oligosaccharides se trouverait activée (ALBERSHEIM et DARVILL, 1985). Ainsi les oligosaccharides, libérés par l'action de l'enzyme stimulée par le 2,4-D, inhibent la croissance qu'il favorise. Il s'agit d'un mécanisme de modulation de cette activité hormonale..

Les oligosaccharides interviennent dans la régulation de la morphogénèse comme le démontrent les travaux de GOLLIN et al. (1984) sur la floraison d'une lentille d'eau (Lemna Gibba G3). Ces composés, isolés par hydrolyse partielle des parois de cellules d'érable, inhibent la floraison et stimulent la multiplication des frondes. Ces résultats sont confirmés par ceux obtenus, avec les mêmes extraits, par TRAN THANH VAN et al. (1985) sur l'induction florale de couches minces cellulaires de tabac. En présence d'autres mélanges d'oligosaccharides, les couches minces, induites par une combinaison appropriée de phytohormones à former des



bourgeons végétatifs, ont évolué vers des bourgeons floraux ou des racines.

Par leur aptitude à agir sur la morphogénèse des organes de reproduction, les fragments pariétaux peuvent donc être considérés comme de véritables régulateurs de croissance.

L'ensemble des résultats montre que ce sont essentiellement des petits fragments pariétaux qui sont actifs. MORVAN (1982) constate que les polymères pectiques acides (PPA) excrétés par la suspension cellulaire de silène stimulent sa croissance lorsqu'ils sont réintroduits dans un milieu de culture neuf. Les PPA des suspensions cellulaires de tabac ont également une action stimulante alors que ceux excrétés par les suspensions cellulaires de ronce et d'érable inhibent sévèrement la croissance des cellules qui les produisent (MORVAN, 1981; MARIE-ALSABEK et al., 1984).

Les propriétés remarquables des composés d'origine pariétale ont été principalement étudiées sur des oligosaccharides extraits des parois par hydrolyses enzymatiques ou chimiques. Les polysaccharides excrétés dans les milieux de culture par les suspensions cellulaires présentent également des effets biologiques qui justifient l'intérêt croissant dont ils sont crédités actuellement.

La revue des données bibliographiques concernant les polymères d'origine pariétale rejetés dans les milieux de culture par les cellules en suspension permet de constater que les données accumulées par les auteurs sont à la fois très riches et très inégales. Il ne fait aucun doute que le comportement physiologique des suspensions cellulaires est connu dans les grandes lignes. Toutefois, un certain nombre de problèmes, comme celui du pH des milieux de culture, n'ont pas été résolus. L'évolution du pH, sous la dépendance de l'absorption différentielle des ions, a été maintes fois constatée mais peu de travaux ont tenté de mesurer les conséquences de ces variations sur les cellules qui les provoquent ou les subissent. En général, les relations entre les cellules et leur milieu de culture ne sont abordées que pour affiner les formules nutritives dans le but d'améliorer les performances de croissance ou de production de métabolites. Les mêmes motivations peuvent être constatées en ce qui concerne l'excrétion de substances organiques dans les milieux de culture. C'est la raison pour laquelle la présence de polysaccharides d'origine pariétale n'est généralement signalée qu'à titre anecdotique. Quelques

groupes de chercheurs, essentiellement des chimistes, s'étant avisés de la parenté entre ces polysaccharides et ceux qu'ils extraient de la matrice pariétale, les ont utilisés pour en étudier la structure, de manière approfondie. Plus de vingt ans ont été nécessaires avant de parvenir au double constat suivant : qu'ils soient homogènes ou hétérogènes dans leur composition en monosaccharides, les oligosaccharides qui constituent les structures élémentaires des polymères pariétaux sont des molécules spécifiques ; leur particularité structurale est une des clés des relations intercellulaires et probablement la raison des propriétés inductrices qui leur ont été attribuées récemment.

Les expérimentations entreprises dans ce travail ne se situent pas dans le même courant de pensée. Dès l'origine, est affichée la volonté d'identifier des polysaccharides acides, en raison de leur capacité à intervenir dans les échanges ioniques entre le milieu de culture et les cellules. De la même manière, figure initialement le souci de relier l'excrétion de ces composés à la croissance cellulaire parce qu'il convient de vérifier leur origine et les causes de leur émission. Les effets qu'ils provoquent sur la croissance lorsqu'ils sont réintroduits dans les milieux de culture neufs, ont été principalement considérés comme moyen supplémentaire pour comprendre les conséquences de leur présence dans les milieux de culture. Pour toutes ces raisons, la paroi constitue la référence permanente, parce les polysaccharides étudiés dépendent qualitativement et quantitativement de son métabolisme pendant l'élongation cellulaire. Ces orientations ont nécessité une investigation longue et minutieuse du comportement de croissance du modèle biologique choisi. L'étude biochimique et physico-chimique a été conduite simultanément sur les polysaccharides extracellulaires et sur ceux qui ont été extraits de la matrice pariétale. Enfin, les propriétés biologiques ne sont présentées qu'en perspective du développement ultérieur du travail.

## LES PARAMETRES CULTURAUX DE LA SUSPENSION CELLULAIRE DE SILENE .

Il est nécessaire en premier lieu de définir précisément la suspension cellulaire, en tant que modèle biologique et le milieu de culture dans lequel elle croît.

### I. LA SUSPENSION CELLULAIRE DE SILENE , UN MODELE BIOLOGIQUE.

#### 1 - CROISSANCE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE.

La croissance des suspensions cellulaires est un sujet d'étude classique qui comprend à la fois des travaux théoriques (choix des critères, définition d'index, modélisation...) et appliqués (production de métabolites...). Le cas de celle de silène a été initialement présenté et discuté par DUBOIS (1980).

Pour relier le comportement de la suspension cellulaire, en terme de croissance, aux événements intervenant simultanément dans le milieu, il est nécessaire de disposer d'un procédé de culture bien défini. L'étude de la croissance à travers les variations de quelques paramètres de biomasse aisément accessibles constitue la première étape. Elle permet de sélectionner quelques critères en vue de la remise en cause ultérieure de la plupart des méthodes culturales (ensemencement, agitation, récipients de culture...). Les conditions de température et d'éclairement qui ont été étudiées préalablement (DUBOIS et MORVAN, 1978) et la composition du milieu de culture qui sera définie par la suite, sont fixées pour limiter l'interférence de trop nombreux facteurs.

#### A. Evaluation de la biomasse:

Pour mesurer la biomasse produite au cours de la culture, différents paramètres peuvent être utilisés: le volume cellulaire total (V.C.T.), la masse fraîche (M.F.), la masse sèche (M.S.) et le nombre de cellules (N.C.) ont été sélectionnés en raison de leur commodité (fiche technique N° 1).

Le V.C.T. est mesuré après décantation pendant 30 minutes dans une éprouvette graduée. Les cellules sont ensuite séparées du milieu par filtration sur papier sans cendre, puis pesées (M.F.). Une partie (2 g de M.F.) est congelée, lyophilisée et pesée (M.S.). Le dénombrement des cellules (N.C.) s'effectue sur une cellule de Nageotte, après dispersion des amas par l'acide chromique à 10 % pendant 24 h à 4°C et plusieurs passages de la suspension à travers une aiguille (diamètre : 1 mm) montée sur une seringue (MARIE-ALSABEK et al., 1984).

Les résultats présentés sur la figure I-1 ont été obtenus à partir de deux séries expérimentales distinctes. Chaque point correspond à la moyenne de 8 à 12 valeurs indépendantes. L'allure générale des courbes (traits pleins) est semblable. Elles peuvent être décomposées en deux phases :

- la première est une variation exponentielle plus ou moins accentuée qui intervient dès le début de la culture et se poursuit pendant 10 à 12 jours;
- la seconde correspond à une stabilisation (M.F., N.C. et V.C.T.) ou une légère diminution (M.S.) des valeurs mesurées.

Une représentation en coordonnées semi-logarithmiques (traits pointillés) permet de préciser la succession des différentes étapes au cours du temps : dans tous les cas étudiés, la pente de la première section de droite (phase exponentielle) est pratiquement identique. Les temps de doublement sont compris entre 50 et 55 heures. La durée de cette phase est généralement de 6 jours (10 jours dans le cas du V.C.T.). Il se produit ensuite un ou plusieurs infléchissements de la pente (phase de ralentissement), suivis à l'occasion, d'une dernière section de droite dont la pente négative correspond à une diminution du paramètre considéré (M.S.).

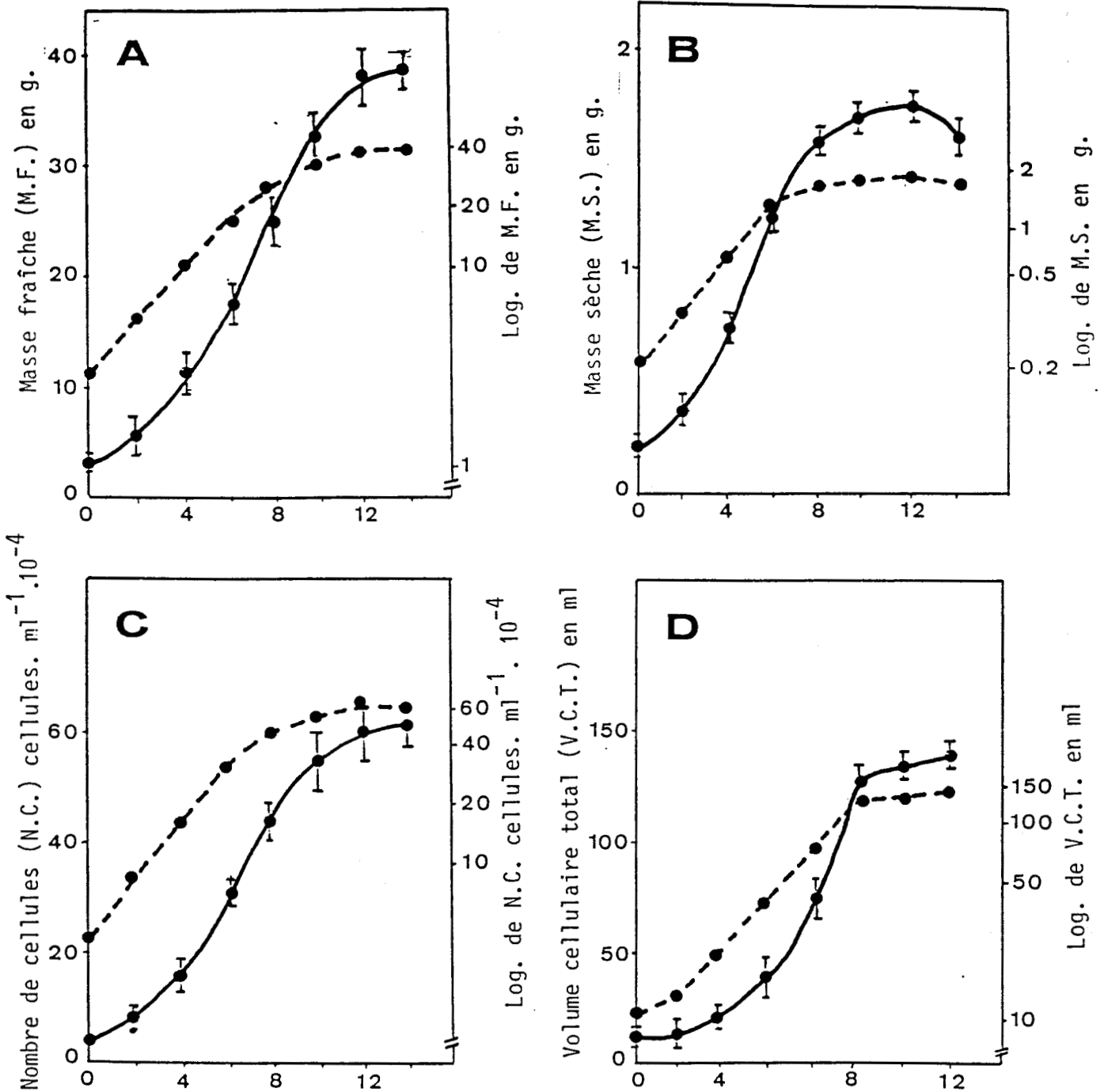


Figure 1.1 : Croissance de la suspension cellulaire de silène au cours d'un cycle de culture de 14 jours.

A : Mesure de la masse fraîche (M.F.) en g.

B : Mesure de la masse sèche (M.S.) en g.

C : Mesure du nombre de cellules (N.C.) en cellules.ml<sup>-1</sup>.10<sup>-4</sup>.

D : Mesure du volume cellulaire total (V.C.T.) en ml.

Les courbes en traits pleins sont représentées dans un repère arithmétique, celles en traits pointillés dans un repère semi-logarithmique. Les intervalles de confiance sont calculés au risque de 5%, n = 3 (A,B,D), n = 12 (C).

Ensemencement : 3 +/- 0.2 g de M.F., cellules âgées de 14 jours.

Température : 25 +/- 1°C.

Lumière : 5 à 7 watts.m<sup>-2</sup>, en continu.

Milieu de culture : solution de LAMPORT modifiée.



Le choix d'un critère de croissance est toujours difficile dans la mesure où chacun d'eux, pris individuellement, est insuffisant pour permettre une interprétation définitive. Par contre, l'association de deux paramètres, tels que la M.F. et la M.S., qui sont à la fois dépendantes l'une de l'autre tout en étant susceptibles d'évoluer différemment (courbes de la figure I-1), permet de multiplier les renseignements et de renforcer les interprétations. Par exemple, l'augmentation de M.S. au cours de la phase exponentielle traduit l'absorption et l'utilisation des nutriments du milieu de culture, notamment les saccharides métabolisés et accumulés sous forme d'amidon. Par contre, la diminution de la M.S. en fin de culture est la conséquence de l'hydrolyse de ces réserves carbonées, suite à l'appauvrissement du milieu de culture en saccharides assimilables. Pendant la même période, l'augmentation de M.F. dépend des variations des teneurs en eau des cellules (tableau I-1). Celles-ci, quoi que toujours très élevées, diminuent pendant la première semaine de culture et augmentent par la suite parallèlement à l'évolution de la taille des cellules (DUBOIS et al., 1976). La convergence constatée s'interprète comme le résultat de l'élongation cellulaire. Le suivi simultané de la M.F. et de la M.S. de la suspension cellulaire de silène au cours de la culture fournit donc à la fois une image de la croissance et des indications sur les processus biologiques qui en sont à l'origine (division ou élongation cellulaire).

#### B. Modification des conditions d'ensemencement. Définition du cycle de culture :

Pour cette étude, la biomasse a été suivie exclusivement par la M.F.. Lorsque la masse initiale de l'ensemencement varie entre 1 et 5 g par flacon, la variation exponentielle de la M.F. n'est que très peu modifiée (figure I-2). Pour un inoculum important (5 g), le maximum de biomasse est atteint en 1 semaine et tend à diminuer par la suite alors que l'introduction d'une faible quantité de cellules (1 g) provoque une période de latence de quelques jours.

La croissance peut être modifiée en faisant varier l'âge des cellules utilisées pour l'ensemencement (figure I-3). L'emploi de cellules de 7 ou 14 jours n'affecte pas significativement l'accroissement de M.F. au cours du temps. Par contre si les cellules sont trop âgées (20 jours) leur croissance est retardée et réduite. Ces quelques observations soulignent

TABLEAU I-1 : Evolution de la teneur en eau des cellules au cours de la culture de la suspension cellulaire de silène.


$$\% \text{ H}_2\text{O} = 100 \cdot (\text{MF} - \text{MS}) / \text{MS}$$

Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5%, n = 14.

---

Jours de culture	% H <sub>2</sub> O = 100.(MF-MS)/MS
0 (*)	93,8 ± 0,3
2	93,6 ± 0,2
4	93,3 ± 0,2
6	92,8 ± 0,2
8	93,8 ± 0,2
10	94,8 ± 0,3
12	95,4 ± 0,3
14	95,8 ± 0,2

---



(\*) prélèvement des cellules 1 h après le repiquage.

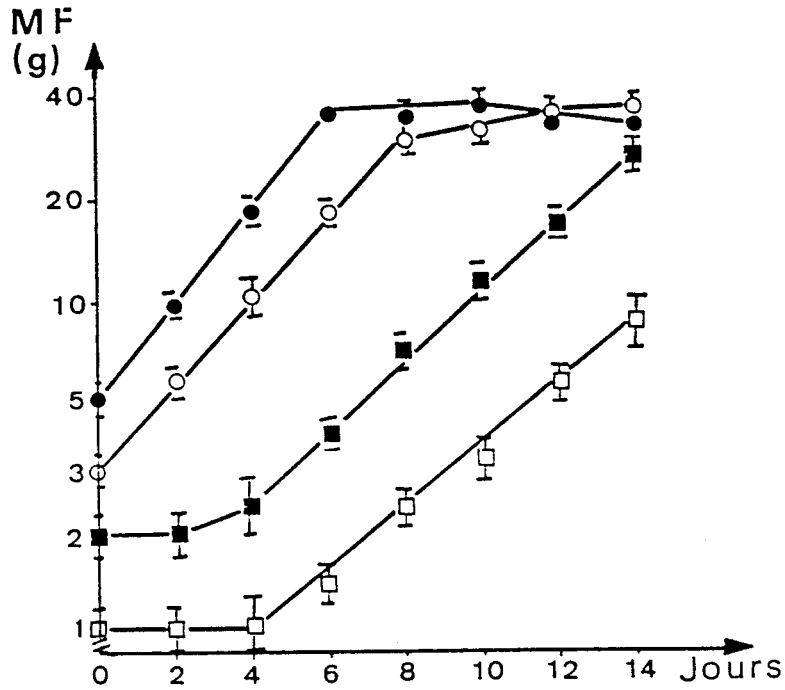


Figure I.2 : Influence de la masse de l'ensemencement sur la croissance (M.F. en g) de la suspension cellulaire de silène.

( ● ) : M.F. initiale  $5 \pm 0.4$  g ; ( ○ ) : M.F. initiale  $3 \pm 0.2$  g ; ( ■ ) : M.F. initiale  $2 \pm 0.2$  g ; ( □ ) : M.F. initiale  $1 \pm 0.1$  g. Les intervalles de confiance sont calculés au risque de 5%,  $n = 8$ .

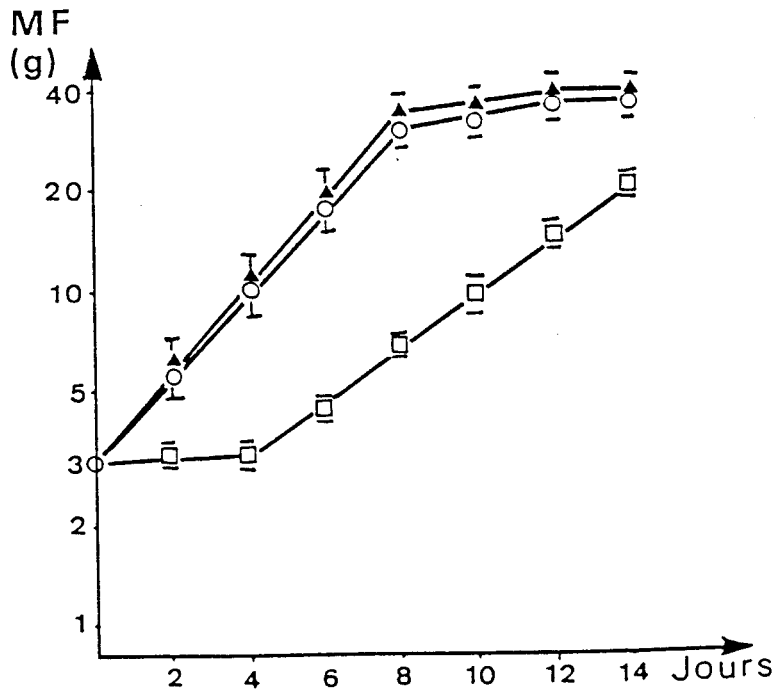


Figure I.3 : Influence de l'âge des cellules ensemencées sur la croissance (M.F. en g) de la suspension cellulaire de silène.

( ▲ ) : cellules de 7 jours ; ( ○ ) : cellules de 14 jours ; ( □ ) : cellules de 20 jours.  
Les intervalles de confiance sont calculés au risque de 5 %,  $n = 8$ .



l'importance que peuvent revêtir les conditions d'ensemencement sur le déroulement ultérieur de la croissance de la suspension cellulaire.

La définition d'un cycle de culture qui sera systématiquement respecté par la suite, devient possible, par référence aux deux exigences suivantes : annuler la phase de latence et éviter une diminution de M.F. en fin de culture. Dans ces conditions, un ensemencement régulier tous les 14 jours, à raison de 3 g (M.F.) de cellules par flacon, permet d'obtenir des résultats reproductibles et comparables entre eux.

### C. Choix des récipients de culture:

L'idée de modifier les récipients utilisés pour la culture de la suspension cellulaire s'est imposée pour réaliser des tests de croissance dans de faibles quantités de milieux de culture. Le remplacement des flacons par des tubes a permis de diviser par 10 le volume du milieu. Dans ces conditions, seul le rapport des surfaces d'échange liquide/gaz diminue nettement (tableau I-2).

L'étude, conduite en collaboration avec JACQUES (1984) montre que les variations des M.F. et des M.S. sont tout à fait parallèles (figure I-4). L'utilisation d'une échelle logarithmique pour représenter ces paramètres permet de retrouver les différentes phases de la croissance décrites et discutées précédemment. Les temps de doublement sont identiques (54 heures). Toutefois, les masses (M.F., M.S.) obtenues en tubes et en flacons diminuent, en proportion, au cours de la culture (Tableau I-3). Malgré une densité d'ensemencement favorable, la culture en tube présente une croissance légèrement plus faible, les rapports des masses mesurées diminuant progressivement.

Les raisons qui peuvent expliquer les différences observées sont multiples, en particulier des modifications de l'intensité respiratoire des cellules, liées à la différence des surfaces d'échange liquide/gaz entre les deux types de récipients. De la même manière, la disposition des tubes, regroupés par 6 sur un portoir destiné à accueillir les flacons, aboutit à une agitation de type orbital alors que les seconds subissent une rotation axiale.

TABLEAU I-2 : Comparaison entre les volumes et la surface d'échanges gazeux des tubes et des flacons utilisés pour la culture des suspensions cellulaires de silène.

	Tube	Flacon	Rapport (%)
Volume total (ml)	60	500	12
Volume du milieu (ml)	20	200	10
Volume gazeux (ml)	40	300	13,3
Surface de la section (mm <sup>2</sup> )	346	6242	5,5



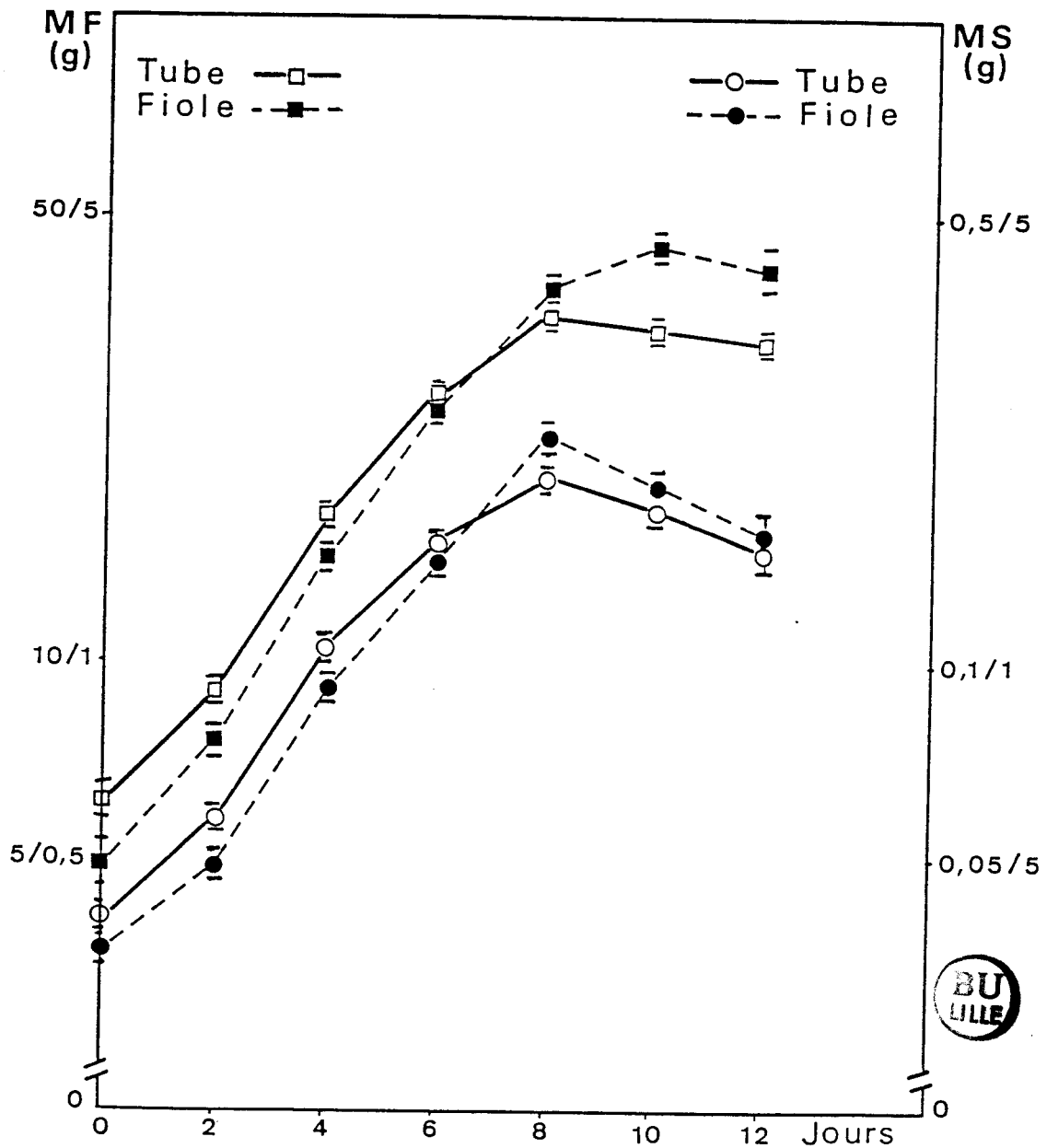


Figure I.4 : Croissances comparées de suspensions cellulaires de silène cultivées en tube ou en fiole.

Les masses fraîches (M.F.) et sèches (M.S.) sont représentés sur une échelle logarithmique. Les temps de doublement ( $T_d$ ) sont calculés pendant la phase exponentielle de croissance, plus précisément entre les 2ème et 4ème jours de croissance ( $T_d = 54$  h). Les intervalles de confiance sont calculés au risque de 5 %,  $n = 6$  (flacons),  $n' = 30$  (tubes).

TABLEAU I-3 : Comparaison de la croissance (MF et MS en g) de suspensions cellulaires de silène cultivées dans des tubes ou dans des flacons.

Jours de culture	MF (g)		100.(MFt/MFf)	MS (g)		100.(MSt/MSf)
	Tube	Flacon		tube	flacon	
	(t)	(f)		(t)	(f)	
0	0,60	4,8	12,5	0,040	0,302	13,2
2	0,89	7,4	13,0	0,057	0,477	11,9
4	1,68	14,3	11,7	0,106	0,922	11,5
6	2,56	25,5	10,0	0,153	1,573	9,7
8	3,42	33,1	9,0	0,193	2,222	8,7
10	3,27	43,9	7,5	0,173	1,847	9,4
12	3,13	41,1	7,6	0,150	1,569	9,6



#### D. Importance de l'agitation:

Evoquée précédemment lors de la comparaison des différents récipients de culture, l'influence de l'agitation sur la croissance de la suspension cellulaire a été étudiée systématiquement. Deux séries de tubes ont été placées, l'une sur l'agitateur rotatif utilisé habituellement pour la culture en flacons et l'autre sur un agitateur orbital incliné, à la distance maximale de l'axe pour augmenter le moment du mouvement circulaire. Parallèlement, deux séries de flacons ont été disposés, la première sur l'agitateur rotatif habituel, la seconde sur le plateau d'un agitateur orbital horizontal.

La croissance, appréciée par l'augmentation de M.F. après 7 et 14 jours de culture (tableau I-4) dépend largement du mode d'agitation. Le mouvement orbital est de fait moins favorable à l'accroissement de biomasse, l'effet se trouvant accentué lorsque le moment du mouvement circulaire augmente. Les déplacements des cellules se trouvent ralentis en raison de l'augmentation de la force excentrique qu'elles subissent. A l'observation, les cellules sont bien dispersées dans le milieu contenu dans des flacons soumis à une agitation axiale alors qu'elles ont tendance à séjourner au fond des tubes placés sur l'agitateur orbital. Deux conséquences peuvent en résulter :

- les échanges entre les cellules et leur milieu sont réduits par une agitation insuffisante ;
- les échanges entre le milieu de culture et le volume gazeux inclus dans les récipients sont également affectés.

Pour ces raisons, la culture en tube a été provisoirement écartée, car elle introduit des paramètres mal maîtrisés dans les résultats de croissance. Elle mérite néanmoins d'être approfondie en raison des avantages qu'elle présente (réduction des volumes de milieu, multiplication d'essais simultanés).

TABLEAU 1-4 : Influence du mode d'agitation sur la croissance de la suspension cellulaire de silène.

Ensemencement pour les cellules âgées de 14 jours:

Tube :  $0,60 \pm 0,05$  g MF

Flacon :  $3 \pm 0,20$  g MF

Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5%,  
 $n = 12$  (tubes) et  $n' = 6$  (flacons).

Agitation	Récipient	C R O I S S A N C E (MF en g)	
		7 jours	14 jours
Orbitale, oblique, 70 r.p.m. (Biolafitte)	Tube	$2,79 \pm 0,18$	$3,09 \pm 0,22$
Orbitale, oblique, 25 r.p.m. (New Brunswick)	Tube	$1,79 \pm 0,34$	$1,91 \pm 0,19$
Axiale Oblique, 70 r.p.m. (Biolafitte)	Flacon	$20,60 \pm 4,3$	$38,10 \pm 2,70$
Orbitale, horizontale, 70 r.p.m. (Gallenkamp)	Flacon	$12,80 \pm 3,8$	$28,70 \pm 3,10$

### E. Mesure des concentrations ioniques intracellulaires:

Les valeurs des concentrations ioniques intracellulaires sont calculées à partir des mesures effectuées dans l'eau d'exsorption des cellules (voir fiche technique N° 5). Les résultats sont exprimés par rapport à la M.S. (figure I-5).

La teneur en potassium diminue de 1,4 à 0,7 meq.g<sup>-1</sup> pendant les 12 premiers jours et s'élève brusquement en fin de culture. Il s'agit d'une variation relative, probablement due au fait que l'augmentation de M.S. est plus rapide que l'absorption du potassium par les cellules. La même tendance est observée avec le magnésium et le calcium. Elle est cependant moins accentuée que pour le potassium. Les teneurs en sodium, très stables pendant la majeure partie de la culture augmentent en fin de culture. La contamination due aux ions présents dans l'espace de l'eau des parois est estimée à moins de 5 %. Le calcul est effectué en considérant que la concentration ionique intrapariétale est égale à la concentration externe (C<sub>e</sub>). Le produit de C<sub>e</sub> par le taux de gonflement donne la concentration dans la paroi (en meq.g<sup>-1</sup>) qui multipliée par le rendement d'isolement des parois fournit la concentration par rapport à la M.S. des cellules et permet d'aboutir à l'estimation souhaitée.

## 2 - LA PAROI PRIMAIRE DES CELLULES DE SILENE.

### A - Structure des parois en microscopie photonique

L'aspect des parois des cellules de silène en microscopie photonique, déjà décrit par DUBOIS (1980) peut être résumé de la façon suivante : ce sont des structures relativement minces (0,5 µm) qui ne semblent pas présenter d'éléments de différenciation et peuvent donc être considérées comme des parois primaires.(planche I, fig.1).

### B - Isolement des parois

Isolées par des méthodes (fiche technique N° 3) associant des chocs mécaniques (broyage, sonication) à des traitements chimiques (Triton X100, solvants organiques), les parois se présentent sous forme de "fantômes" (planche I, fig.2). L'aspect très homogène des parois obtenues par ces traitements justifie le qualificatif proposé par CATHALA et al. (1978).

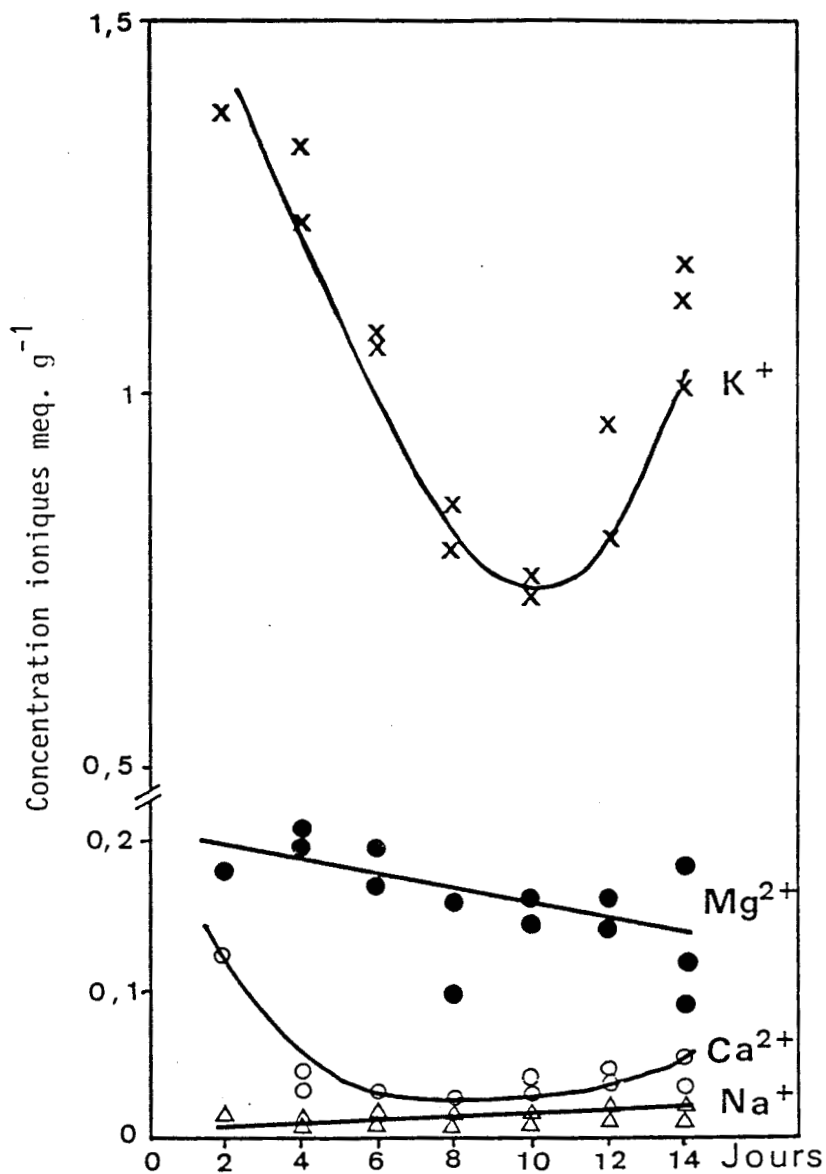


Figure I.5 : Variations des concentrations ioniques intracellulaires (meq.g<sup>-1</sup> de M.S.), au cours de la culture de la suspension cellulaire de silène.

Les mesures sont effectuées dans l'eau d'exsorption des cellules au cours de leur réhydratation.



Les mêmes méthodes permettent d'exprimer, sous forme de rendements, les masses des parois par rapport aux M.F. et M.S. des cellules (tableau I-5). Alors que ces rendements d'isolement diminuent régulièrement au cours de la culture lorsqu'ils sont exprimés relativement à la matière fraîche, ils évoluent peu lorsqu'ils sont calculés par rapport à la matière sèche. Le léger infléchissement constaté au 10ème jour de culture est dû aux variations respectives des masses des cellules et des parois au moment du grandissement cellulaire.

La mesure des dimensions cellulaires (microscopie photonique) et l'estimation de l'épaisseur des parois (microscopie électronique) permettent de calculer le volume pariétal et de le rapporter à celui de la cellule entière (tableau I-6). Alors que le volume cellulaire double entre le 6ème jour, moment où il est le plus faible, et la fin de la culture, c'est au 10ème jour que le volume pariétal est le plus réduit en valeur absolue et que son rapport à celui des cellules atteint sa limite inférieure. Il semble donc que les variations de la masse et du volume des parois au cours de la culture traduisent une adaptation structurale du compartiment pariétal à la croissance cellulaire. Cette hypothèse peut être confrontée aux résultats fournis par une étude détaillée de l'ultrastructure, de la composition biochimique et des propriétés physicochimiques des parois et de leurs principaux constituants.

#### C - Etude ultrastructurale de la paroi :

Les méthodes cytochimiques (acide periodique/thiocarbohydrazide/protéinate d'argent) sont basées sur la détection des polysaccharides (fiche technique N° 2). Elles sont appliquées à des coupes ultrafines soumises à une exploration en microscopie électronique, ce qui permet une investigation précise de l'ultrastructure pariétale. Il est ainsi possible d'étudier les événements relatifs à l'apport et/ou au rejet de matériel pariétal au cours de la culture et d'apporter quelques renseignements supplémentaires sur l'environnement immédiat de la paroi, au contact du milieu de culture.

TABLEAU I-5 : rendements d'extraction des parois isolées par rapport à la MF (R1) et à la MS (R2) des cellules de silène, après différents temps de culture.

PS = Masse sèche des parois isolées

R1 =  $100 \cdot (PS/MF)$

R2 =  $100 \cdot (PS/MS)$

L'intervalle de confiance est calculé au seuil de 5%,

n = 4 (R1), n' = 12 (R2)

---

Temps de culture	R1 (%)	R2 (%)
7 jours	$1,3 \pm 0,05$	$18,0 \pm 1,0$
10 jours	$1,0 \pm 0,05$	$15,0 \pm 1,0$
14 jours	$0,7 \pm 0,05$	$16,5 \pm 0,5$

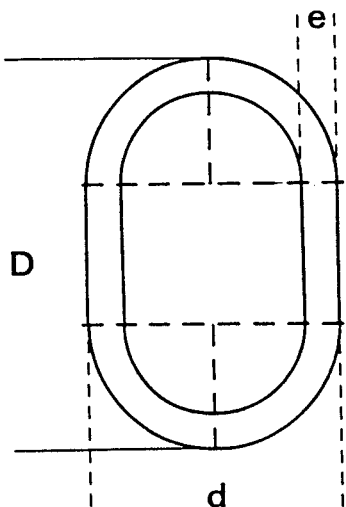
---



TABLEAU I-6 : Evolution des volumes pariétaux et de leur rapport aux volumes cellulaires au cours de la culture des suspensions cellulaires de silène.

Le calcul des volumes cellulaires ( $V_c$ ) et pariétaux ( $V_p$ ) est réalisé à partir des dimensions cellulaires ( $D$  et  $d$ ) mesurées au micromètre sous le microscope optique et de l'épaisseur des parois ( $e$ ) estimée sur des micrographies électroniques.

	D (m)	d (m)	e (m)	$V_c$ ( $m^3$ )	$V_{pr}$ ( $m^3$ )	$V_c$ ( $m^3$ )	$V_p/V_c$
	$\times 10^{-6}$	$\times 10^{-6}$	$\times 10^{-6}$	$\times 10^{-14}$	$\times 10^{-14}$	$\times 10^{-14}$	(%)
3 jours	77,9	62,0	0,5	17,3	16,5	0,74	4,27
7 jours	69,9	55,0	0,6	12,2	11,5	0,71	5,80
10 jours	74,0	60,0	0,4	15,3	14,7	0,55	3,60
14 jours	81,8	72,9	0,5	24,0	23,1	0,93	3,86



$$V_c = \pi \cdot \frac{d^2}{4} \cdot \left( D - \frac{d}{3} \right)$$

$$V_{pr} = \pi \cdot \left( \frac{d}{2} - e \right) \cdot \left( D - \frac{d+4e}{3} \right)$$

$$V_p = V_c - V_{pr}$$

Planche I : Aspects généraux des cellules et des parois en  
microscopie photonique

Fig. 1 : Cellules de la suspension cellulaire de silène après 14 jours de culture.

Contraste interférenciel de Nomarski.

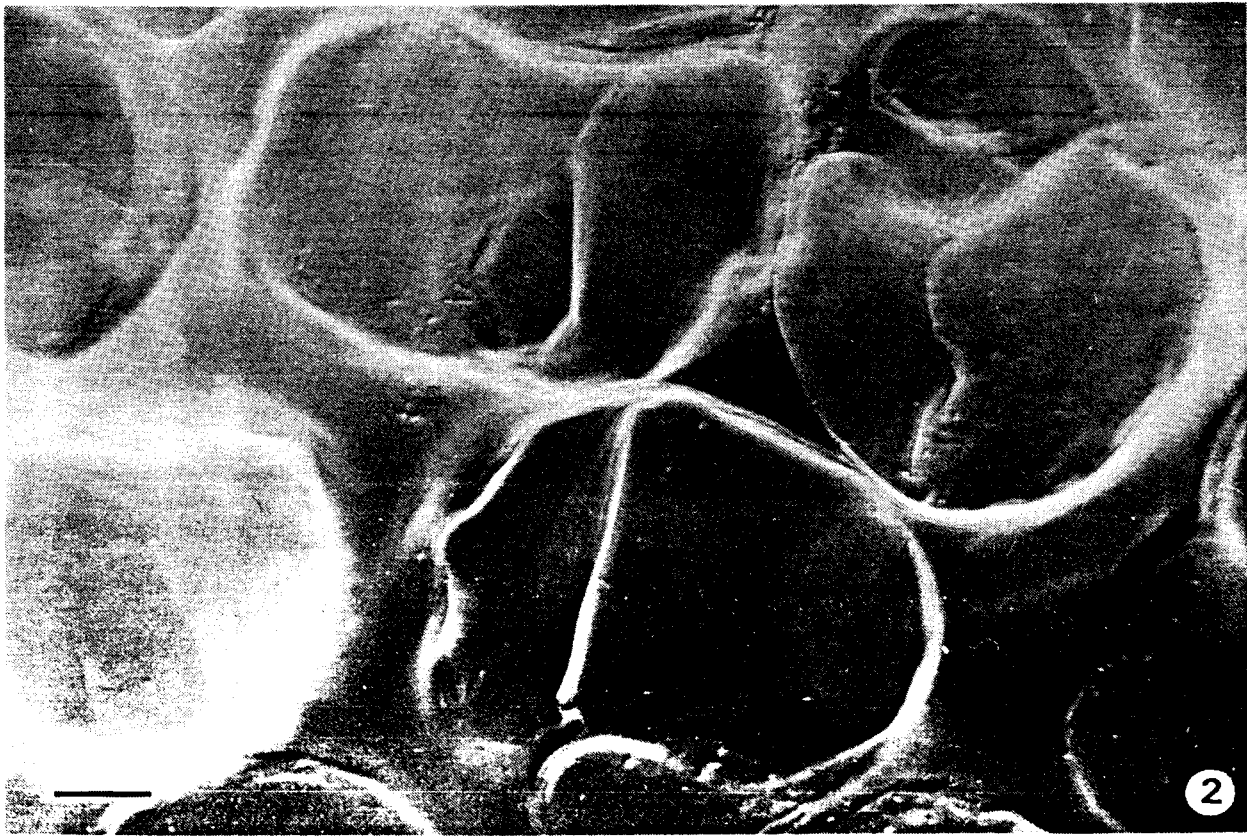
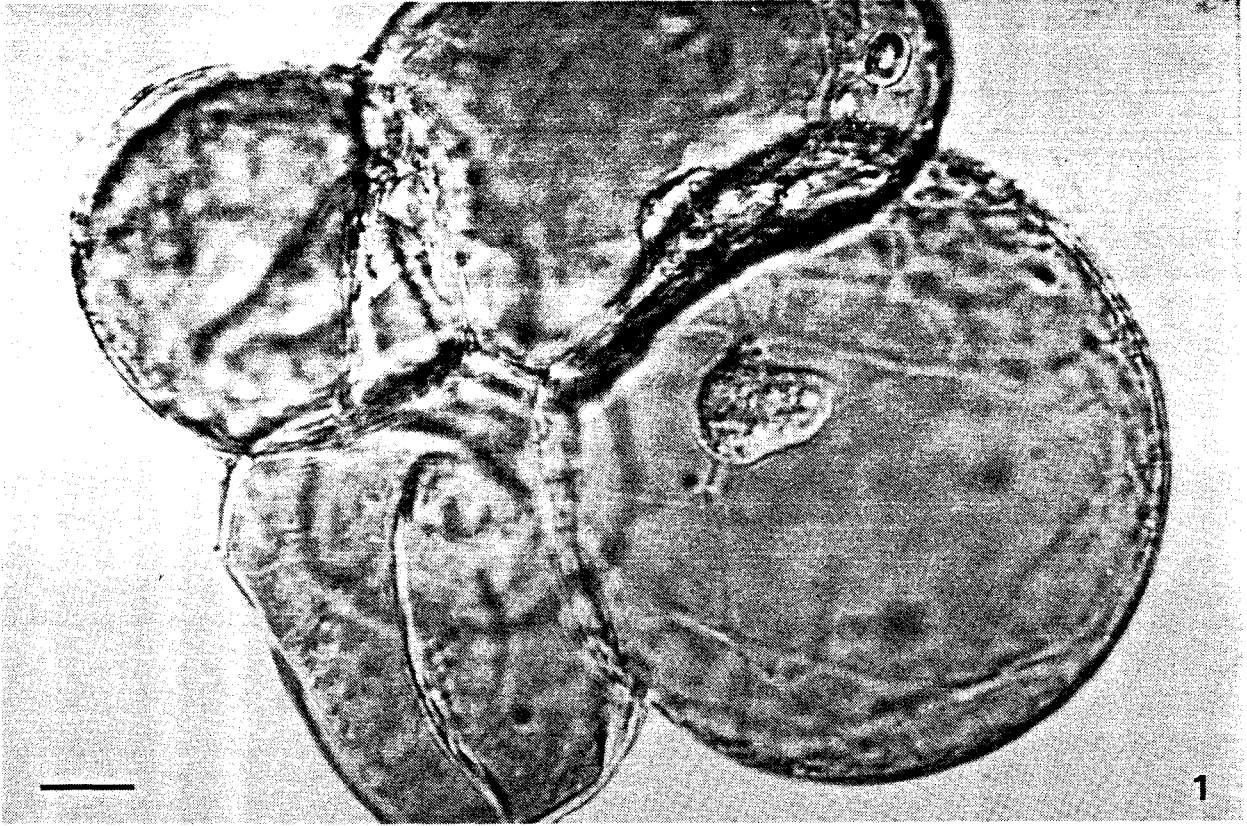
x 1 250 - échelle : 10  $\mu$ m.

Fig. 2 : Parois isolées à partir de cellules de silène âgées de 14 jours. Le protocole utilisé est celui de Cathala (1978), modifié. Il ne comporte que 4 opérations :

- plasmolyse des cellules (mannitol 1 M) ;
- broyages mécaniques ;
- dissolution des membranes (triton X 100 1%) ;
- rinçages à l'eau distillée.

Contraste interférenciel de Nomarski.

x 1 250 - échelle : 10  $\mu$ m.



#### a) Apport de matériel pariétal

Classiquement, le test de THIERY\* sert à mettre en évidence le contenu polysaccharidiques des vésicules golgiennes (planche II, fig. 4). Celles-ci s'accumulent dans des dépressions périplasmiques à l'extérieur du plasmalemme (planche II, fig. 5). Ces aspects diffèrent des fossettes excrétrices habituellement observées lors du déversement des vésicules golgiennes dans le périplasma (VIAN et ROLAND, 1974). L'abondance d'amas multivésiculaires dans le périplasma, à l'embouchure d'un élément du reticulum endoplasmique, ou dans des excavations du plasmalemme, n'a pas encore été décrit chez les suspensions cellulaires. Cependant, des figures analogues sont signalées dans le périplasma de certains embryons (CAMEFORT, 1970) ou à l'occasion de l'altération des structures pariétales au cours de l'abscission (HUBERMAN et al, 1983).

Ces vésicules déversent leur contenu polysaccharidique dans la matrice pariétale (planche II, fig. 6 et 7). Cependant, elles se trouvent parfois emprisonnées par la mise en place de nouveaux éléments fibrillaires contre la face interne de la paroi (planche III, fig. 12). Elles y demeurent ainsi de telle sorte qu'elles peuvent se trouver émises dans les méats ou même directement dans le milieu, lors de la séparation des cellules (planche III, fig. 13).

#### b) Emission de fractions pariétales dans le milieu de culture

Le matériel pariétal est libéré sous différentes formes qui apparaissent simultanément ou successivement selon le stade de la croissance et le degré de dissociation des agrégats qui constituent la suspension.

Les parois externes, au contact direct du milieu, subissent des frictions mécaniques à cause du mouvement rotatif imposé par le mode d'agitation. La limite externe se présente sous forme d'une brosse rase constituée de filaments très courts (planche III, fig. 8).

\* (1967)

## Planche II : Intégration du matériel pariétal

Fig. 3 : Aspect caractéristique des parois (P) à la limite de trois cellules (culture de 10 jours). La présence de méats (EI) en cours de formation constitue l'amorce d'une séparation des cellules. Le cytoplasme est dense et riche en mitochondries (M).

Contrastant : acétate d'uranyl et citrate de plomb.

x 28 000 - échelle : 0,5  $\mu$ m.

Fig. 4 : Parois d'épaisseur très différentes . Le contraste par le test de Thiery (PATAg) permet de mettre en évidence le contenu polysaccharidique des vésicules golgiennes. Celles-ci sont particulièrement nombreuses dans le cytoplasme au voisinage du plasmalemme.(culture de 6 jours).

x 38 000 - échelle : 0,5  $\mu$ m.

Fig. 5 : Vésicules extracytoplasmiques dans des dépressions du plasmalemme ou lomasomes (L). Cytoplasme riche en reticulum endoplasmique (RE) au voisinage du plasmalemme (culture de 6 jours).

Contrastant : PATAg.

x 24 000 - échelle : 0,5  $\mu$ m.

Fig. 6 et 7 : Présence de vésicules (v) dans le périplasma. Entourées d'une membrane, ces vésicules probablement d'origine golgienne (G) déversent leur contenu dans la paroi ( $\nabla$ ) (culture de 4 jours).

Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb (Fig. 6), PATAg (Fig. 7)

x 96 000 - échelle : 0,5  $\mu$ m.

### Abréviations :

EI : méats ou espaces intercellulaires

ER : réticulum endoplasmique

JP : jeune paroi

Va : vacuole

Pl : plasmalemme

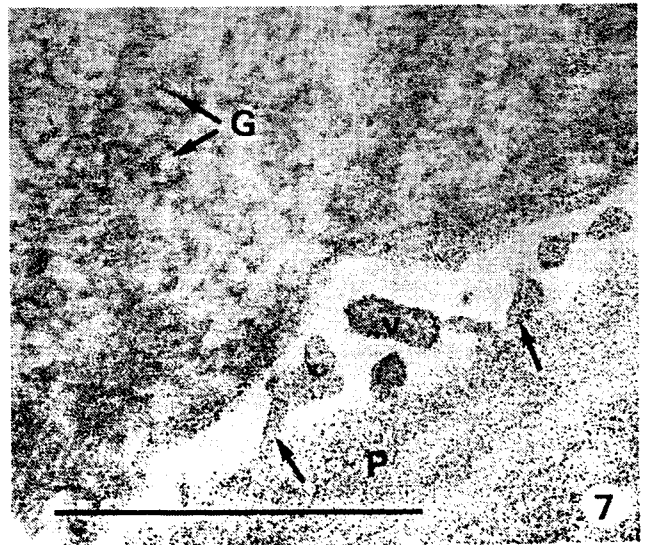
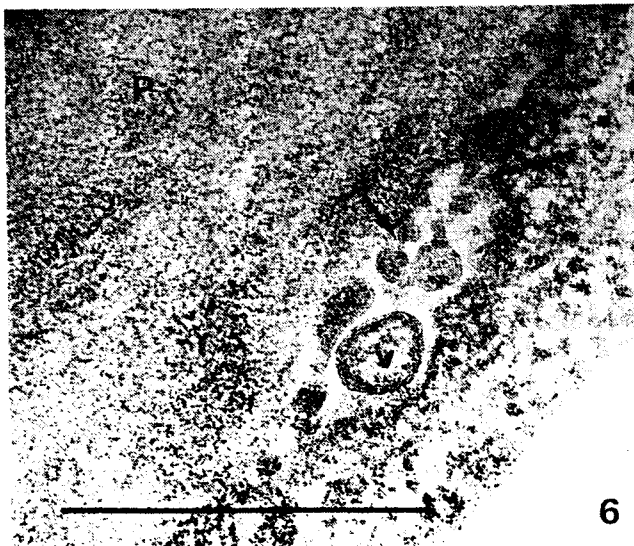
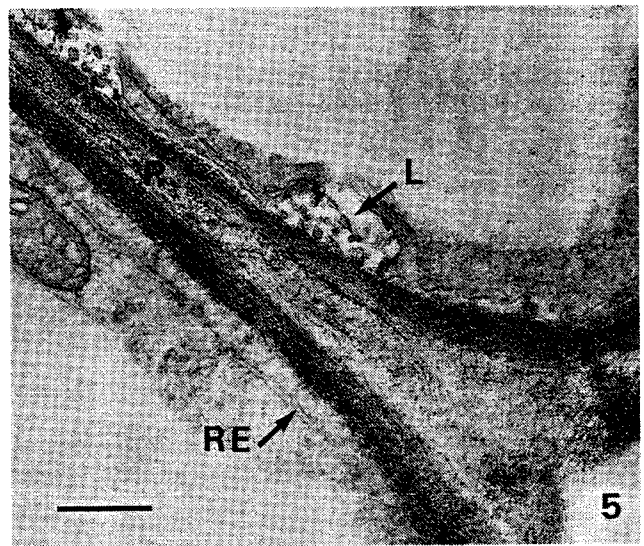
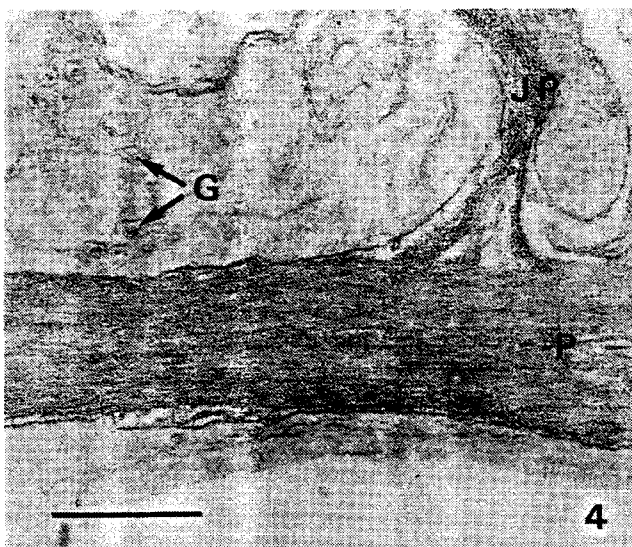
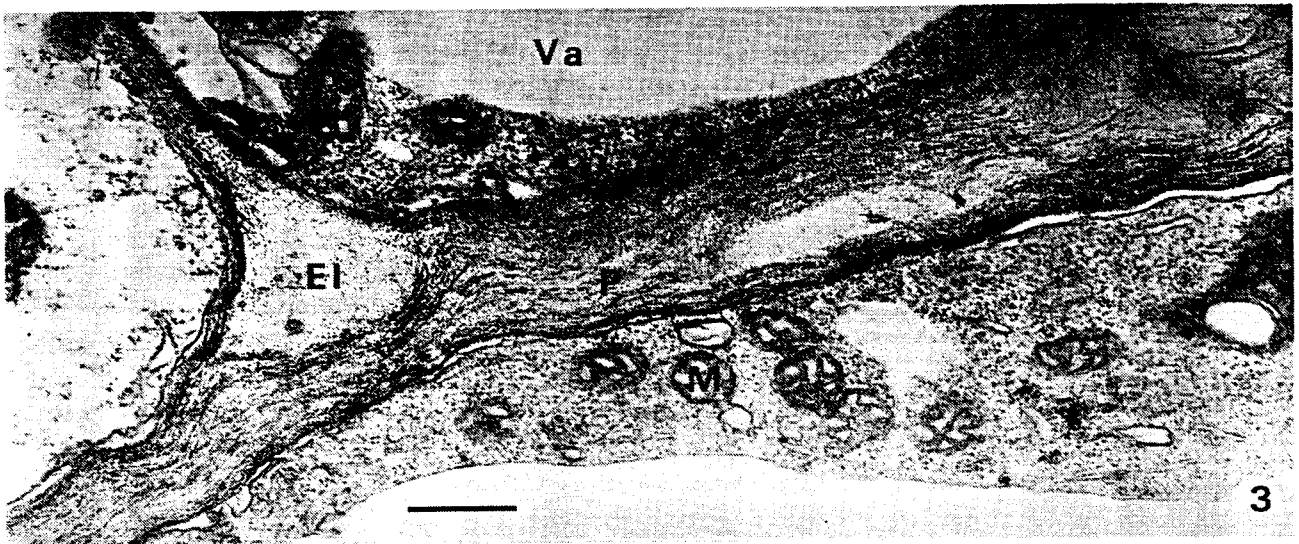
p : paroi

M : mitochondries

L : lomasome

G : vésicule golgienne

v : vésicule extracytoplasmique





Des filaments baignant dans le milieu sont mis en évidence au voisinage de cette paroi externe. Ils réagissent intensément au test de THIERY. Ils peuvent se présenter *isolément*, sous forme d'un réseau très lâche plus ou moins indépendant des amas cellulaires (planche III, fig. 9). Ils sont souvent coalescents et forment des lambeaux qui conservent des points de contact avec la paroi .

Un réseau filamenteux se répartit d'une façon très homogène dans les espaces intercellulaires qui sont des zones où l'agitation est peu importante (planche III, fig. 10). Deux types de structures coexistent :

- des mailles très larges polygonales limitées par les cordons fibrillaires dont le diamètre avoisine 0,5  $\mu\text{m}$ .
- un réseau plus fin, généralement monofibrillaire, qui **délimite des vides** de 10 nm de diamètre, à l'intérieur de ces mailles. La réactivité de ces éléments filamenteux au test cytochimique de THIERY n'élimine cependant pas la possibilité qu'il puisse s'agir de microfibrilles celluloseuses.

Dans de nombreux cas, des lambeaux entiers pluristratifiés se détachent de la paroi, principalement à proximité des zones où s'amorce la séparation des cellules (planche III, fig. 10 et 11). Ce fait s'explique en observant les parois adjacentes de deux cellules pendant que ce prépare cette désagrégation. Il se produit une solubilisation de la lamelle moyenne et probablement des hydrolyses enzymatiques des composés pectiques et hemicelluloseux de la matrice, ce qui laisse apparaître d'importantes zones de relâchement dans la structure pariétale (planche II, fig. 3). Progressivement, en raison des contraintes mécaniques provoquées par l'agitation, la dissociation s'accroît et des pans entiers de paroi se déchirent et sont libérés dans le milieu de culture.

Ainsi, l'étude ultrastructurale de la paroi permet de suivre son évolution au cours de la culture. Elle confirme qu'un renouvellement constant de matériel polysaccharidique vient compenser quantitativement l'émission permanente dans le milieu de culture d'une partie du contenu pariétal. C'est la raison pour laquelle l'épaisseur des parois est très stable.

### Planche III : Dégradation de la paroi

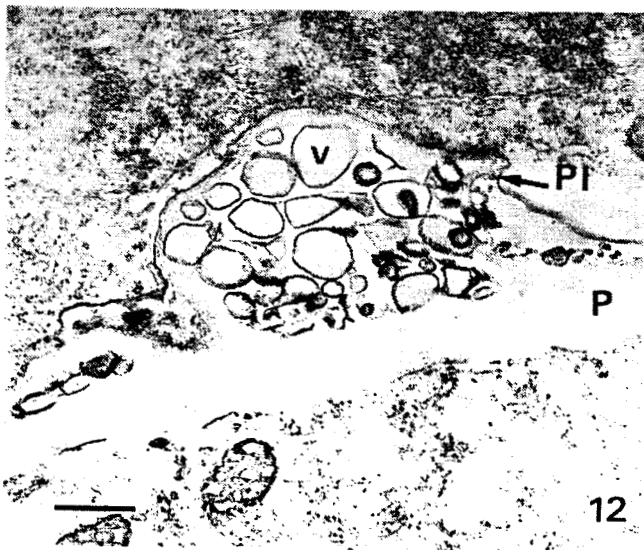
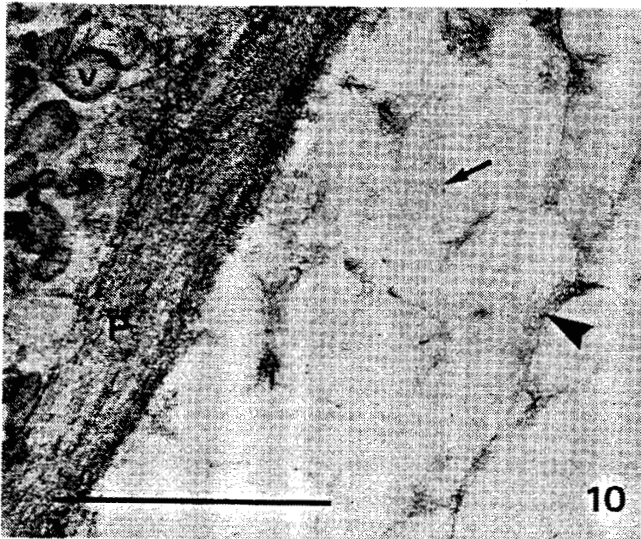
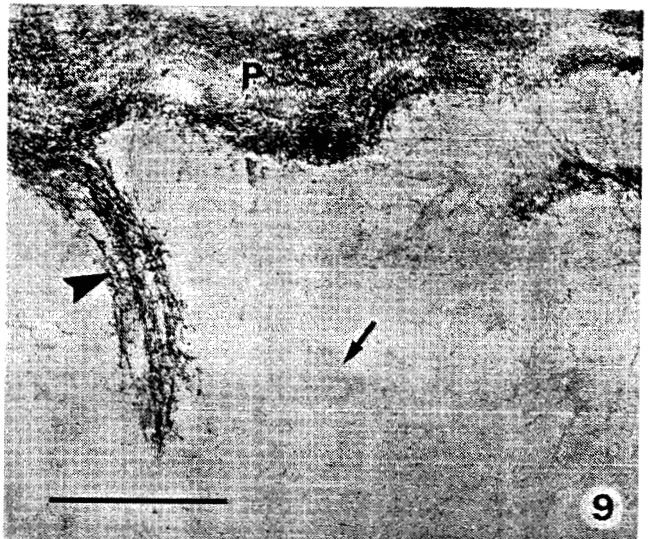
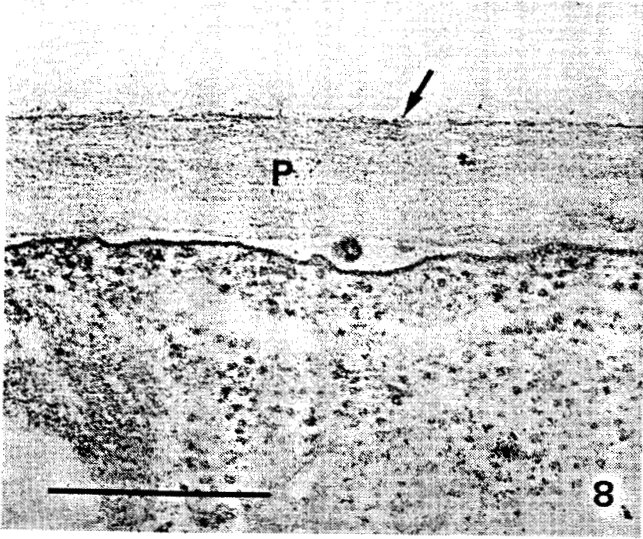
Fig. 8 : Les parois périphériques présentent une surface hérissée de filaments fins et courts formant un tapis ras (↘) (culture de 6 jours).  
Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb.  
x 57 000 - échelle : 0,5 µm.

Fig. 9 à 11 : Formes d'altération des parois par désagrégation de fins filaments (↘) ou de lambeaux plus importants (↙). Dans les méats où l'agitation est moins forte, les lambeaux s'arrangent en réseau à grosses mailles à l'intérieur desquelles les filaments forment des mailles plus petites (cultures de 8, 10 et 1 jours).  
Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb.  
x 46 000, x 70 000 et 28 000 respectivement - échelle : 0,5 µm.

Fig. 12 et 13 : Emission de vésicules qui progressivement se trouvent emprisonnées par la paroi nouvellement formée et expulsées dans le milieu de culture lorsque les cellules se séparent (culture de 10 et 4 jours).  
Contrastant : acétate d'uranyle et citrate de plomb.  
x 20 000 et x 14 000 - échelle : 0,5 µm.

#### Abréviations :

Pl : plasmalemme  
P : paroi  
v : vésicule extracytoplasmique



BU  
LILLE

D - Etude analytique de la paroi :

Il s'agit d'apprécier globalement le contenu en eau, en sels minéraux et en polysaccharides matriciels (notamment les pectines) et de corrélérer ces données à la capacité d'échanges cationiques (C.E.C.). Ce paramètre permet d'estimer la participation de la paroi aux échanges ioniques entre les cellules et le milieu de culture (MORVAN C., 1983)

a) L'eau de gonflement des parois

Le taux de gonflement des parois dépend de la structure du squelette pariétal, notamment de l'imbrication des différents composés et de leur résistance mécanique aux déformations. De plus, il varie, comme celui des résines échangeuses d'ions, avec la composition de la solution d'absorption. C'est la traduction de la variation de la densité de charge effective de la paroi selon le pH, la nature, la valence et la concentration des ions (MORVAN C., 1983).

La mesure des taux de gonflement de parois préalablement isolées a été effectuée à la fois lorsque celles-ci sont protonées (forme H), ce qui correspond à leur état de référence et lorsqu'elles ont été équilibrées avec une solution de  $\text{CaCl}_2$  100 mM (forme Ca). La mesure a été poursuivie après que les parois aient été débarassées de leurs pectines (fiches techniques N° 3 et 4), par des extractions successives à l'eau chaude (B) puis à l'EDTA 1 % (C), ce qui permet une comparaison avec les parois de départ (A). Les résultats présentés dans le tableau I-7 montrent que les taux de gonflement des parois protonées sont voisins de ceux des parois sous forme Ca, traduisant les fortes interactions entre les charges négatives fixes portées par les pectines et les ions calcium. De plus, l'eau de gonflement des parois de référence (A) change selon l'âge des cellules ; elle est maximale chez les cellules de 10 jours et diminue fortement en fin de culture. Cette diminution des taux de gonflement peut être provoquée par des modifications structurales mais aussi par l'évolution des différentes catégories de pectines, celles extraites à l'eau chaude participant préférentiellement au gonflement du réseau. Or, c'est précisément à 10 jours qu'elles représentent le plus fort pourcentage (62 %) de la masse pariétale. Au contraire, les pectines extractibles par l'EDTA s'accroissent en proportion en fin de culture (18 %) ce qui peut expliquer la moins bonne rétention d'eau.

TABLEAU I-7 : taux de gonflement ( $\epsilon$ ) des parois isolées de cellules de silène à différents temps de culture.

- mf = masse des parois gonflées  
 ms = masse des parois sèches  
 $\epsilon = (mf - ms) / ms$   
 $\epsilon_H$  = taux de gonflement de référence des parois protonées  
 $\epsilon_{Ca}$  = taux de gonflement des parois équilibrées dans  $Ca(Cl)_2$  100mM  
 A = parois avant extraction  
 B = parois après extraction à l'eau bouillante  
 C = parois après extractions à l'eau puis EDTA 1% bouillants.

Les intervalles de confiances sont calculés au seuil de 5%, n = 5

Durée de culture	Forme des parois	$\epsilon_H$	$\epsilon_{Ca}$
7 jours	A	2,13 $\pm$ 0,15	2,00 $\pm$ 0,25
	B	2,14 $\pm$ 0,25	2,06 $\pm$ 0,25
	C	2,60 $\pm$ 0,10	2,90 $\pm$ 0,10
10 jours	A	2,60 $\pm$ 0,30	2,65 $\pm$ 0,35
	B	2,24 $\pm$ 0,25	2,40 $\pm$ 0,25
	C	2,43 $\pm$ 0,30	2,64 $\pm$ 0,30
14 jours	A	1,81 $\pm$ 0,15	1,47 $\pm$ 0,15
	B	2,10 $\pm$ 0,20	1,94 $\pm$ 0,30
	C	2,60 $\pm$ 0,20	2,09 $\pm$ 0,20

TABLEAU I-8 : Variations de la composition cationique des parois  
( $\text{meq.g}^{-1}$ ) au cours de la culture de la suspension  
cellulaire de silène.

Les parois de cellules lyophilisées sont isolées puis incinérées.  
Les cations sont dosés dans les cendres reprises dans HCl 0,1M.  
La somme des cations est considérée comme l'estimation de la CEC.

COMPOSITION CATIONIQUE DES PAROIS ( $\text{meq.g}^{-1}$ )					
	$\bar{K}$	$\bar{Na}$	$\bar{Ca}$	$\bar{Mg}$	CEC = $\Sigma$ cations
2 jours	<0,001	0,008	0,270	0,110	0,388
4 jours	"	0,007	0,150	0,125	0,282
6 jours	"	0,006	0,130	0,140	0,276
8 jours	"	0,010	0,152	0,148	0,310
10 jours	"	0,031	0,178	0,145	0,354
12 jours	"	0,042	0,185	0,125	0,352
14 jours	"	0,050	0,230	0,150	0,430



TABLEAU I-9 : Variations du rapport  $\overline{\text{Ca}}/\overline{\text{Mg}}$  et du coefficient de sélectivité  $K(\text{Ca}/\text{Mg})$  dans les parois au cours de la culture de la suspension cellulaire de silène.

Les valeurs des concentrations pariétales  $\langle \overline{\text{Ca}} \rangle$  et  $\langle \overline{\text{Mg}} \rangle$  et de milieu de culture  $\langle \text{Ca} \rangle$  et  $\langle \text{Mg} \rangle$  sont reprises respectivement dans le tableau I-8 et dans la figure I-7.

	$\overline{\text{Ca}}/\overline{\text{Mg}}$	$K(\text{Ca}/\text{Mg}) = \frac{\langle \overline{\text{Ca}} \rangle \cdot \langle \text{Mg} \rangle}{\langle \text{Ca} \rangle \cdot \langle \overline{\text{Mg}} \rangle}$
2 jours	2,45	2,97
4 jours	1,28	1,15
6 jours	0,93	0,83
8 jours	1,03	0,88
10 jours	1,23	0,84
12 jours	1,48	0,85
14 jours	1,54	0,98



C'est donc au 10<sup>ème</sup> jour de culture, au cours de la phase d'élongation cellulaire, que les parois présentent les meilleures capacités de rétention d'eau.

#### b) Composition ionique des parois

La mesure de la distribution ionique dans les parois in situ a été effectuée à partir de cellules lyophilisées. Ce protocole présente l'inconvénient de fragiliser certaines pectines. En effet, des dosages colorimétriques effectués dans la première eau de lavage des cellules, lors du protocole d'extraction des parois, indiquent la présence d'acides uroniques. De plus, la C.E.C. des parois de cellules de silène, représentée par la somme des cations, varie avec l'âge de la culture. Elle passe par un minimum entre 4 et 6 jours, moment qui correspond à la division et au début de l'élongation (tableau I-8). Les C.E.C. des 2 séries de cellules récoltées à différents temps de culture sont nettement inférieures à celles mesurées indépendamment sur des parois extraites de cellules fraîches. Les résultats présentés ne concernent donc que les ions en équilibre avec les pectines non solubilisées.

Le calcium et le magnésium sont les ions majeurs en équilibre avec les acides carboxyliques portés par les pectines. Ils représentent plus de 95% des ions en début de culture et environ 80 à 90% en fin de culture (tableau I-8). Le rapport  $\bar{Ca}/\bar{Mg}$  largement supérieur à l'unité en début de culture diminue pour passer par un minimum, également à 6 jours (tableau I-9). Le minimum de fixation du calcium se situe donc lorsque la valeur de la C.E.C. est la plus faible.

Les ions monovalents sont peu fixés dans la paroi. Le potassium n'apparaît qu'à l'état de traces. La fixation du sodium faible en début de culture (<0,010 meq/g) augmente significativement (0,050) à partir de 10 jours. Cet effet peut être expliqué par la diminution de la concentration des ions divalents dans le milieu, par rapport à celle du sodium qui reste constante pendant toute la culture. En conséquence, la fraction ionique externe du sodium augmente au cours de la culture.

A partir de données de la variation de la distribution ionique dans le milieu de culture (voir figure I-7), il est possible de calculer les coefficients de sélectivité  $K(Ca/Mg)$ . Ces coefficients sont supérieurs à l'unité en début de culture (tableau I-9), indiquant une meilleure



TABLEAU I-10 : Composition en monosaccharides des pectines (% molaire)  
extraites à l'eau bouillante des parois isolées  
de cellules de silène cultivées en suspension.

	Rha	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	Gal UA
10 jours	4,0	17,2	5,1	6,3	25,6	18,9	22,9
14 jours	7,7	16,8	4,0	3,0	19,5	19,7	29,4



sélectivité des parois pour le calcium au dépend du magnésium. Le coefficient  $K(\text{Ca}/\text{Mg})$  diminue rapidement au cours du temps et devient inférieur à l'unité dès le 6<sup>ème</sup> jour. Cette inversion de sélectivité de la paroi se poursuit jusqu'au 12<sup>ème</sup> jour, malgré le redressement du rapport  $\text{Ca}/\text{Mg}$ . En fin de culture, la sélectivité des parois à l'égard du calcium et du magnésium est pratiquement équivalente.

c) Composition centésimale en monosaccharides des fractions pectiniques des parois

Les fractions pectiniques ont été extraites à l'eau bouillante à partir de parois isolées. L'analyse de la composition centésimale en monosaccharides a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse après hydrolyses chimique et enzymatique (fiches techniques N° 7 et 8).

Les principaux monosaccharides des pectines sont l'acide galacturonique, le glucose, le galactose, l'arabinose et le rhamnose (tableau I-10). Hormis la teneur élevée en glucose qui peut résulter d'une contamination des parois isolées par l'amidon, la répartition centésimale des monosaccharides est voisine de celle des rhamnogalacturonanes I (TALMADGE et al., 1973 ; MC NEIL et al., 1980). Le xylose et le mannose sont présents en faible quantité. La variation observée entre 10 et 14 jours est relativement faible ; elle concerne plus particulièrement l'augmentation relative de l'acide galacturonique et du rhamnose.

d) Capacité d'échange cationique des parois isolées

La capacité d'échange cationique (C.E.C.) d'une paroi représente la quantité de cations susceptibles de neutraliser les charges électronégatives présentes dans son infrastructure, lorsqu'elle est en équilibre d'échange avec une solution de composition ionique donnée. Ce paramètre permet d'estimer la densité de charges accessibles des acides uroniques, en particulier celle des pectines (fiche technique N° 4).

La C.E.C. n'est pas une constante. Elle dépend du pH, de la force ionique et de la nature du cation utilisé. La C.E.C. totale est atteinte à neutralisation complète (pH 7), en présence d'ions divalents et à force ionique supérieure à 15 mM. Les résultats obtenus (tableau I-11) montrent que les C.E.C. progressent régulièrement durant la seconde semaine de culture. Cette tendance se poursuit ultérieurement (cellules de 20 jours).

TABLEAU I-11 : Capacités d'échange cationique (CEC) des parois isolées de cellules de silène à différents temps de culture.

Les CEC totales sont mesurées en milliéquivalents par gramme de parois sèches ( $\text{meq.g}^{-1}$ ) après équilibre dans des solutions de  $\text{Ca}(\text{Cl})_2$  ( $I > 15\text{mM}$ ), pH 5,5 - 7.

---

Durée de culture	CEC ( $\text{meq g}^{-1}$ )
7 jours	0,525
10 jours	0,625
14 jours	0,800
20 jours	1,000

---



Une telle augmentation de la C.E.C. peut résulter d'une synthèse importante de nouveaux acides uroniques, d'une déméthylation des pectines en place ou encore d'une combinaison des deux processus.

## II . LE MILIEU DE CULTURE, TEMOIN DES ECHANGES .

Pour la majorité des auteurs, le milieu de culture est considéré avant tout comme étant la source des nutriments nécessaires au développement des cellules. L'équilibre initial de la formule de la solution nutritive est recherché pour garantir une croissance optimale. Cependant, les variations des paramètres du milieu de culture résultent d'échanges multiples, avec les cellules et avec l'atmosphère susjacente. Ainsi, les analyses effectuées dans le milieu au cours de la culture témoignent des relations entre les cellules et leur environnement.

### 1 ) COMPOSITION MINERALE ET PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES.

#### A. Données initiales :

Le milieu nutritif utilisé pour la culture des suspensions cellulaires de silène (tableau I-12) est celui de LAMPORT modifié par LESCURE (1966), qui a été élaboré initialement pour l'entretien des suspensions cellulaires d'érable. La formule minérale se caractérise par la prédominance des ions  $K^+$  et  $NO_3^-$  dont les concentrations molaires respectives sont supérieures à la somme de celles des autres éléments réunis.

Le saccharose, introduit à raison de  $20 \text{ g.l}^{-1}$ , est la seule source carbonée mise à la disposition des cellules. Celles-ci sont incapables d'effectuer la photosynthèse puisqu'elles sont dépourvues de chloroplaste.

Les exigences en facteurs de croissance sont relativement faibles puisque  $10^{-6} \text{ g.l}^{-1}$  de chlorhydrate de thiamine et d'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4-D) suffisent à maintenir la croissance de la suspension cellulaire, de manière reproductible. L'addition d'acide gibbérellique ( $AG_3$ ) à des doses comprises entre 0,1 et  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  permet cependant d'améliorer les résultats (BRASSART et al., 1982; MORVAN, 1982).

TABLEAU I-12 : composition du milieu de culture de la suspension cellulaire de silène (LESCURE, 1966).

<u>MACRO-ELEMENTS</u>	g . l <sup>-1</sup>	M . l <sup>-1</sup>
Nitrate de Calcium (4 H <sub>2</sub> O)	290 10 <sup>-3</sup>	1,23 10 <sup>-3</sup>
Chlorure de Potassium	65 10 <sup>-3</sup>	0,88 10 <sup>-3</sup>
Nitrate de Potassium	1960 10 <sup>-3</sup>	19,40 10 <sup>-3</sup>
Sulfate de Magnesium (7 H <sub>2</sub> O)	360 10 <sup>-3</sup>	1,46 10 <sup>-3</sup>
Phosphate monopotassique	500 10 <sup>-3</sup>	3,70 10 <sup>-3</sup>
Phosphate disodique (12 H <sub>2</sub> O)	97 10 <sup>-3</sup>	0,27 10 <sup>-3</sup>
<u>MICRO-ELEMENTS</u>		
Sulfate ferreux (7 H <sub>2</sub> O)	2,80 10 <sup>-3</sup>	1,0 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA	3,72 10 <sup>-3</sup>	1,0 10 <sup>-5</sup>
Acide borique	1,50 10 <sup>-3</sup>	2,4 10 <sup>-5</sup>
Iodure de Potassium	0,75 10 <sup>-3</sup>	4,5 10 <sup>-6</sup>
Sulfate de Manganèse (4 H <sub>2</sub> O)	4,50 10 <sup>-3</sup>	2,0 10 <sup>-5</sup>
Sulfate de Zinc (7 H <sub>2</sub> O)	1,50 10 <sup>-3</sup>	5,2 10 <sup>-6</sup>
<u>HYDRATE DE CARBONE</u>		
Saccharose	20	58,5 10 <sup>-3</sup>
<u>SUBSTANCE DE CROISSANCE</u>		
Thiamine HCl (vit. B1)	1,00 10 <sup>-3</sup>	3,0 10 <sup>-6</sup>
Acide 2,4-dichlorophenoxyacetique (2,4-D)	1,00 10 <sup>-3</sup>	4,5 10 <sup>-6</sup>

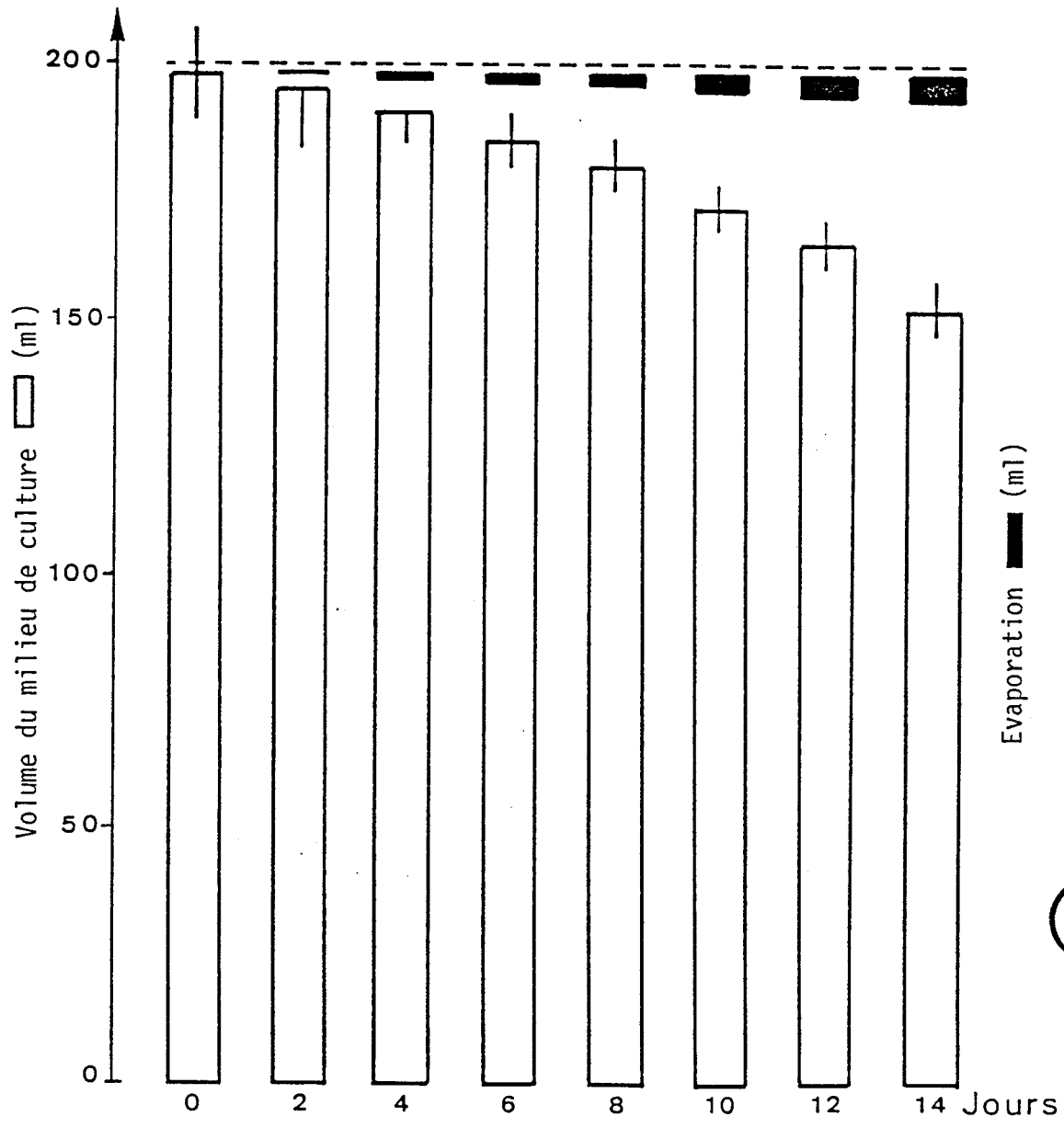


Figure I.6 : Variations du volume du milieu au cours de la culture de la suspension cellulaire de silène.

□ : volume du milieu de culture (ml) ;

■ : contribution de l'évaporation à ces variations (ml).

Les intervalles de confiance sont calculés au risque de 5 %, n = 10.

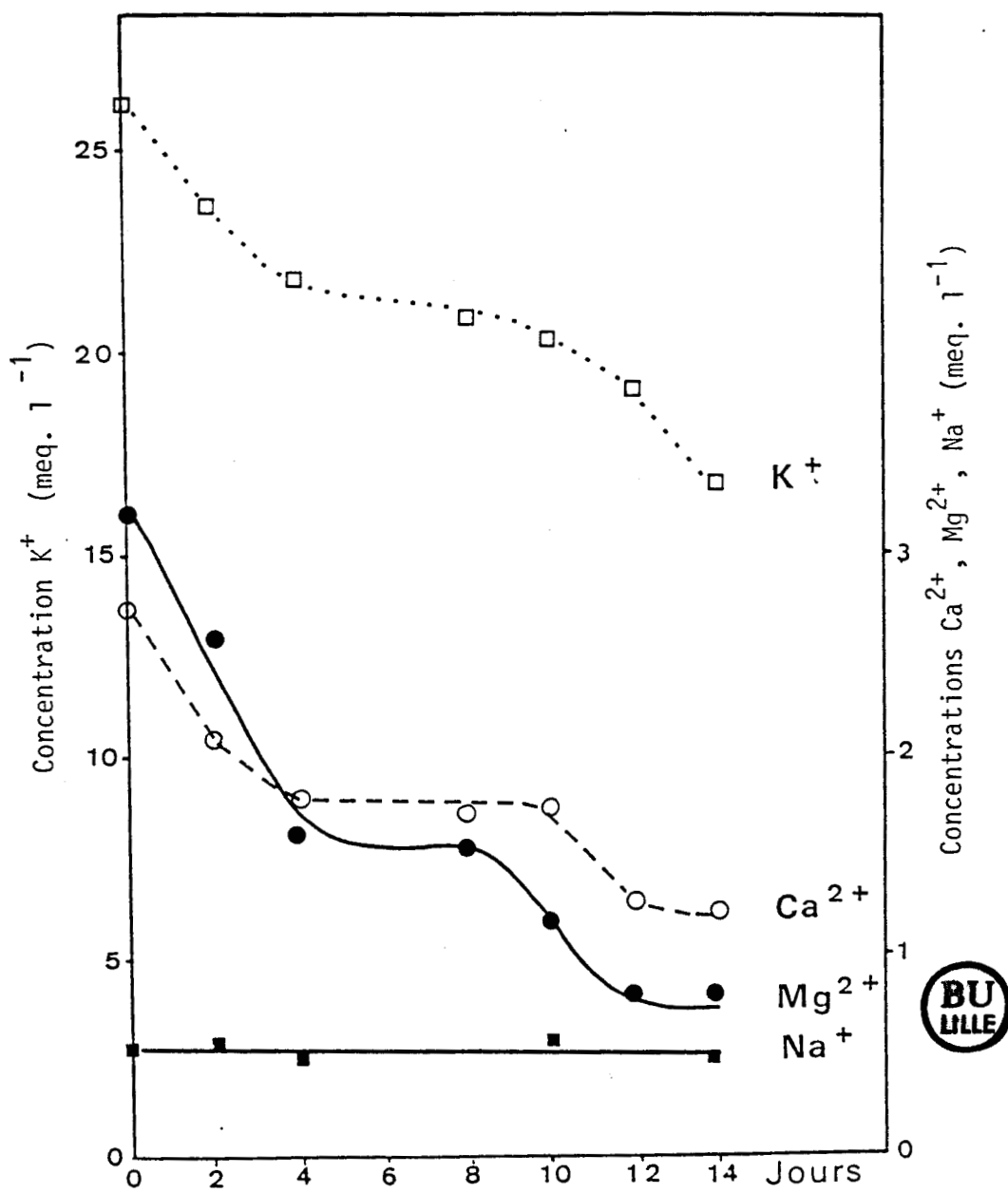


Figure I.7 : Variations des concentrations ioniques ( $\text{meq.l}^{-1}$ ) dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de silène.

Chaque point est la moyenne de 2 ou 3 mesures, les intervalles de confiance sont calculés n'ont pas été calculés.

Le pH du milieu de culture est ajusté à 5,7 avant l'autoclavage. Les mesures de contrôle effectuées immédiatement après l'ensemencement montrent que la solution intersticielle introduite avec les cellules ne modifie pas la valeur initiale du pH.

Avant l'ensemencement, la mesure du potentiel osmotique du milieu de culture a donné une valeur de -115 mOsmoles (mOs), voisine de celle calculée à partir de la formule nutritive théorique (-116,45 mOs).

#### B. Evolution du volume du milieu de culture :

La mesure du volume du milieu de culture s'effectue facilement après la séparation des cellules par filtration dans un entonnoir de Büchner. Comme l'indique la figure I-6, le volume du milieu (diagramme clair) diminue régulièrement au cours de la culture, principalement en raison de l'absorption d'eau par les cellules. L'évaporation liée à l'agitation a été mesurée par la perte de poids de flacons ne contenant pas de cellules (diagramme foncé) : elle peut être estimée en moyenne à 0,357 ml par jour et par flacon. Au cours de l'autoclavage, il se produit également une légère perte (1 à 2 %) du volume du milieu.

#### C. Evolution de la composition cationique :

Les concentrations des principaux cations du milieu de culture sont mesurées par photométrie d'émission ( $K^+$  et  $Na^+$ ) ou par absorption atomique ( $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$ ). L'allure générale des courbes représentant l'évolution des concentrations en  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$  est pratiquement la même au cours de la culture (figure I-7). Elle peut être décomposée en plusieurs étapes. Pendant les 4 premiers jours, les concentrations diminuent sensiblement. Elles se stabilisent entre les 4ème et 8ème jours de culture puis s'abaissent à nouveau par la suite. Seule, la concentration de  $Na^+$ , qui est faible dans la solution initiale, ne se modifie pratiquement pas au cours de la culture. Ceci signifie que la consommation du  $Na^+$  est proportionnelle à celle de l'eau.



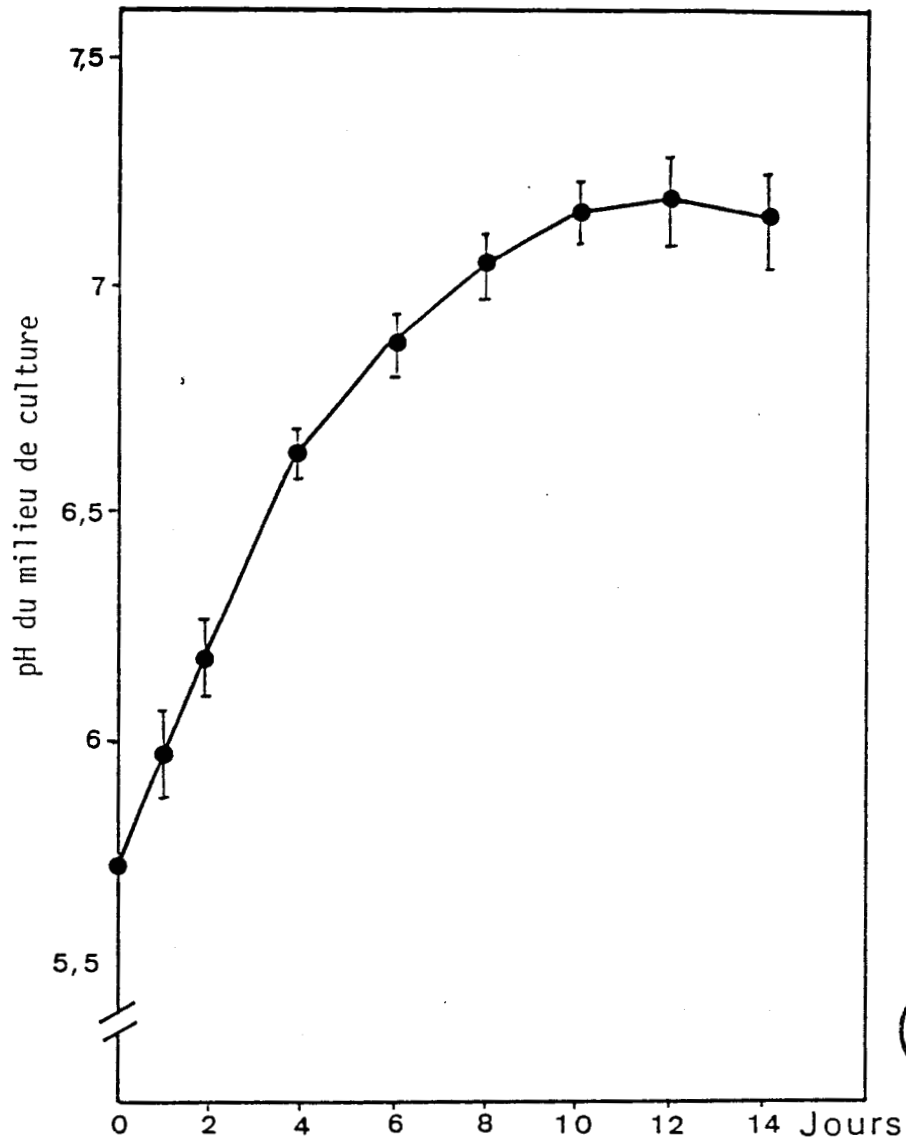


Figure I.8 : Variations du pH du milieu de culture de la suspension cellulaire de silène.

Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5 %, n = 17.

#### D. Evolution du pH :

Les mesures du pH ont été effectuées dans des conditions rigoureusement identiques de manière à disposer d'un paramètre à valeur comparative. Immédiatement après la séparation des cellules par filtration, l'électrode est introduite dans le milieu qui est agité manuellement pendant 30 secondes puis laissé au repos pendant 1 minute. La valeur du pH, devenue stable, est alors notée. Il a été vérifié, indépendamment, que cette valeur n'était pas différente de plus de 0,1 unité de pH de celle obtenue directement dans le milieu de culture contenant les cellules, au moment du débouchage du flacon. La méthode préconisée permet seulement une meilleure stabilisation de la valeur indiquée par l'appareil de mesure.

La courbe représentée sur la figure I-8 a été tracée à partir de 17 séries de mesures effectuées à 25°C. Le pH augmente rapidement (0,25 unité par jour) pendant les 2 premiers jours de culture, puis de moins en moins vite, et se stabilise à 7,2 à partir du 12ème jour. Les écarts calculés par rapport aux valeurs moyennes sont très faibles, ce qui permet de considérer le pH comme un bon paramètre de référence, lorsque les conditions de culture sont bien définies.

En fin de culture, la valeur du pH du milieu reflète la croissance de la suspension cellulaire. En effet, lorsque le pH final se stabilise entre 6,5 et 7, les rendements de croissance sont à chaque fois plus élevés. Pour vérifier cette observation, quelques essais ont été réalisés en maintenant le pH à des valeurs toujours inférieures à la neutralité par addition de quelques gouttes d'HCl 0,01 N au 7ème puis au 10ème jour de culture. L'augmentation de matière fraîche MF qui en résulte est d'environ 20 %.

#### E. Evolution du potentiel osmotique :

La mesure des potentiels osmotiques est effectuée à l'aide d'un microosmomètre Roebing. Une bonne reproductibilité des mesures exige le calibrage fréquent de l'appareil avec une solution étalon de KCl (-300 mOs). Les valeurs de l'osmolarité des milieux de culture représentent directement celles de leurs potentiels osmotiques .

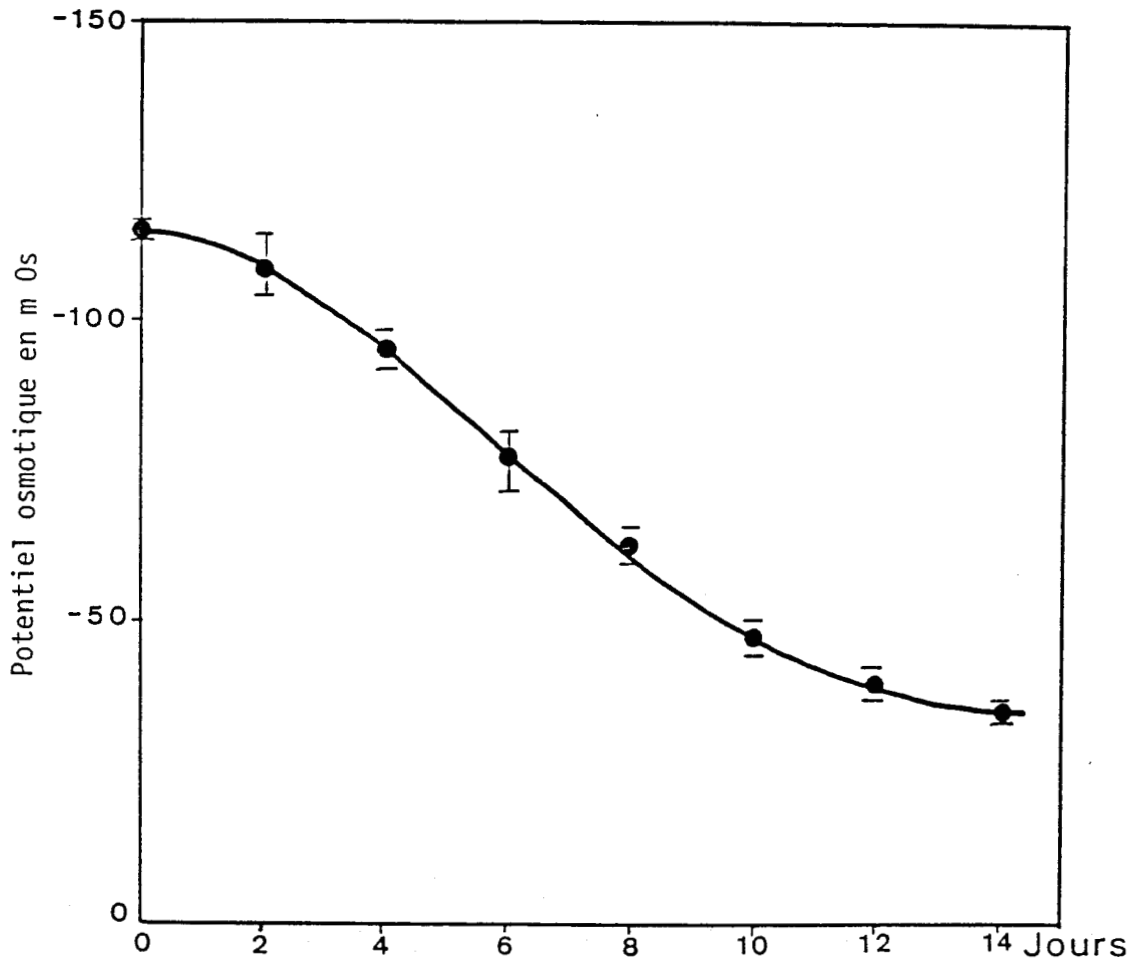


Figure I.9 : Variations du potentiel osmotique du milieu (mOs) de culture de la suspension cellulaire de silène.

Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5 %, n = 12.



Au cours de la culture, le potentiel osmotique du milieu diminue régulièrement (figure I-9) pour atteindre le tiers de sa valeur initiale à la fin du cycle de culture. Cette variation s'explique, en partie, par la disparition du saccharose qui participait pour 50 % à l'osmolarité du milieu au moment du repiquage des cellules. Le potentiel osmotique final dépend alors principalement des éléments minéraux, notamment du potassium.

Le potentiel osmotique a également été mesuré après perturbation des conditions de culture dans le but d'augmenter ou de diminuer la croissance (tableau I-13). Les valeurs mesurées varient à chaque fois en sens inverse de celles de la M.F. des cellules. La relation croissance-potentiel osmotique permet de considérer ce paramètre, au même titre que le pH, comme une référence externe du métabolisme cellulaire.

## 2 ) ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES COMPOSÉS ORGANIQUES.

Le saccharose est le principal composé organique introduit dans la solution nutritive. Il est très rapidement hydrolysé en glucose et fructose qui sont progressivement consommés par les cellules (BRASSART et al., 1977). Le dosage des oses totaux et réducteurs au cours de la culture permet de suivre quantitativement les variations de ces composés dans le milieu.

Le tamisage moléculaire est un moyen pour séparer les constituants du milieu de culture notamment en fonction de leur poids moléculaire. Cette technique permet de suivre directement la disparition et l'apparition de composés dans le milieu. Les produits, sortant dans le volume mort de la colonne, sont ensuite séparés par une précipitation à l'éthanol absolu puis pesés.

Ces données complètent la description des événements chimiques à l'extérieur des cellules lorsqu'elles sont cultivées dans les conditions standardisées qui ont été définies préalablement.

TABLEAU I-13 : Variations des potentiels osmotiques mesurés en fin de culture (14 jours), suite à des modifications provoquant des perturbations de la croissance de la suspension cellulaire de silène.

Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5%, n est indiqué entre parenthèses.

Conditions de culture	Croissance (MF en g)	Potentiel osmotique (mOs)
Témoin	34,7 ± 2,8 (6)	- 35 ± 2
<u>Teneur en saccharose</u>		
0 g l <sup>-1</sup>	1,7 ± 0,2 (3)	-117
40 g l <sup>-1</sup>	53,5 ± 3,5 (6)	- 75 ± 4 (*)
<u>Facteurs de croissance</u>		
+ A.G.3 0,1 mg l <sup>-1</sup>	48,5 ± 2,1 (6)	- 30 ± 6
+ AM01618 0,2 mg l <sup>-1</sup>	12,5 ± 2,0 (4)	- 75 ± 5
+ m-inositol 0,2 g l <sup>-1</sup>	41,5 ± 3,2 (4)	- 32 ± 5
<u>Facteurs physiques</u>		
température 10°C	6,8 ± 3,4 (6)	- 84 ± 7

(\*) le potentiel osmotique initial est alors de - 175 mOs, contre - 115 mOs dans tous les autres cas.



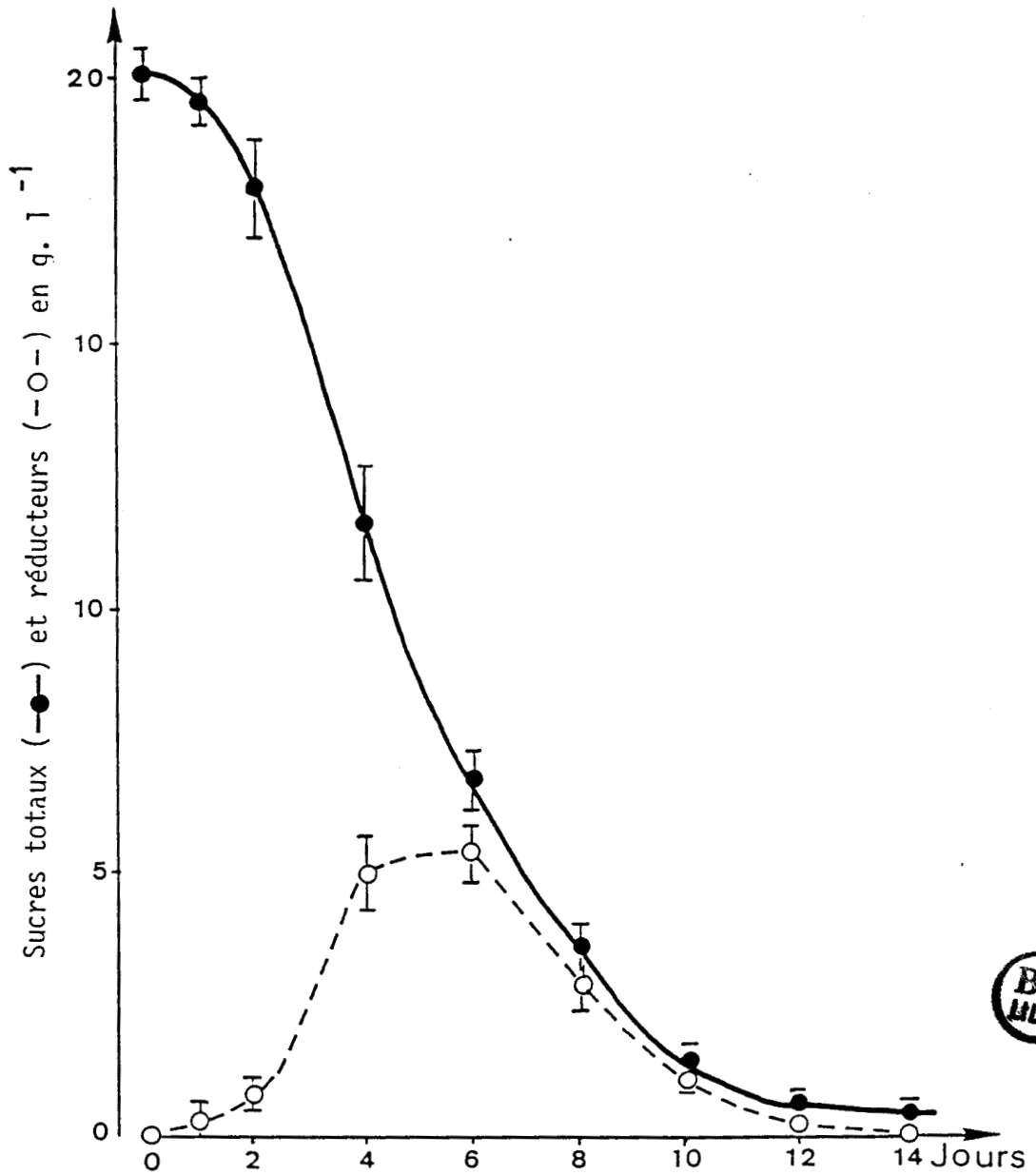


Figure I.10 : Variations des saccharides totaux et réducteurs dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de silène.

- ( ● ) saccharides totaux (orcinol) en g.l<sup>-1</sup> ;
- ( O ) saccharides réducteurs en g.l<sup>-1</sup>.

Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5 %, 5 n 12.

A ) Mesure de la consommation des saccharides par les cellules :

La consommation du saccharose ou plus précisément du glucose et du fructose provenant de sa dégradation en présence des cellules, peut être mesurée par un dosage global à l'aide de la méthode à l'orcinol sulfurique de TILLMANS et PHILIPPI (1929) modifiée par RIMINGTON (1931) et simultanément par celui des saccharides réducteurs par la méthode de NELSON (1944).

L'hydrolyse du saccharose est rapide puisque des saccharides réducteurs sont décelables dès le 1er jour (figure I-10), leur concentration augmente jusqu'au 6ème jour et ils représentent la totalité des saccharides disponibles dès le 8ème jour. Globalement le milieu se trouve complètement épuisé au 12ème jour de culture ce qui provoque le ralentissement de la croissance. Ces résultats peuvent être confirmés par chromatographie sur couche fine. Tous les jours, 10 µl de milieu filtré sont déposés sur la ligne de base du chromatogramme en présence de témoins (saccharose, glucose et fructose). Après 4 h de migration ascendante dans le solvant éthanol, butanol, acide acétique, eau, pyridine (100/10/3/30/10), les chromatogrammes sont séchés. Les produits sont révélés par vaporisation d'une solution d'orcinol sulfurique. La coloration est développée pendant 5 min dans une étuve à 110°C. Pendant que le saccharose et ses dérivés sont consommés par les cellules, il apparaît dès le début de la culture d'autres composés saccharidiques qui ne sont pas entraînés par le solvant utilisé, probablement en raison de leur poids moléculaire élevé.

B ) Tamisage moléculaire du milieu :

Pour affiner les résultats acquis précédemment, la séparation des composés en solution dans le milieu de culture a été entreprise au moyen d'un tamisage moléculaire sur un gel de Sephadex G 25 élué par de l'eau distillée, pH 5,5. En sortie de colonne, le profil d'élution est suivi par une cellule spectrophotométrique à 265 nm et l'éluat est recueilli sous forme de fractions successives de 10 ml.

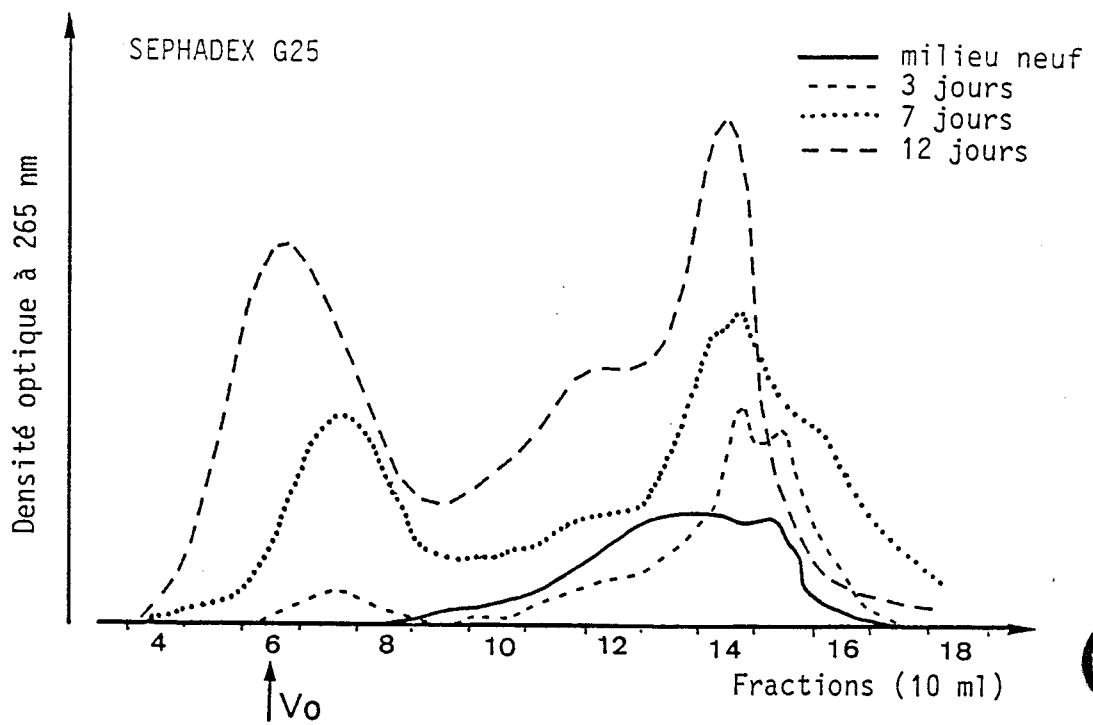


Figure I.11 : Profils d'élution des milieux de culture de la suspension cellulaire de silène, après tamisage moléculaire sur un gel Séphadex G 25, élution H<sub>2</sub>O. Lecture à 265 nm.





Le profil d'élution à 265 nm du milieu avant le repiquage, comparé à celui obtenu après 3 jours de culture, donne une image de la consommation des constituants initiaux du milieu nutritif (figure I-11). Cependant, un petit pic réagissant à la fois au dosage à l'orcinoïl et à celui au carbazol commence à apparaître dans la fraction N°7 ; il s'agit donc d'un polymère de nature polysaccharidique comprenant en mélange des radicaux neutres et acides. Par la suite, ce pic va s'accroître progressivement en amplitude et se déplacer jusqu'à la cinquième fraction, c'est à dire dans le volume mort de la colonne (déterminé avec du Bleu Dextran à 2 %). Par ailleurs, les fractions intermédiaires augmentent et un épaulement apparaît dans la fraction N°9. Enfin, il se développe au niveau de la fraction N°13, un pic important dont les constituants répondent positivement aux réactifs caractéristiques des saccharides et des protéines.

La chromatographie sur couche fine de toutes les fractions d'élution permet de confirmer qualitativement, que les fractions lourdes (N°5 à 8) contiennent exclusivement des polysaccharides qui ne sont pas déplacés par le solvant utilisé. Les fractions intermédiaires (N°9 à 11) comprennent à la fois du saccharose, initialement introduit dans la solution nutritive et qui a tendance à disparaître, et de faibles quantités d'oligomères à caractère acide. Dans les fractions plus légères (N°12 à 14), les quantités de monosaccharides neutres et acides sont insuffisantes pour expliquer l'amplitude de l'absorbance à 265 nm. Il pourrait s'agir de composés phénoliques en raison de la coloration jaune que présentent ces fractions.

#### C) Extraction et estimation globale des polymères :

Après que leur présence dans le milieu de culture ait été démontrée, et ce dès les premiers jours après l'ensemencement, l'extraction globale des polysaccharides a été réalisée. Des aliquotes de 20 ml de milieu sont reprises par 6 vol. d'éthanol absolu. Après une nuit à 4°C, le précipité est recueilli par centrifugation, redissous dans 5 ml d'eau, congelé puis lyophilisé. La pesée des poudres ainsi obtenues permet de quantifier l'excrétion des polymères en terme de concentrations dans le milieu de culture (tableau I-14). Elle est comparée à la masse sèche totale des composés en solution dans le milieu, déterminée par la même méthode (congélation, lyophilisation et pesée). En fin de culture, les polymères représentent pratiquement 60% de l'ensemble des composés

TABLEAU I-14 : Evolution des polymères solubles extracellulaires  
au cours de la culture des suspensions cellulaires  
de silène.

Après précipitation par l'éthanol, la concentration des polymères  
est exprimée en g par flacon et par rapport à la masse du résidu  
sec du milieu de culture.

Jours de culture	Précipité éthanol g par flacon	<u>Précipité éthanol</u> .100 résidu sec du milieu
2	0,031	0,6
4	0,044	0,9
6	0,079	2,5
8	0,122	5,0
10	0,200	15,1
12	0,261	37,0
14	0,293	59,0



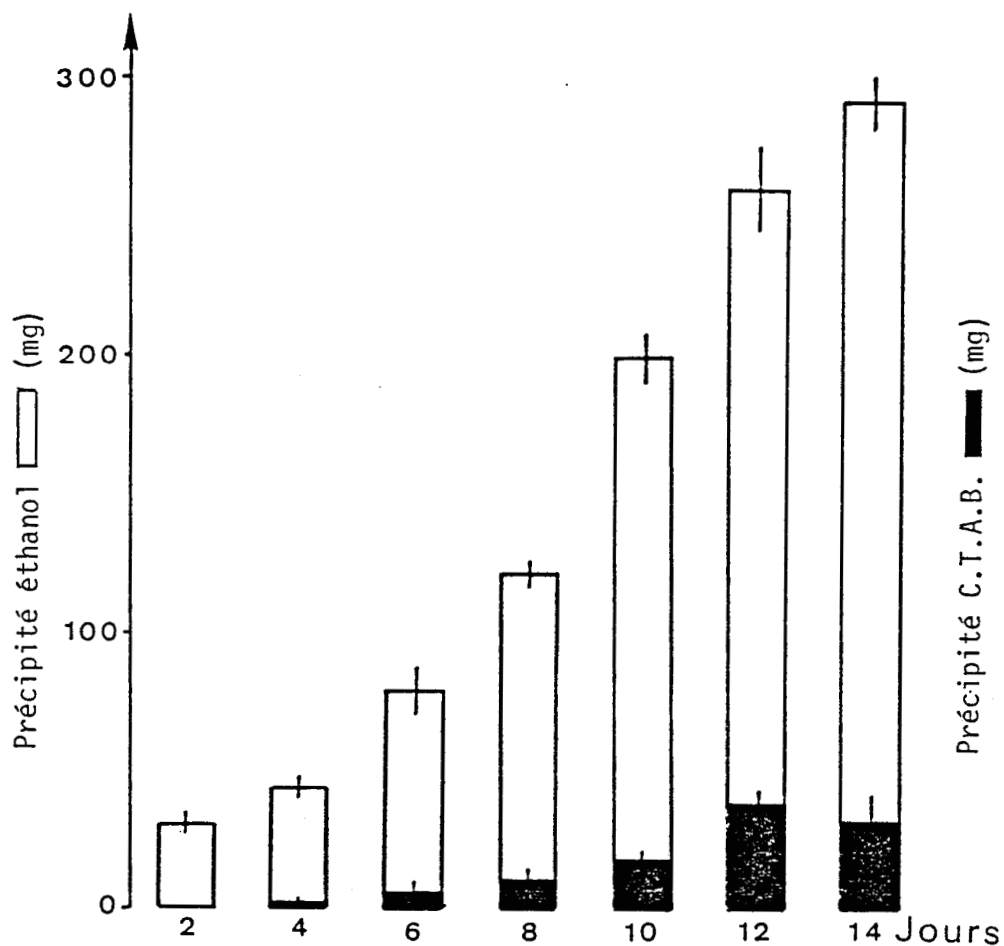


Figure I.12 : Répartition des différentes catégories de polysaccharides libérés dans le milieu de culture par les suspensions cellulaires de silène.

□ : précipité par l'éthanol (6 vol.) : polymères totaux en mg/flacon

■ : précipité par le C.T.A.B. (1 vol.) : P.P.A. en mg/flacon.

Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5 %, n = 6.

solubles. En outre, les dosages à l'orcinol et au carbazol indiquent la forte prédominance des saccharides neutres par rapport aux saccharides acides.

Pour séparer sélectivement les polymères acides (fiche technique N° 6), des aliquotes de 20 ml de milieu sont mélangés à une quantité égale de C.T.A.B. à 3 % (bromure de N, cétylammonium N,N,N, triméthylammonium). Ce sel d'ammonium quaternaire, encore appelé "cetavlon", est capable de s'associer aux composés polyanioniques et de les précipiter à basse température (SCOTT, 1965). La mesure de leur masse sèche permet de les comparer à la fraction totale extraite précédemment (figure I-12). Les polymères acides ne représentent en fait qu'une faible proportion de l'ensemble des polymères excrétés (entre 15 et 20 % en fin de culture). Néanmoins, leur caractère polyanionique, révélé par le procédé de précipitation sélective utilisé, est à l'origine de l'intérêt qu'ils suscitent à propos des échanges cellulaires.

Ces considérations, appuyées par les arguments ultrastructuraux présentés préalablement, permettent de supposer qu'une large proportion de ces composés est assimilable à des pectines, raison qui justifie leur appellation de polymères pectiques acides (MORVAN, 1982). Leur caractérisation biochimique et physico-chimique est nécessaire pour confirmer leur origine et tenter de comprendre les rôles qui leur seront attribués.

## ETUDE DES P.P.A. EXTRACELLULAIRES

L'analyse des composés polyanioniques présents dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de silène est indispensable pour confirmer leur origine pariétale, pour comprendre et expliquer leur rejet. L'étude de leurs propriétés physico-chimiques doit permettre de préciser leur rôle ou plus exactement de mesurer les conséquences de leur présence dans le milieu de culture, sur la croissance des cellules qui les excrètent.

### I DEFINITION DES P.P.A. ET SIGNIFICATION PHYSIOLOGIQUE DE LEUR EXCRETION.

La première étape de toute étude biochimique consiste à définir les produits qui doivent être analysés. Les milieux nutritifs utilisés pour la culture des suspensions cellulaires sont, au départ, des mélanges de sels minéraux auxquels sont additionnés différents composés organiques (saccharose, vitamines, substances de croissance). Au cours de la culture, les cellules absorbent une partie des composés initialement contenus dans la solution extérieure et elles y rejettent des substances de nature très diverse, y compris des polysaccharides. Pour recueillir les polymères extracellulaires, il faut isoler le milieu de culture puis en extraire sélectivement les différentes fractions à étudier. Quelles que soient les méthodes préparatives utilisées (filtrations, centrifugations, dialyses ou précipitations), certaines parties se trouvent fatalement éliminées. Leur contenu doit cependant être contrôlé de manière à exploiter, en toute sécurité, les renseignements fournis par les résultats de l'analyse des composés étudiés.

## 1. Définition des polymères pectiques acides (P.P.A.),

Les cellules et le milieu de culture sont séparés par filtration avant d'isoler les P.P.A.. Le caractère soluble de ces derniers est donc le premier élément de leur définition. Les méthodes de précipitations sélectives, la mesure et l'identification des acides uroniques et des monosaccharides neutres puis la confirmation cytochimique de leur liaison avec les parois sont les étapes suivantes qui conduisent, tout en la justifiant, à leur appellation de polymères pectiques acides.

### A. Précipitations sélectives :

Selon SCOTT (1965), le C.T.A.B. peut être utilisé pour précipiter les polymères chargés négativement, notamment les polysaccharides acides. L'efficacité du procédé dépend du pH auquel s'effectue la réaction, de la nature et de la quantité des sels présents. La concentration finale en C.T.A.B., le pH et la teneur en sels du milieu ont été modifiés avant la précipitation. La masse sèche de précipité recueilli et sa teneur en acides uroniques varient (tableau II-1). Lorsque la concentration finale en C.T.A.B. est supérieure à 1 %, les masses sèches des précipités et les teneurs en acides uroniques sont constantes. Dans la gamme de pH employée, les valeurs dépassant pH 8 provoquent une augmentation sensible des quantités précipitées et une diminution de la proportion des acides uroniques. En fait, leur quantité absolue n'est pas modifiée mais les pH basiques provoquent la précipitation d'un excédent de polymères neutres. La dilution du contenu en sels d'un milieu de culture, obtenue par une dialyse partielle (1 et 3 heures), provoque une légère baisse des M.S. des précipités et des acides uroniques qu'ils contiennent. Une augmentation de la concentration saline peut être obtenue par l'addition d'un volume égal de la solution minérale de départ, concentrée 2 ou 3 fois. Ces modifications n'affectent ni les masses des précipités, ni leur contenu en acides uroniques. Ces vérifications valident les conditions dans lesquelles la méthode de précipitation par le C.T.A.B. a été utilisée (voir fiche technique N° 6). En effet, dans la mesure où le pH des milieux de culture n'évolue qu'entre des valeurs comprises entre 5,7 et 7,2, il n'est pas nécessaire d'ajuster le pH avant d'introduire le C.T.A.B..

Tableau II.1 : Influence de la concentration du C.T.A.B., du pH et de la teneur en sels sur le rendement de précipitation des P.P.A. et sur leur teneur en acides uroniques.

Conditions de précipitation par le C.T.A.B.	Précipité Masse sèche mg.l <sup>-1</sup>	Acides uroniques mg.l <sup>-1</sup>
<b>A. Effet de la concentration en C.T.A.B. (pH 7)</b>		
0,5%	187 <sub>±</sub> 13	140 <sub>±</sub> 13
1,0%	228 <sub>±</sub> 16	146 <sub>±</sub> 6
1,5%	235 <sub>±</sub> 14	152 <sub>±</sub> 5
2,0%	241 <sub>±</sub> 14	148 <sub>±</sub> 5
2,5%	237 <sub>±</sub> 19	155 <sub>±</sub> 9
<b>B. Effet du pH (C.T.A.B. 1,5%)</b>		
pH 4	241 <sub>±</sub> 14	158 <sub>±</sub> 6
pH 5	238 <sub>±</sub> 12	157 <sub>±</sub> 6
pH 6	240 <sub>±</sub> 16	155 <sub>±</sub> 6
pH 7	235 <sub>±</sub> 14	152 <sub>±</sub> 5
pH 8	374 <sub>±</sub> 27	150 <sub>±</sub> 7
pH 9	394 <sub>±</sub> 33	142 <sub>±</sub> 8
<b>C. Effet de la teneur en sels (C.T.A.B. 1,5% . pH 7)</b>		
Après dialyse		
1 heure	215 <sub>±</sub> 12	132 <sub>±</sub> 5
3 heures	208 <sub>±</sub> 14	130 <sub>±</sub> 4
Après augmentation des sels		
X2	238 <sub>±</sub> 15	152 <sub>±</sub> 7
X3	230 <sub>±</sub> 17	150 <sub>±</sub> 8



La réduction des milieux de culture est effectuée par évaporation sous vide, avant la précipitation par le C.T.A.B.. Cette préparation permet de traiter des volumes importants et de disposer finalement de plus grandes quantités de P.P.A.. Parfois, il se produit une agrégation des polymères, favorisée par la rotation du ballon d'extraction. Un phénomène analogue intervient naturellement dans les flacons de culture lorsque la concentration en polymères dissous devient très importante. Si le fait est négligé, il en résulte des difficultés ultérieures pour resolubiliser l'ensemble du précipité, en particulier après lyophilisation.

#### B) Dosage des acides uroniques :

Il existe de nombreuses méthodes pour mesurer la quantité d'acides uroniques contenus dans les polymères végétaux. Celle qui utilise le carbazole (dibenzopyrrole) comme produit susceptible de se condenser sur les dérivés furfural formés en milieu acide et à chaud, a été décrite initialement par DISCHE (1947) puis modifiée (BITTER et MUIR, 1962 ; GALAMBOS, 1967). Les absorbances molaires varient avec la nature de l'acide uronique ; l'acide D-galacturonique présentant la coloration la plus intense. C'est la raison pour laquelle le choix s'est fixé sur la première méthode proposée. Il est généralement admis que les pentoses et leurs dérivés ne réagissent pas avec le carbazole. Par contre les hexoses offrent une absorbance non négligeable et l'interférence qu'ils risquent de provoquer lorsqu'ils se trouvent en mélange avec les acides uroniques doit être corrigée en appliquant la formule proposée par MONTREUIL et al(1981). Pour éviter ces difficultés, BLUMENKRANTZ et ASBOE-HANSEN (1973) ont utilisé le méta-hydroxydiphényle comme réactif et montré l'absence d'interférence des monosaccharides neutres, même lorsque leur concentration est dix fois plus élevée que celle des acides uroniques. Plus récemment, SCOTT (1979) a fait appel à la sélectivité du 3,5 diméthyl-phénol (3,5 D.M.P.) pour les chromogènes formés en présence d'acide sulfurique à chaud. L'addition d'ions  $\text{Cl}^-$  permet d'éliminer la majeure partie des interférences dues aux monosaccharides neutres. Les méthodes de dosage par le carbazole (avec ou sans correction), le 3,5 D.M.P. et le méta-hydroxydiphényle ont été comparées (tableau II-2). La correction des valeurs obtenues par le dosage au carbazole les rapproche de celles acquises à l'aide des deux autres méthodes, considérées comme insensibles aux interférences.



Tableau II.2 : Comparaison des résultats de dosage des acides uroniques entre les méthodes de DISCHE au carbazol, avec ou sans correction, de SCOTT au 3,5-diméthylphénol (3,5-DMP) et de BLUMENKRANTZ et ASBOE-HANSEN au meta hydroxydiphényl.

Les deux échantillons ont été testés chacun 3 fois et les résultats sont les moyennes exprimées en  $\text{mg.l}^{-1}$  d'équivalent d'acide galacturonique

P.P.A	10 jours	14 jours
Dosage au carbazol sans correction	105,92	135,61
avec correction	92,41	115,30
Dosage au 3.5 DMP	85,04	108,68
Dosage au m-diphényl	90,61	114,40



C) Mise en évidence cytochimique :

Les méthodes cytochimiques permettent une visualisation de l'ultrastructure pariétale en microscopie électronique (voir chapitre I). Elles révèlent également les différentes formes sous lesquelles certains des éléments qui la composent sont excrétés dans le milieu de culture. Pour enrichir en polymères solubles le milieu extérieur, au voisinage des cellules, la filtration est réalisée sans dépression par le vide. Dans ces conditions, les parois des cellules les plus excentrées dans les amas sont tapissées d'une véritable gangue polysaccharidique (figure II-1). Un réseau analogue à celui observé dans les espaces intercellulaires se répartit autour des cellules sur une épaisseur de 1 à quelques micromètres. Il est nettement plus dense que celui qui subsiste habituellement autour des cellules après leur séparation du milieu de culture. Bien que la technique utilisée pour contraster les polysaccharides ne soit pas très spécifique, le résultat obtenu constitue une mise en évidence directe du réseau extracellulaire. Il n'est pas abusif de considérer que la majeure partie de ces composés sont recueillis dans le filtrat quand la séparation s'effectue sous vide.

2. Relation entre l'excrétion des P.P.A. et la croissance de la suspension cellulaire.

L'évaluation périodique des P.P.A. présents dans le milieu de culture est le moyen d'examiner la relation entre l'excrétion de ces composés et la croissance de la suspension qui en est responsable. Il s'agit de comprendre à quels aspects du métabolisme le phénomène observé peut être attribué.

A) Variation quantitative des P.P.A. au cours de la culture :

Pour évaluer la quantité de P.P.A. excrétés au cours de la culture, les contenus de plusieurs flacons sont prélevés périodiquement pour séparer le milieu et les cellules. Chaque résultat représente donc une mesure instantanée du paramètre étudié qui est indépendante de la précédente comme de la suivante. Lorsque la variation des quantités de P.P.A. présents dans le milieu est représentée en fonction de la durée de la culture, il ne s'agit pas d'une évolution continue et le terme de cinétique d'excrétion ne s'applique pas au phénomène décrit.

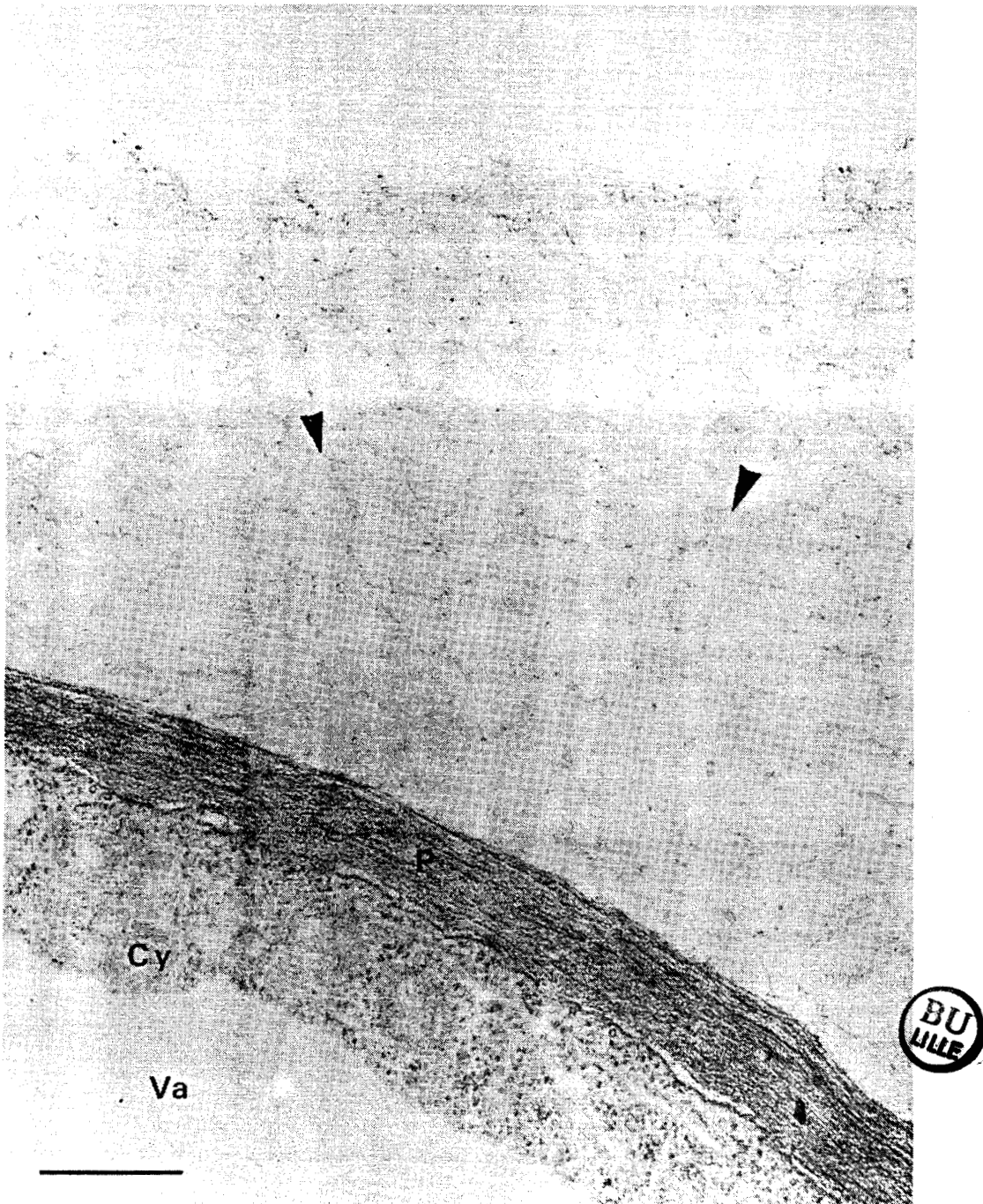


Figure II - 1 : Aspect des polymères extracellulaires (▲) autour des cellules après 24 h de culture.

Contrastant : Acétate d'uranyle et citrate de plomb.

x 42 000 - échelle 0,5  $\mu$ m

Abréviations : Va, vacuole ; Cy, cytoplasme ; P, paroi.

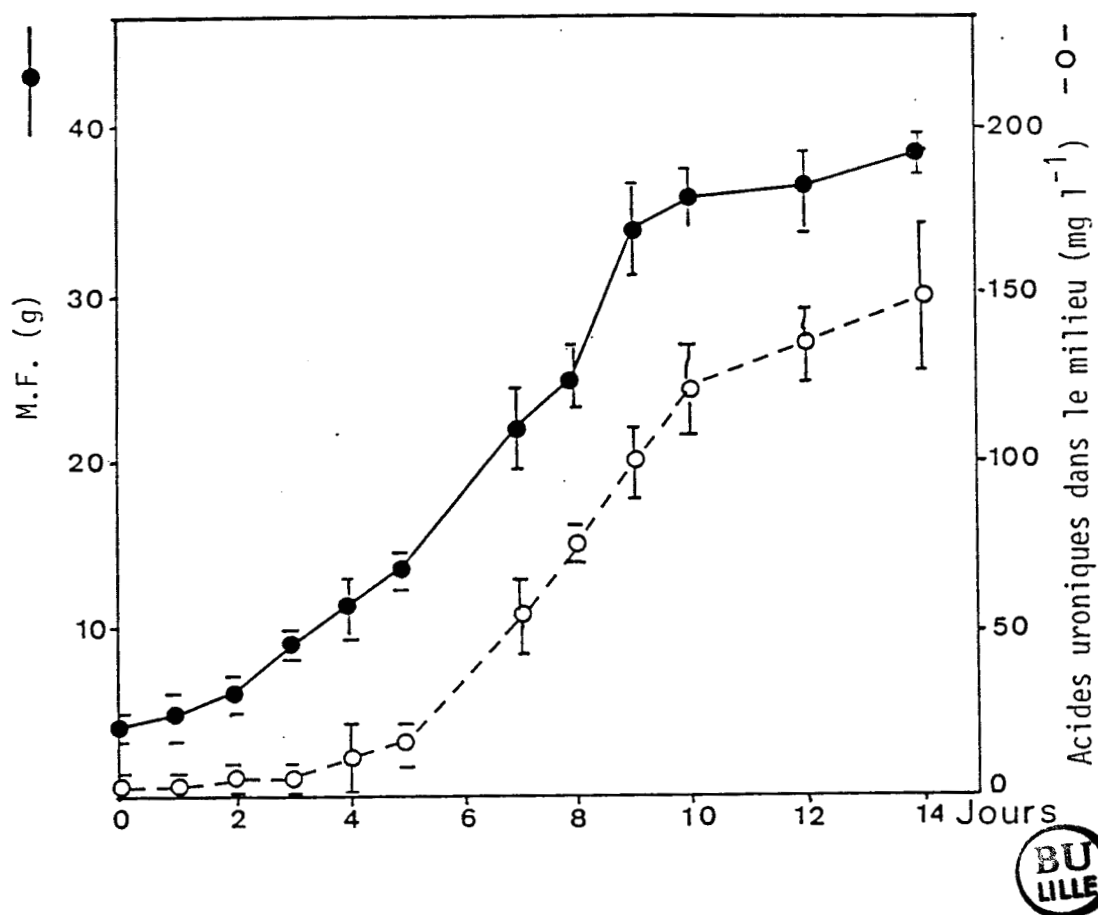


Figure II.2 : Variations des acides uroniques excrétés dans le milieu de culture pendant la croissance de la suspension cellulaire de silène.

Les acides uroniques, mesurés par la méthode au carbazol sulfurique de DISCHE (1947), sont ceux qui sont compris dans les P.P.A. extraits au C.T.A.B. Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5 %, n = 6.



Après la filtration du milieu de culture, les P.P.A. sont isolés par précipitation sélective. Une évaluation des P.P.A. peut être obtenue en mesurant les quantités d'acides uroniques qu'ils contiennent. Exprimés par rapport à l'unité de volume du milieu, les résultats apparaissent sous forme de concentrations et leurs variations au cours de la culture, comparées à celles de la biomasse (figure II-2), permettent de constater le parallélisme entre l'excrétion des P.P.A. et la croissance cellulaire. D'autre part, Les poudres obtenues après lyophilisation sont pesées et les valeurs sont rapportées à la M.S. des cellules ou à celle des parois isolées. Les rendements d'excrétion augmentent régulièrement au cours de la culture et atteignent leur niveau optimal au 12ème jour (tableau II-3). Cet ensemble de résultats montre que l'excrétion des P.P.A. évolue dans le même sens que la croissance. Dans ces conditions, il est possible de postuler que le phénomène observé correspond à l'expression des remaniements intervenant dans la paroi, notamment lors du grandissement cellulaire.

#### B) Influence de variations de la croissance sur l'excrétion des P.P.A.:

Pour démontrer que la présence des P.P.A. dans les milieux de culture n'est pas due à une érosion mécanique des parois, provoquée par l'agitation imposée à la suspension cellulaire, celle-ci a été soumise à des traitements destinés à ralentir la croissance ou même à sacrifier les cellules. A basse température (10°C), la croissance diminue très nettement et simultanément l'excrétion des P.P.A. dans le milieu de culture est très faible (figure II-3). Les cellules ne sont pas détruites par un tel traitement. Après deux cycles de culture à 10°C, elles sont à nouveau soumises à la température habituelle de 25°C et recouvrent une croissance équivalente à celle qui était la leur à l'origine. L'excrétion des P.P.A. subit donc la même évolution que celle de la croissance, selon le régime de température auquel sont soumises les cellules. L'emploi de poisons métaboliques tels que le cyanure ou le 2,4-DNP, la suppression du saccharose ou l'addition de certains P.P.A. (voir chapitre suivant) conduisent à l'arrêt immédiat de la croissance (tableau II-4) et aboutissent à la destruction irréversible des structures et à la lyse d'une forte proportion des cellules. Dans ces conditions, les quantités d'acides uroniques mesurés dans les milieux de culture sont infimes, ce qui indique que les processus qui sont à l'origine de leur excrétion ont été bloqués ou détruits.

Tableau II.3 : Excrétion des P.P.A. dans le milieu, au cours de la culture de la suspension cellulaire de silène.

Les masses des précipités par le C.T.A.B. sont mesurées après lyophilisation. Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5 %, n = 6.

Durée de Culture (jours)	POLYMERES PECTIQUES ACIDES		
	mg.l <sup>-1</sup>	mg/flacon	/ M.S. (%)
2	2,0 ± 1,0	0,4 ± 0,2	0,21
4	11,4 ± 2,1	2,2 ± 0,4	0,66
6	33,4 ± 4,9	6,2 ± 0,9	0,92
8	62,2 ± 3,4	11,2 ± 0,6	1,08
10	107,0 ± 8,7	18,4 ± 1,5	1,19
12	236,8 ± 14,7	38,2 ± 2,4	1,96
14	207,7 ± 16,0	32,4 ± 2,5	1,94



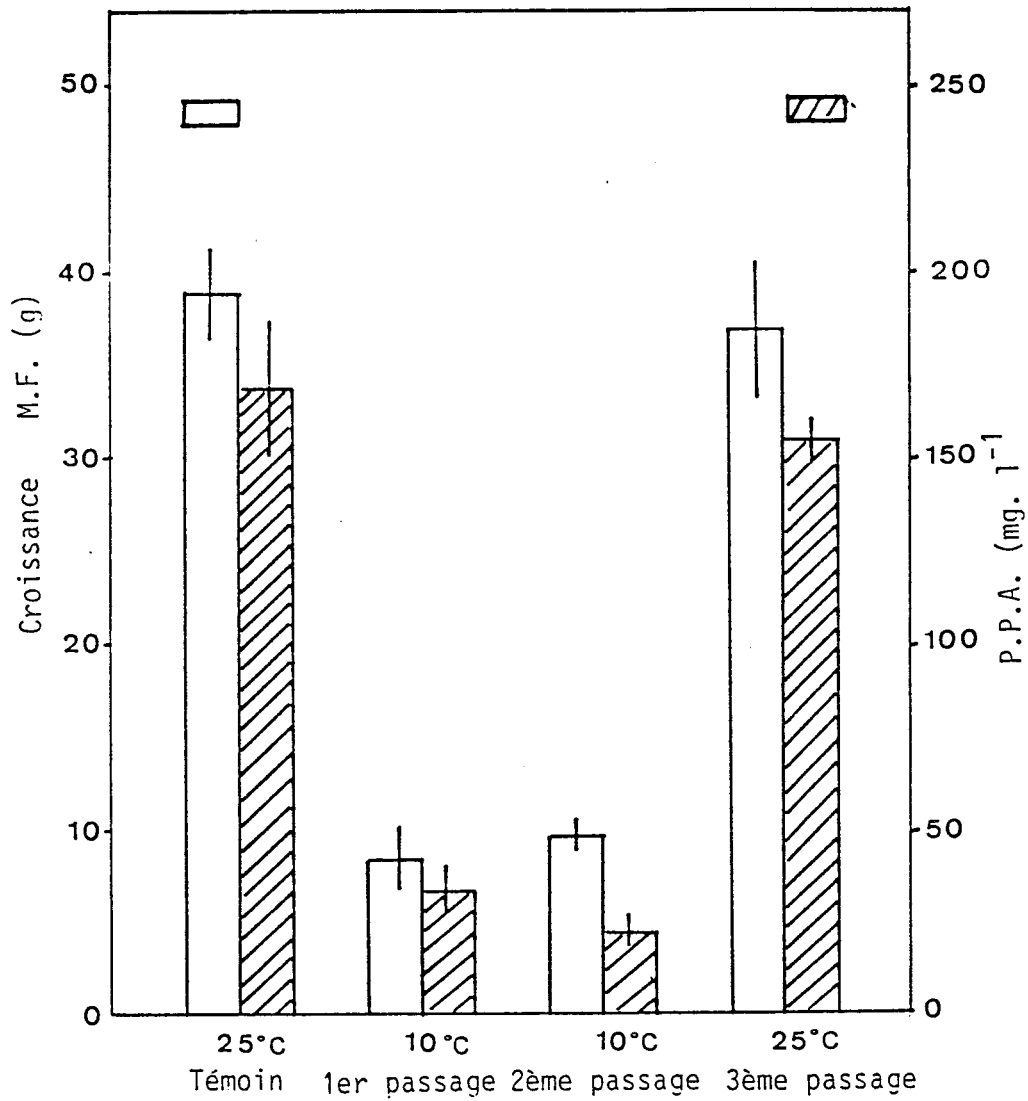


Figure II.3 : Effets des basses températures sur la croissance de la suspension cellulaire de silène et sur l'excrétion de P.P.A. dans le milieu de culture.



Tableau II.4 : Influence de traitements activateurs ou inhibiteurs sur la croissance de la suspension cellulaire de silène et sur l'excrétion de P.P.A. dans le milieu après 14 jours de culture.

Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5 %, n étant indiqué entre parenthèses.

Conditions	Croissance M.F.(g)	Excrétion P.P.A.(mg. <sup>-1</sup> )
Témoin	38,4 ± 4,3 (10)	150 ± 20 (20)
Saccharose 40 g.l <sup>-1</sup>	51,8 ± 3,4 (11)	336 ± 13 (18)
AG <sub>3</sub> 0,1 mg.l <sup>-1</sup> (début de culture)	49,8 ± 4,9 ( 6)	198 ± 18 (12)
AG <sub>3</sub> 0,1 mg.l <sup>-1</sup> (fin de culture)	51,2 ± 2,8 ( 3)	197 ± 12 ( 6)
Sans saccharose	1,1 ± 0,2 ( 5)	5 ± 1 (20)
2,4 DNP 0,2 mg.l <sup>-1</sup>	2,0 ± 0,5 ( 6)	14 ± 3 (12)
CNK 0,2 mg.l <sup>-1</sup>	2,2 ± 0,8 ( 6)	8 ± 2 (12)
AMO <sub>1618</sub> 0,2 mg.l <sup>-1</sup>	8,7 ± 1,1 ( 6)	51 ± 6 (12)





Inversement, la croissance des suspensions cellulaires peut être stimulée par différents moyens notamment en augmentant la quantité initiale de saccharose dans le milieu de culture ou en additionnant des facteurs de croissance tels que l'acide gibbérellique auquel les cellules de silène sont particulièrement sensibles (tableau II-4). Les traitements qui stimulent la croissance des cellules provoquent également l'augmentation de l'excrétion des P.P.A.. L'action de l'AG<sub>3</sub> est particulièrement significative car son introduction dans le milieu de culture après 7 jours de culture aboutit à une stimulation immédiate de l'excrétion des P.P.A. sans que le nombre de cellules, compté en fin de culture, ne soit sensiblement supérieur à celui des témoins. Par contre, en présence d'AMO<sub>1618</sub>, substance considérée comme une anti-gibberelline, il se produit une diminution significative de la croissance des cellules et de l'excrétion des P.P.A., ce qui concorde avec les résultats précédents.

Ces expériences d'inhibition et de stimulation de la croissance cellulaire fournissent des résultats qui confirment l'hypothèse selon laquelle l'excrétion des P.P.A. est un phénomène actif, témoin de l'expression du métabolisme pariétal, notamment à l'occasion du grandissement cellulaire.

## II ETUDE BIOCHIMIQUE DES POLYSACCHARIDES EXTRACELLULAIRES

L'objectif des travaux consacrés à la composition des polysaccharides extracellulaires et en particulier à celle des P.P.A. est double. En premier lieu, il s'agit de comparer les familles de macromolécules rejetées dans le milieu avec celles qui constituent la phase matricielle des parois isolées. La connaissance de la composition en monosaccharides des fractions qui seront utilisées pour les essais biologiques est indispensable pour ébaucher des interprétations à propos de leur mode d'action.

### 1. Analyse de la composition globale en monosaccharides .

La première étape de toute étude de structure des polysaccharides consiste à les décomposer en monomères par des hydrolyses chimiques et enzymatiques. Les oses neutres qui sont libérés peuvent être analysés par chromatographie en phase gazeuse après avoir été réduits et acétylés. Les acides uroniques doivent être préalablement lactonisés avant de subir les traitements précédents. Les différences entre les deux séries d'analyses permettent l'identification des acides uroniques et leur évaluation quantitative. Cette démarche est inspirée de celle mise au point par JONES et ALBERSHEIM (1972) pour l'analyse des composés pariétaux extraits de la suspension cellulaire d'érable.

#### A) Choix des méthodes d'hydrolyse :

L'efficacité des hydrolyses chimiques par les acides dépend des liaisons glycosidiques qui relient les monomères. Les polygalacturonanes qui constituent l'architecture des pectines sont particulièrement résistants ; seul l'acide fluorhydrique est signalé comme parvenant à détruire complètement les liaisons galacturonosyles (LAMPFORT, 1970) mais son emploi est délicat et des pertes importantes sont enregistrées, notamment au niveau des pentoses. Des essais ont été réalisés avec l'acide trifluoroacétique (A.T.F.A.) et l'acide sulfurique, à différentes concentrations et pendant des durées d'action variables, selon les protocoles généralement préconisés pour ces catégories de molécules (fiche technique N° 7).

Tableau II.5 : Comparaison entre différentes méthodes d'hydrolyse chimique

	Rendement : $\frac{\sum \text{oses (C.P.G.) après hydrolyse}}{\sum \text{oses (Orcinol) sans hydrolyse}}$	
	Polymères totaux	P.P.A
ATFA 4N, 4H	45,2 %	24,8 %
ATFA 2N, 2H	53,4 %	18,8 %
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1N 1H	42,1 %	15,5 %



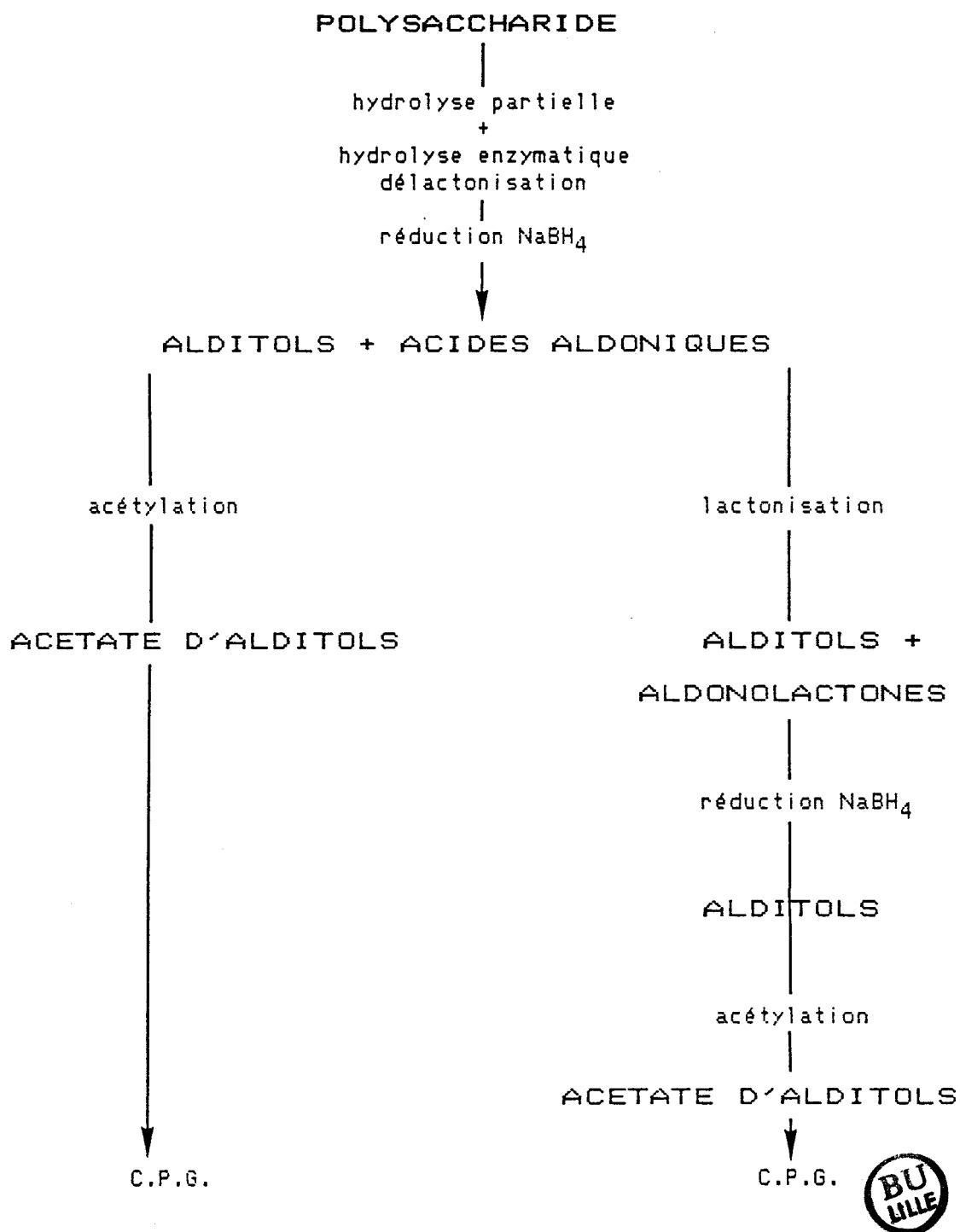


Figure II.4 : Protocole d'hydrolyses des polymères et de préparation des acétates d'alditol pour l'analyse des monosaccharides par chromatographie en phase gazeuse.



Les résultats des rendements enregistrés consignés dans le tableau II-5, montrent que l'hydrolyse par l'A.T.F.A. 4N pendant 4 h est la plus efficace sur les P.P.A. sans dépasser 25 % en masse. Les polysaccharides totaux semblent plus sensibles à l'action de l'A.T.F.A. 2N pendant 2 h qui produit un peu plus de 50 % de rendement. Si les durées sont prolongées, il se produit généralement une diminution des rendements indiquant que certains radicaux sont détruits, notamment par l'acide sulfurique qui décompose les hexasaccharides sous forme de radicaux furfurals colorés.

Devant l'insuffisance des traitements chimiques et les risques de perte de certains constituants, des glycanases ont été recherchées pour améliorer le découpage des P.P.A. et atteindre des rendements acceptables. C'est finalement une pectinase (Rapidase C 80 P) qui fournit les meilleurs résultats en élevant le rendement final à plus de 75 % lorsqu'elle est employée à pH 4,5 et à 30°C pendant 72 heures.

#### B) Analyse des monosaccharides neutres :

L'analyse par la chromatographie en phase gazeuse (C.P.G.) impose que les oses soient rendus volatils sous forme d'acétates d'alditols, par exemple. Cette transformation consiste en une réduction suivie d'une acétylation (figure II-4). L'introduction de méso-inositol comme témoin interne, permet une évaluation quantitative des différents monomères ainsi séparés.

Les milieux de culture ont été recueillis tous les 2 jours et des aliquotes de 20 ml ont été utilisées pour précipiter séparément, par le C.T.A.B. et par l'éthanol, les P.P.A. et les polymères totaux. Chacun des échantillons recèle des pentasaccharides, des méthyl-pentasaccharides et des hexasaccharides qui sont identifiés en fonction de leur temps de rétention dans la colonne d'analyse et par référence aux monosaccharides témoins qui ont permis son étalonnage.

Les polymères totaux (figure II-5) comprennent principalement glucose, xylose, galactose et mannose qui représentent ensemble entre 85 et 90 % de la composition molaire en monosaccharides neutres. Le glucose est le constituant le plus abondant ; il représente près de 50 % de la totalité des monosaccharides neutres après 2 jours de culture, il diminue rapidement et se stabilise à 30 % par la suite. Cependant, la proportion de chacun des trois autres monosaccharides varie peu. L'arabinose progresse

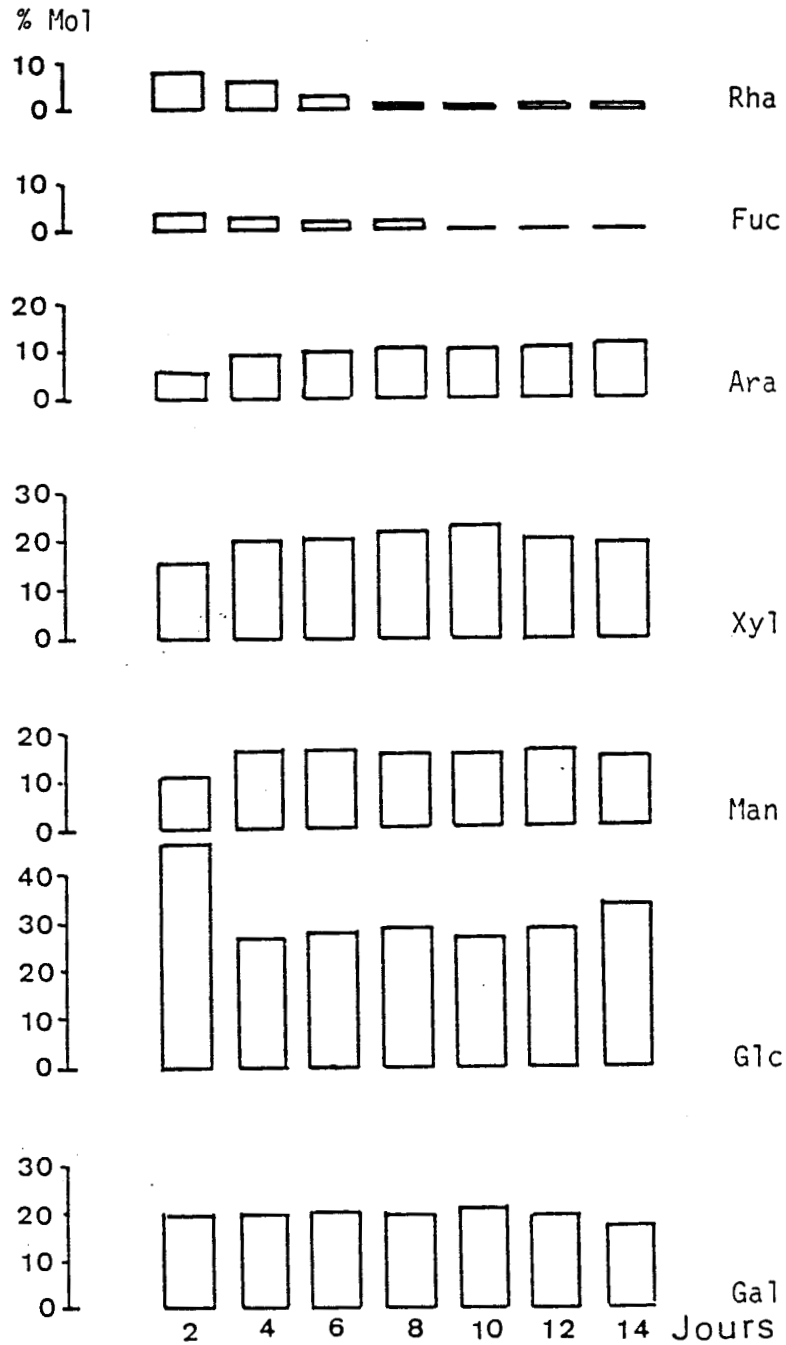


Figure II.5 : Composition centésimale (% molaire) en monosaccharides neutres des polymères totaux excrétés par la suspension cellulaire de silène, au cours de la culture.

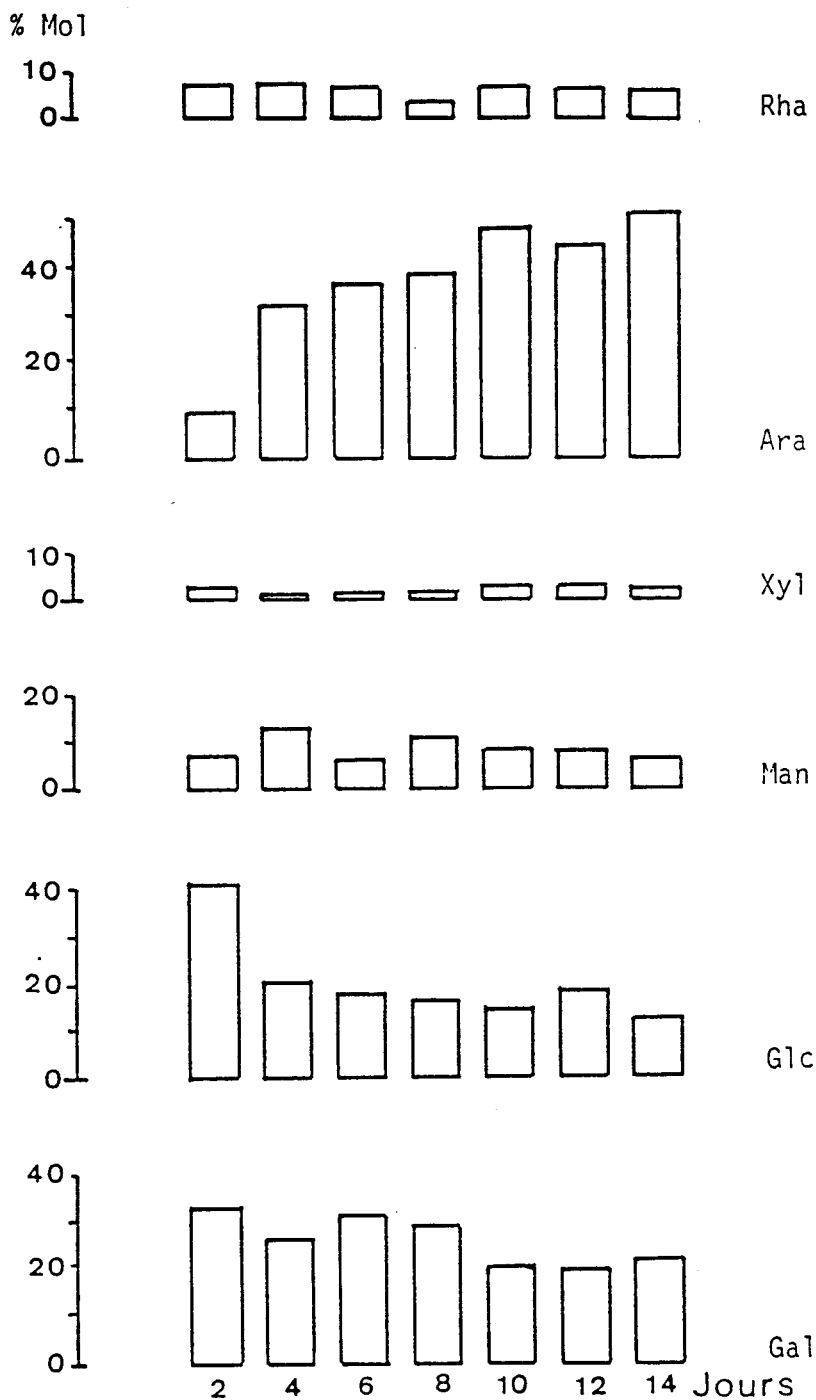


Figure II.6 : Composition centésimale (% molaire) en monosaccharides neutres des P.P.A excretés par la suspension cellulaire de silène, au cours de la culture.

légèrement et atteint finalement 10 % de l'ensemble. Le rhamnose et le fucose sont en très faible proportion et ce dernier n'est plus décelable en fin de culture. Sa présence est néanmoins intéressante à signaler car il n'a pas été repéré dans la fraction acide, précipitée par le C.T.A.B.. La composition centésimale des monosaccharides neutres inclus dans les P.P.A. (figure II-6) est plus fluctuante. Au début, le glucose (40 %) et le galactose (33 %) sont les plus abondants puis ils diminuent en proportion alors que l'arabinose devient le monomère principal (50 %). Le rhamnose et le mannose demeurent sous le seuil de 10 % et le xylose n'est présent qu'à l'état de trace permanente.

La composition en monosaccharides neutres des fractions étudiées permet de dégager une première image pour les polymères totaux qui peuvent être principalement caractérisés par deux familles de molécules, les xyloglucanes et les galactomannanes, qui sont apparentées aux hémicelluloses et par la présence de fucose. La fraction neutre des P.P.A. est dominée par des arabinogalactanes souvent associées aux acides pectiques mais les parts occupées par le glucose et dans une moindre mesure par le mannose sont surprenantes dans cette fraction.

#### C) Analyse des acides uroniques :

Au cours de la réduction des monosaccharides neutres, les acides uroniques subissent une réduction partielle qui les transforme en acides aldoniques (figure II-7, A). Ensuite, leur lactonisation est facilement obtenue en milieu acide. Après élimination de l'acidité résiduelle, les échantillons sont réduits par du  $\text{NaBD}_4$  avant d'être acétylés comme précédemment (voir fiche technique N° 8). L'emploi du borodeutériure de sodium pour réduire les lactones permet de distinguer par spectrométrie de masse les composés nouvellement formés de ceux obtenus lors de la première réduction des monosaccharides neutres (figure II-8). En effet, le deutérium alourdit les ions sur lesquels il est substitué et provoque des décalages sur les spectres. Ainsi, les pics observés à  $m/e$  147, 219 et 291 au lieu de  $m/e$  145, 217 et 289 ne peuvent s'expliquer que par la présence de 2 atomes de deutérium sur le  $\text{C}_6$  de l'acide aldonique lactonisé : La réaction procède par addition nucléophile sur le groupe carbonyle (figure II-7, B) et suite au déplacement du groupe alcoyle, une seconde addition se produit sur l'aldéhyde formé. L'explication proposée est inspirée du mécanisme général de réduction des esters (MATHIEU et PANICO, 1972).



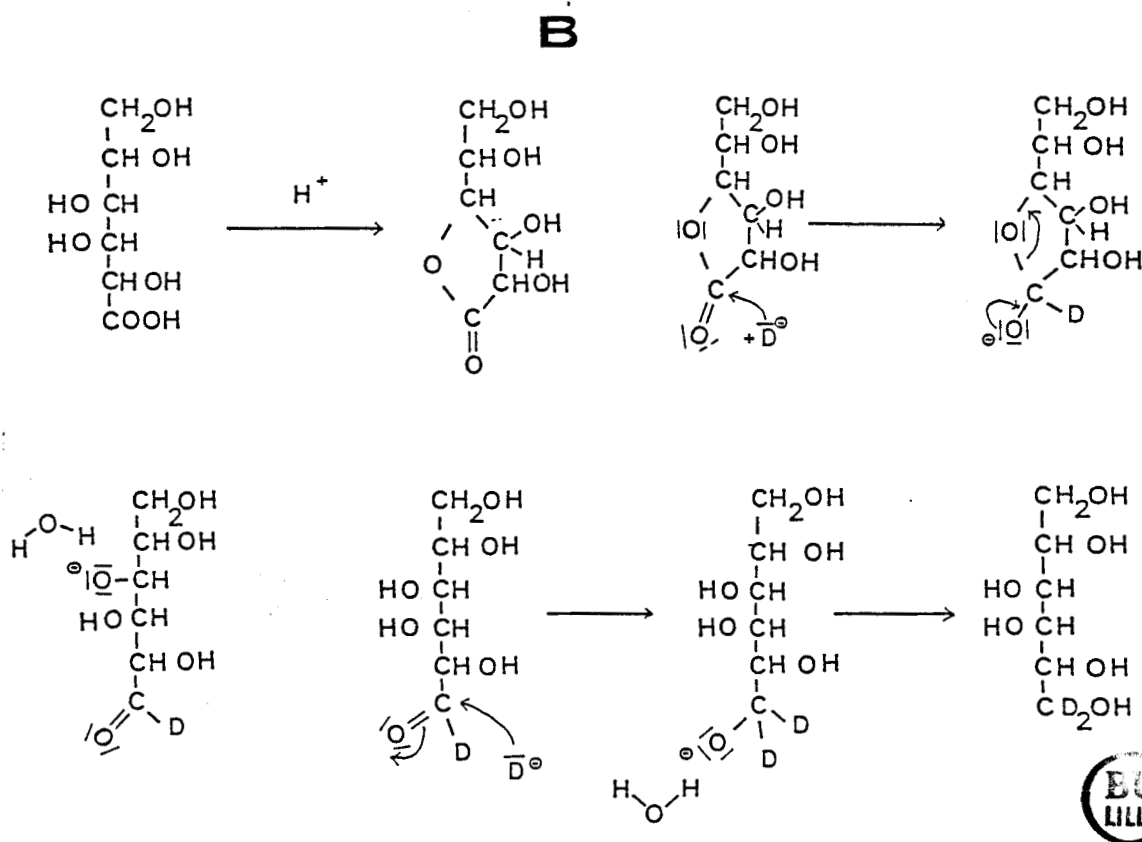
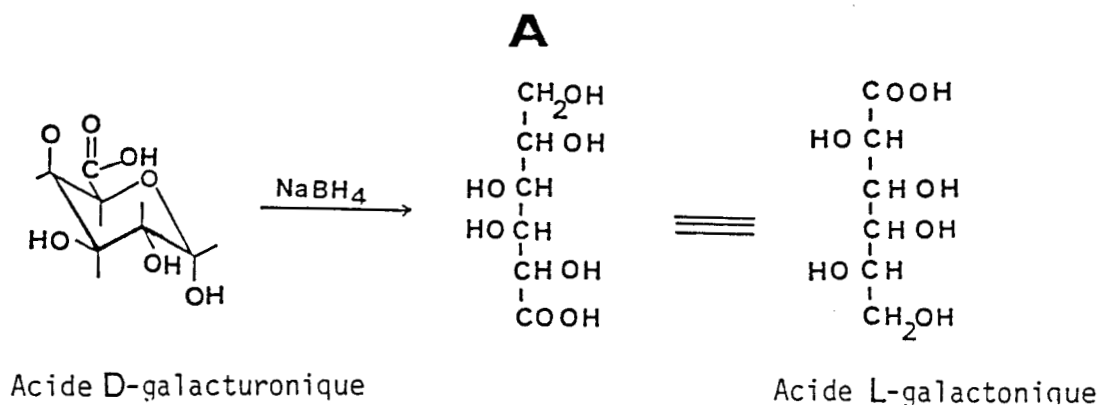
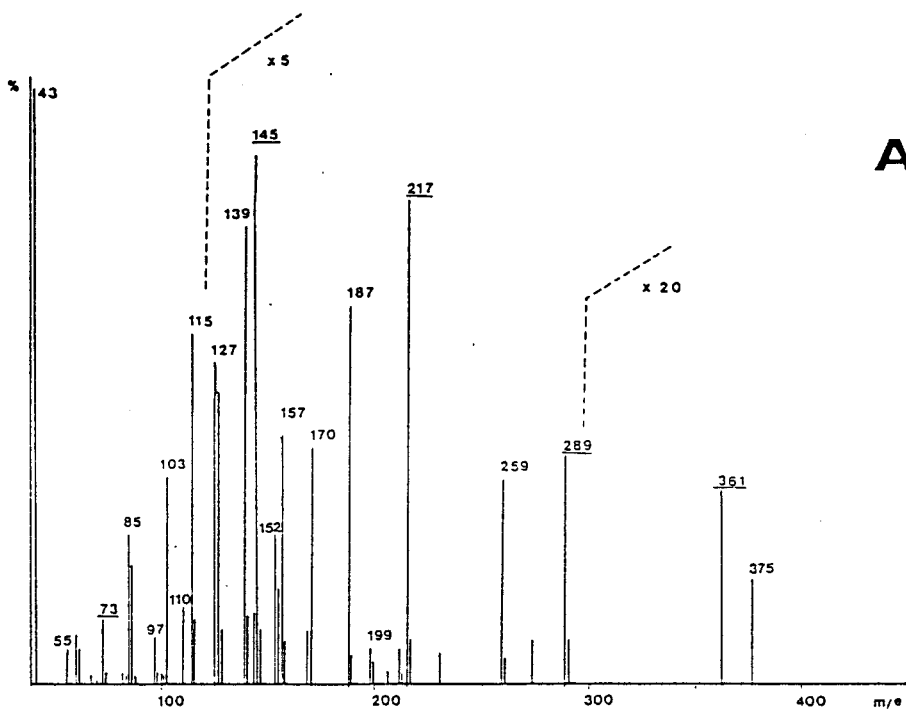


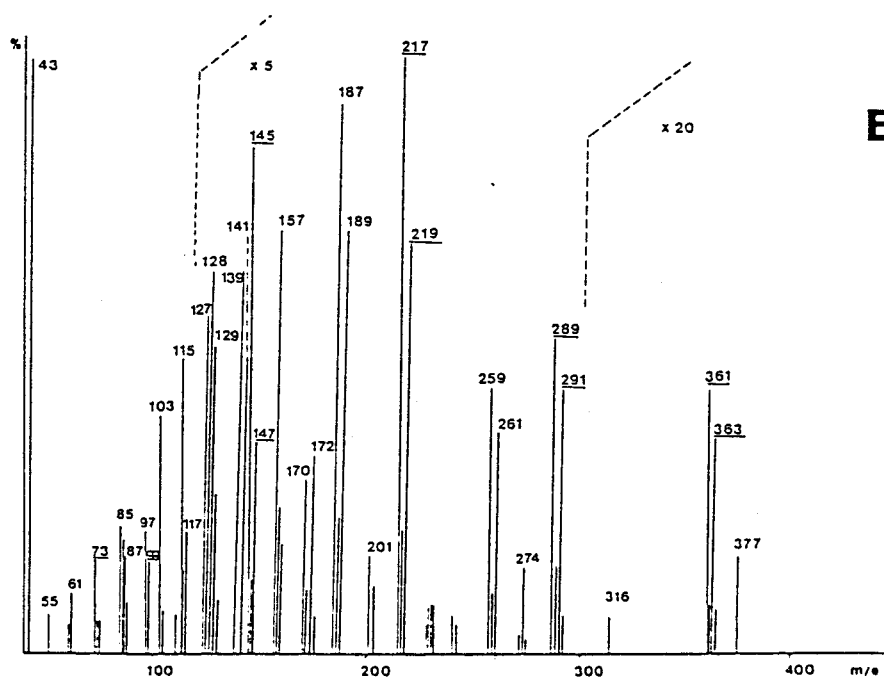
Figure II.7 : Etapes de la transformation de l'acide D-galacturonique en L-galactitol, pendant la préparation des acétates d'alditols pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

A : Mécanisme de réduction en acide aldonique.

B : Mécanisme de lactonisation et de double fixation du deutérium sur le C6 de la lactone au cours de sa réduction par le NaBD4.



A



B



Figure II.3 : Analyse par spectrométrie de masse de la distribution des ions constituant l'acétate de galactitol.

A : Après réduction par NaBH<sub>4</sub> et acétylation directe du galactose.

B : Après réduction par NaBH<sub>4</sub>, lactonisation de l'acide galactonique obtenu, deuxième réduction par NaBD<sub>4</sub> et acétylation.

Les spectres sont enregistrés après couplage G.L.C. - M.S. (Data systems) RIBER 10 - 10, énergie des électrons 70 eV, courant d'émission 0.2 mA.

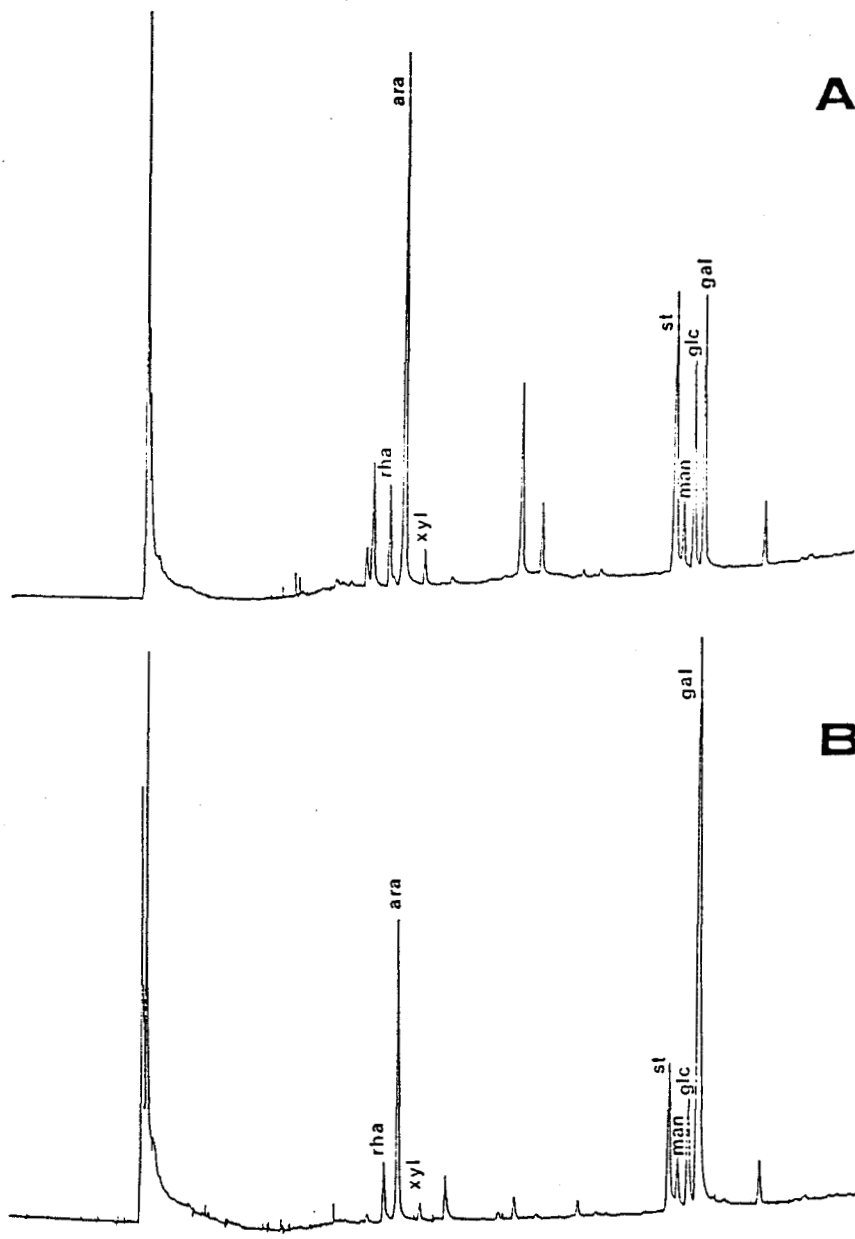


Figure II.9 : Séparation et identification par C.P.G. des monosaccharides constituant les P.P.A.

Chromatogramme A: Après réduction et acétylation directe (1/2 échantillon).

Chromatogramme B: Après réduction, lactonisation des acides aldoniques et deuxième réduction (1/2 échantillon).

Echantillon: P.P.A de 10 jours.

Programme CPG: 130 à 240°C, 2° min<sup>-1</sup> ; 10 min à 240°C.

Colonne : TP Sil 5 cB, 50 m (Ø int. 0.32 mm).

St : standard interne (mésoinositol) ; rha : rhamnose ; ara : arabinose ; xyl : xylose ; man : mannose ; glc : glucose ; gal : galactose.

La présence d'un tel composé en mélange dans le pic correspondant au galactose d'un échantillon lactonisé démontre sans ambiguïté que l'acide uronique qui a subi le traitement était l'acide galacturonique. La différence entre la teneur en galactose des échantillons, déterminée par C.P.G. (figure II-9), avant et après lactonisation des acides uroniques, représente donc la quantité d'acide galacturonique qu'ils contiennent.

La méthode a été appliquée pour déterminer la proportion d'acide galacturonique dans les P.P.A. excrétés dans le milieu au cours de la culture (figure II-10). L'acide galacturonique est le constituant principal des P.P.A.; il représente au minimum 1/3 de leur composition molaire pendant la phase exponentielle de croissance et augmente en fin de culture jusqu'à 50 % de l'ensemble des constituants de cette fraction. A partir de ces résultats, une première configuration des P.P.A. peut être imaginée : ils comprendraient une armature de rhamnogalacturonanes sur laquelle seraient branchés les arabinogalactanes et auxquels pourraient se rattacher les radicaux glucose et mannose. Il s'agirait donc d'une structure pectique au sens large. Cependant, il est peu fréquent de trouver autant de radicaux substitués sur les chaînes de rhamnogalacturonanes.

## 2 . Séparation par chromatographie d'échange d'ions.

### A) Technique de fractionnement :

Pour compléter les résultats acquis sur des échantillons séparés par précipitation sélective, il a semblé intéressant de fractionner en fonction de leur charge, les polymères qui sont en solution dans le milieu de culture. Cette opération peut s'effectuer par chromatographie sur une résine échangeuse d'anions (DEAE-Sephadex A 50). Un milieu de culture de 14 jours est dialysé, à six reprises, pendant 12 heures contre 50 vol. d'eau distillée et déposé dans une colonne garnie de la résine échangeuse d'anions. Une première élution par l'eau distillée permet de recueillir les polymères dépourvus de charge apparente qui représentent 75 % de la concentration molaire de l'ensemble de l'échantillon (tableau II-6). Les molécules chargées sont successivement décrochées par des solutions de NaCl de force ionique croissante (0,1 M - 0,5 M - 1 M et 5 M). Chacune des fractions est ensuite dialysée puis concentrée au volume initial déposé dans la colonne. La faible proportion des fractions les plus chargées peut s'expliquer par la méthode de préparation par dialyse qui élimine une

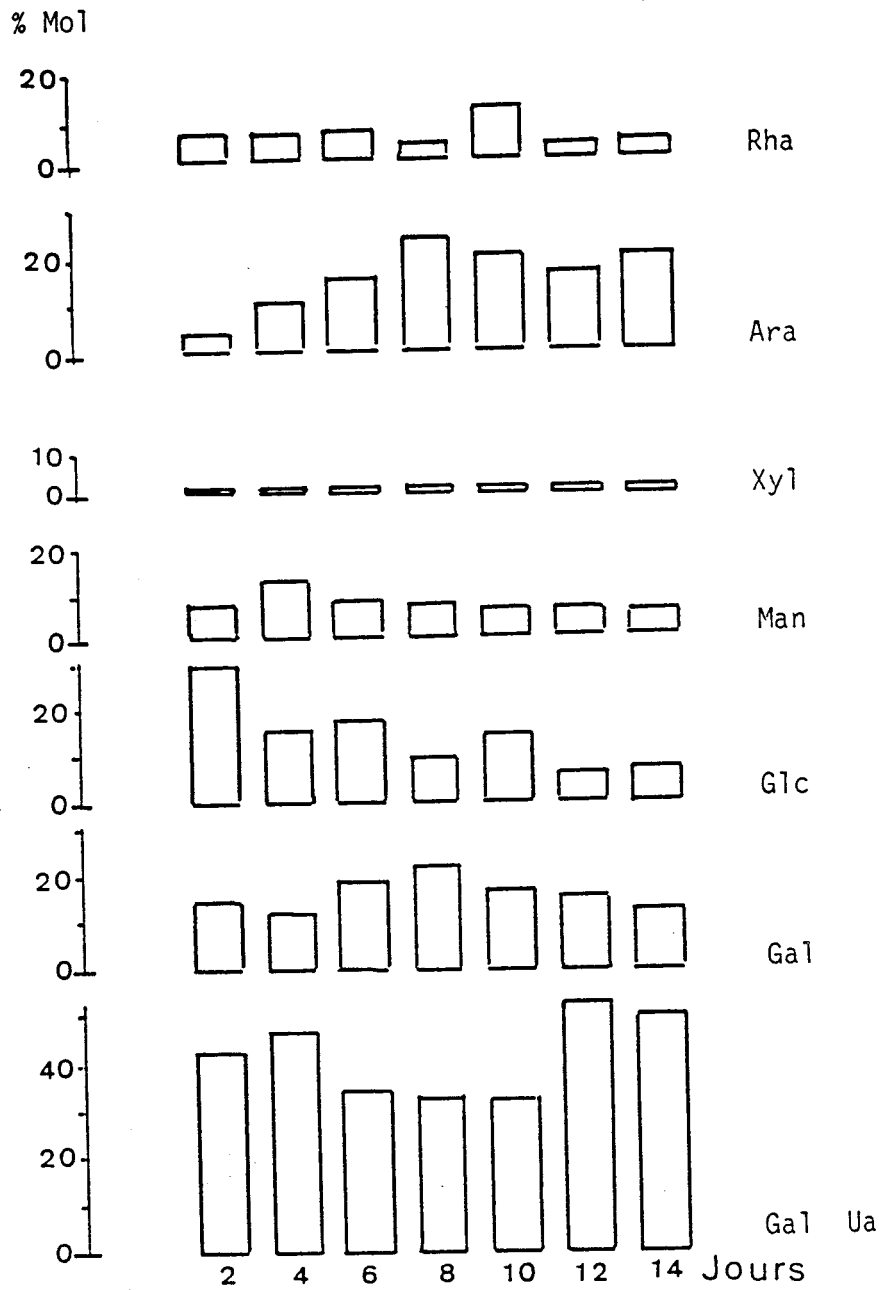
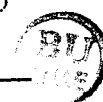


Figure II.10 : Composition centésimale (% molaire) en monosaccharides des P.P.A. en fonction de la durée de culture de la suspension cellulaire de silène.

Tableau II.6 : Distribution en masse et composition en oses totaux, neutres et acides des fractions séparées par chromatographie d'échange d'ions .

Les mesures sont effectuées à partir d'un milieu de culture de 14 jours. i) sur un échantillon de polymères totaux précipités à l'éthanol ; ii) sur un échantillon dialysé 72 h ; iii) sur les fractions séparées sur DEAE-Sephadex A 50, éluée par H<sub>2</sub>O puis par NaCl (0,1 à 5 M).

	masse lyophilisée		Composition en oses	
	mg	(%)	neutres	acides totaux mM.l <sup>-1</sup> (%)
Précipité Ethanol	192,8		41,0	4,8 45,8
Echantillon dialysé	176,5	(100)	40,0	2,1 42,1 (100)
H <sub>2</sub> O	119,4	(72,0)	29,0	0,0 29,0 (71,8)
NaCl 0,1M	14,0	( 8,4)	3,7	0,2 3,9 ( 9,7)
NaCl 0,5M	23,6	(14,2)	4,6	0,8 5,4 (13,3)
NaCl 1 M	4,6	( 2,8)	0,9	0,7 1,6 ( 4,0)
NaCl 5 M	4,2	( 2,5)	0,3	0,2 0,5 ( 1,2)



partie d'oligomères et de petits polymères. En effet, la quantité totale de polymères recueillis après dialyse est de 10 % inférieure à celle obtenue par précipitation par l'éthanol et ce sont les acides uroniques qui diminuent le plus nettement.

#### B) Analyse de la composition en monosaccharides :

Les échantillons séparés par chromatographie d'échange d'ions sont hydrolysés, réduits puis acétylés ou lactonisés avant d'être acétylés selon la méthode décrite précédemment (voir fiche technique N° 8). L'analyse en C.P.G. permet d'établir la proportion relative (% molaire) de chacun des monosaccharides (figure II-11).

La distribution des monosaccharides en fonction de la charge globale des polymères permet de faire quelques constatations évidentes : L'acide galacturonique, non dosé dans la fraction neutre, augmente avec la force ionique de la solution d'éluion. Le glucose est surtout présent dans la fraction neutre. Le xylose est également caractéristique des fractions neutres ou faiblement chargées. Le galactose et l'arabinose sont répartis, notamment dans les fractions faiblement chargées. Le mannose est le monosaccharide le plus régulièrement distribué et apparaît comme un contaminant ou un substituant permanent. Le rhamnose qui accompagne généralement l'acide galacturonique devient le principal monosaccharide neutre de la fraction éluee par NaCl 1 M. Enfin, le fucose n'est présent qu'à l'état de traces dans la fraction neutre.

Par conséquent, chaque fraction peut être caractérisée par une ou plusieurs familles de macromolécules :

- La fraction neutre est principalement constituée de glucanes.
- Les fractions faiblement chargées (éluees par NaCl 0,1 et 0,5 M) comprennent en mélange des xylanes et des arabinogalactanes auxquels viennent s'associer les rhamnogalacturonanes dans la fraction la plus chargée.
- La fraction éluee par NaCl 1 M est tout à fait originale avec un rhamnogalacturonane dont les deux constituants sont en mélange quasiment équimoléculaire.
- La fraction la plus chargée peut être assimilée à un homogalacturonane.



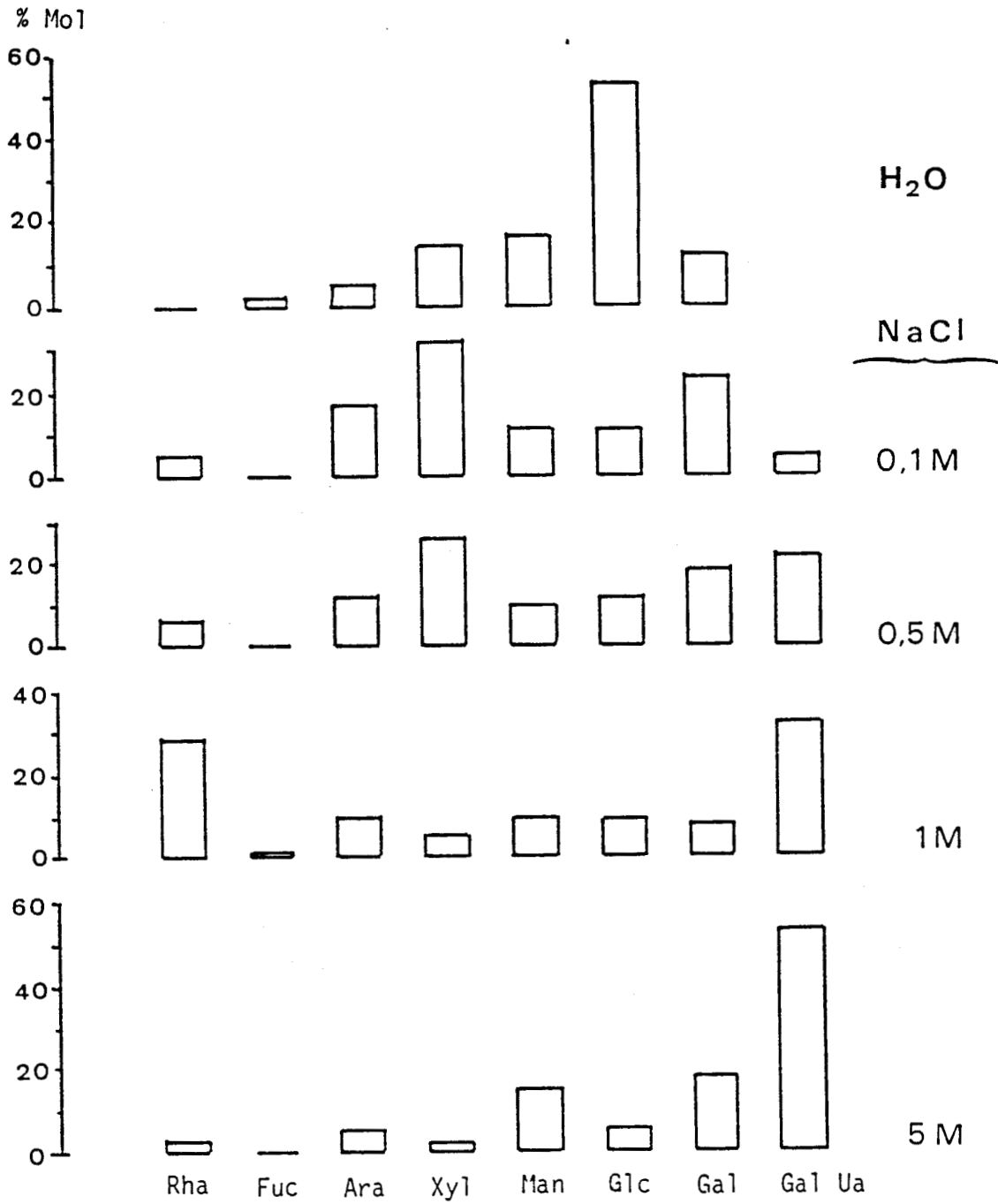


Figure II.11 : Composition centésimale (% molaire) en monosaccharides des différentes fractions séparées sur DEAE Sephadex A 50, de polysaccharides extracellulaires de la suspension cellulaire de silène, après 14 jours de culture.



L'étude de la composition centésimale en monosaccharides des différentes fractions séparées par échange d'ions, apporte des renseignements supplémentaires sur les familles de macromolécules qui constituent le complexe polysaccharidique, présent dans le milieu après 14 jours de culture. Toutefois, le caractère préliminaire de l'expérimentation entreprise ne permet pas de préciser davantage la description structurale de ces composés.

### 3 . Composition des fragments solides.

Les fragments solides sont des éléments macroscopiques en suspension dans le milieu en fin de culture ou bien formés par condensation lors de la réduction sous vide du volume du milieu, au moment de la préparation des P.P.A. (figure II-12). Leur analyse, conduite dans les mêmes conditions que précédemment (Tableau II-7), fournit des résultats qui confirment que ces fragments proviennent de l'agrégation des polymères totaux lorsque leur concentration dans le milieu de culture dépasse un certain seuil. La prédominance du glucose, plus accentuée que dans les polymères totaux, peut signifier une contamination par des éléments cellulosiques qui seraient enrobés et agglutinés avec les polymères solubles.

Au plan physiologique, les conséquences de la précipitation d'une partie des polymères solubles à la fin de la culture sont probablement multiples et cet aspect mérite une reconsidération ultérieure. De plus, la tendance des polymères de silène à former des agrégats plutôt que des gels lorsque leur concentration augmente est directement liée aux propriétés physico-chimiques des macromolécules.

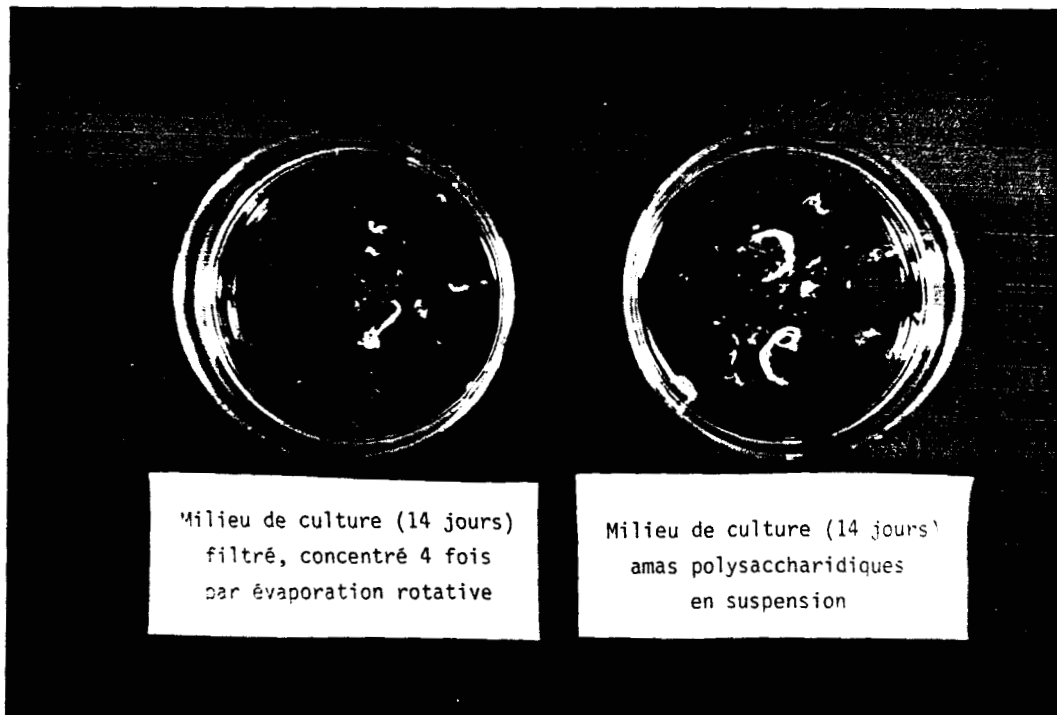


Figure II.12 : Amas polysaccharidiques dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de silène, âgée de 14 jours.

A droite : amas en suspension dans le milieu de culture,  
A gauche : amas formés au cours de la réduction sous vide du milieu de culture.



Tableau II.7 : Composition en monosaccharides (% molaire) des fragments insolubles prélevés dans le milieu de suspension cellulaire de silène après 14 jours de culture. Comparaison avec les compositions en monosaccharides des P.P.A. et des polymères totaux correspondants.

Monosaccharides	Fragments insolubles	P.P.A	Polymères totaux
Rhamnose	8,8	4,1	2,0
Arabinose	6,8	20,6	10,2
Xylose	12,6	1,1	18,4
Mannose	12,3	4,4	14,2
Glucose	43,8	7,1	30,2
Galactose	7,3	12,6	17,0
Gal U.	9,2	50,1	7,8



### III PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DES P.P.A.

Par définition les P.P.A. sont des polymères en solution dans le milieu de culture et leur caractère polyanionique permet leur précipitation sélective par le C.T.A.B. ou leur séparation par chromatographie d'échanges d'ions. La présence d'acide galacturonique comme constituant principal de ces polymères doit leur conférer des propriétés acides qu'il convient de caractériser. En effet, le comportement polyélectrolytique des polymères en solution dépend de la structure primaire, c'est à dire des séquences d'enchaînement des acides uroniques par rapport aux monosaccharides neutres, du degré d'estérification des groupements carboxyles. Ces caractères conduisent à une répartition des charges, définie par le paramètre de charge de la théorie de LIFSON-KATCHALSKY (1954), à condition que les polymères adoptent une conformation idéale en batonnet. En réalité, de nombreuses situations peuvent affecter les comportements théoriques : la présence de branchements latéraux comprenant des polymères neutres et des protéines, l'arrangement spatial des macromolécules consolidé par des liaisons intra- et inter-chaines, les attractions et les répulsions électrostatiques, l'environnement ionique, l'état d'hydratation sont autant de facteurs qui modifient les propriétés acides des P.P.A..

Le second objectif de la mesure des propriétés physicochimiques des P.P.A. est d'apprécier les conséquences de la présence de polyélectrolytes dans le milieu de culture en terme de sélectivités ioniques et de capacités d'échange.

Pour réunir l'ensemble des renseignements nécessaires, les polymères préalablement mis sous forme acide sont neutralisés par différentes bases avant et après la saponification des fonctions esters. La mesure des activités ioniques après neutralisation permet de caractériser la différence de sélectivité des acides pectiques pour les ions mono- et divalents.

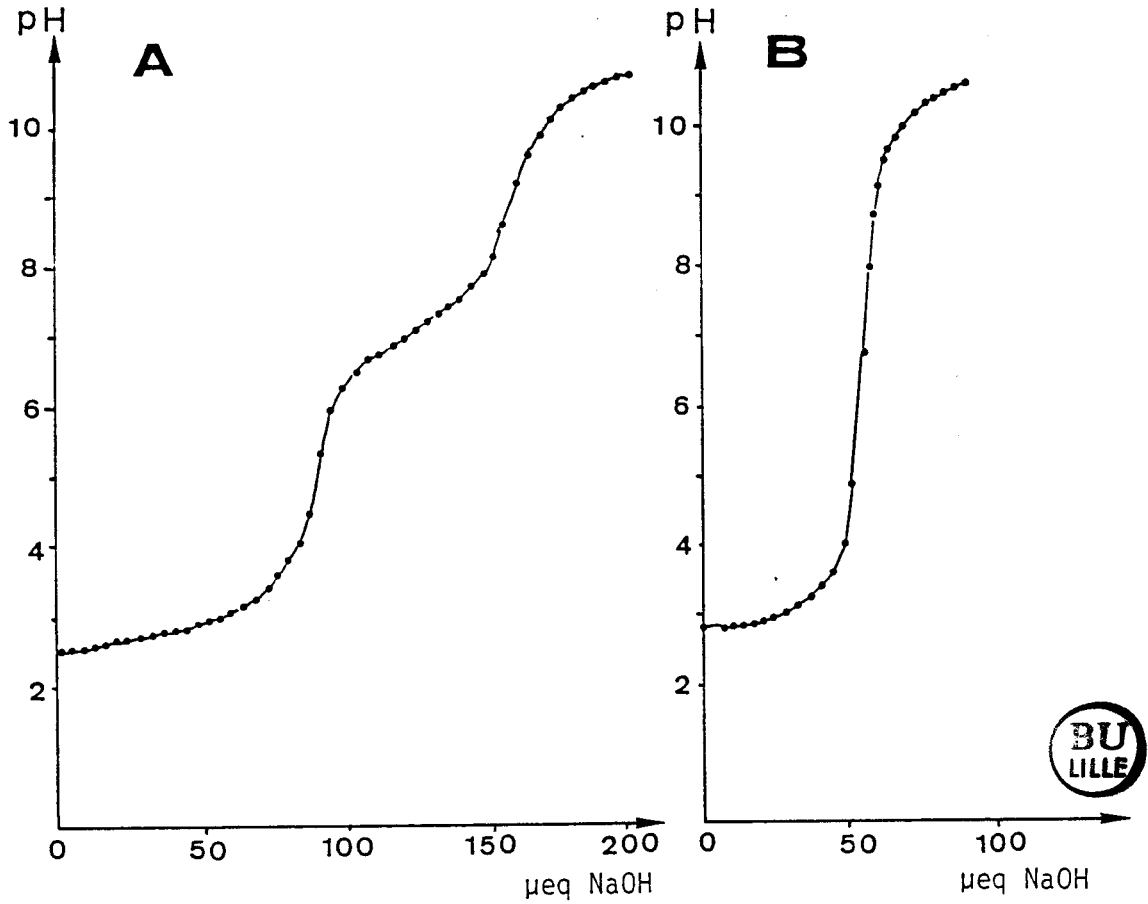


Figure II.13 : Courbes de neutralisation par NaOH des P.P.A excrétés par la suspension cellulaire de silène après différents temps de culture.

A : P.P.A. 7 jours

B : P.P.A. 14 jours

20 ml ( $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ );  $25^\circ\text{C}$ , sous flux d'azote.

## 1 . Détermination de l'acidité des P.P.A.

### A) Analyse des courbes de neutralisation :

Les échantillons lyophilisés sont mis en suspension dans  $H_2O$  à raison d'environ  $1 \text{ mg.ml}^{-1}$ . Les groupements carboxyliques sont protonés en présence d'une résine échangeuse d'ions (Amberlite IR 120, forme H). Ils sont mis à équilibrer sous flux d'azote dans une cuve thermostatée à  $25^\circ\text{C}$ . La mesure du pH initial permet d'estimer l'autodissociation des P.P.A.. En effet, les acides carboxyliques en solution sont en équilibre avec leur forme dissociée et avec les protons . Le degré de dissociation ( $\alpha_0$ ) dépend du pK qui est le paramètre caractéristique de l'acide considéré :

$$pK = -\log \frac{(\text{COO}^-) \cdot (\text{H}^+)}{(\text{COOH})}$$

La courbe de neutralisation est obtenue en reportant les valeurs du pH en fonction des quantités d'hydroxydes ajoutés (fiche technique N° 9).

Le titrage des P.P.A. recueillis après 7 et 14 jours de culture est réalisé par NaOH, KOH ou  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (figures II- 13 et II-14). Un premier titrage par la soude met en évidence la différence de comportement des P.P.A. selon le moment de leur prélèvement. Les deux points d'équivalence qui apparaissent nettement sur la figure II-13, A indiquent la présence simultanée de deux acides de nature différente ou une différence d'accessibilité entre deux catégories de sites d'un même acide. Après 14 jours (figure II-13, B), la séparation entre les deux virages est beaucoup plus discrète. La valeur de chacun des deux virages dépend non seulement de l'âge de l'échantillon mais également de la nature du contre-ion de la base utilisée (figure II-14). Au niveau du premier virage, les trois courbes sont superposées pour chaque échantillon, ce qui montre qu'il n'existe pas de sélectivité particulière pour l'un ou l'autre des trois contre-ions. L'absence de différence de sélectivité entre les ions mono- et divalents peut s'expliquer soit par la nature oligomérique de cette première classe d'acides pectiques, soit par l'existence de groupements acides d'origine différente. Au niveau du second virage, il se produit un phénomène particulier lors du titrage par la chaux. Le nombre d'acides dosés en présence de calcium est en moyenne deux fois supérieur à celui obtenu en présence des monovalents.

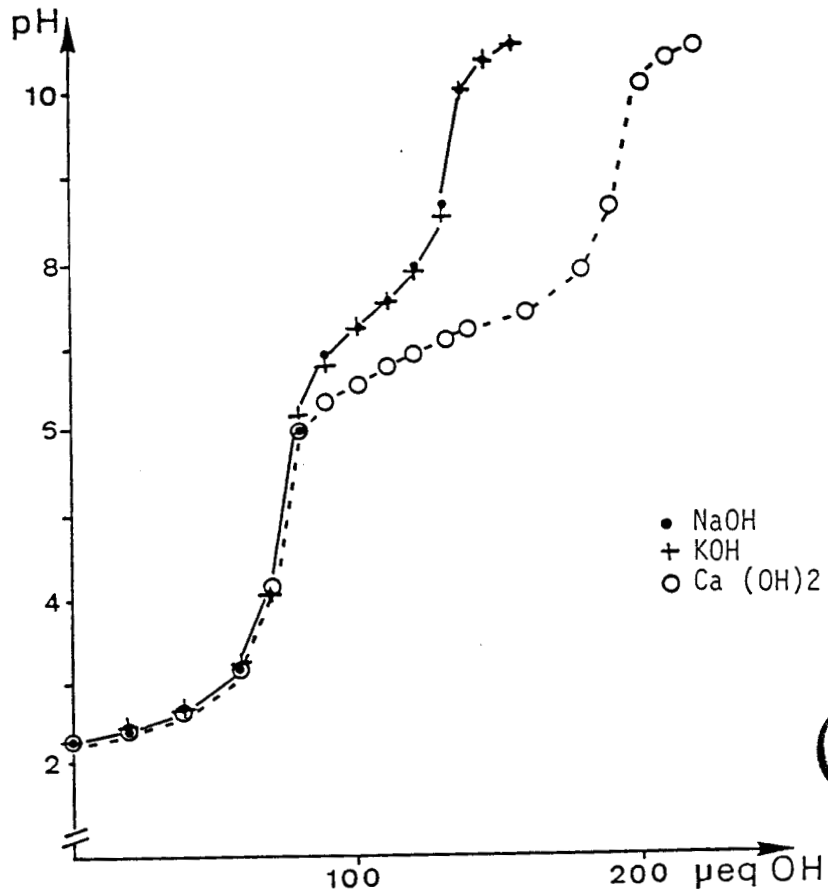


Figure II.14 : Courbes de neutralisation par différentes bases de P.P.A. excrétés par la suspension cellulaire de silène, après 7 jours de culture.

(●) NaOH; (+) KOH; (○) Ca(OH)<sub>2</sub>.  
25 ml (0,6 mg.ml<sup>-1</sup>); 25°C, sous flux d'azote.

Cet effet peut s'expliquer par le démasquage de nouveaux sites acides et/ou par une affinité particulière de ces sites à l'égard du calcium.

B) Estimation de la dissociation :

L'estimation des degrés de dissociation est un moyen indirect d'atteindre le pK caractéristique de l'acide ayant provoqué le premier virage au cours de la neutralisation. En effet, l'écart de pH entre les deux virages élimine tout risque d'interférence du second acide sur le premier. Les valeurs de  $\alpha_0$  sont dans tous les cas inférieures à 1, ce qui élimine l'hypothèse d'une contamination par l'HCl formé au cours du processus d'échange du NaCl en excès, sur la résine échangeuse au cours de la protonation des polymères. La valeur moyenne du degré de dissociation après 7 jours ( $\alpha_0 = 0,59$ ) est légèrement supérieure à celle ( $\alpha_0 = 0,42$ ) obtenue après 14 jours de culture. Les pKa moyens résultant de telles autodissociations sont respectivement de 2,4 et 3,4. Ces valeurs sont proches de celles qui sont mentionnées dans la littérature pour l'acide polygalacturonique et ses dérivés. L'écart d'une unité pH entre les valeurs moyennes des pKa des P.P.A. excrétés après 7 ou 14 jours de culture peut s'expliquer par une modification de leur structure. Il peut simplement résulter de la différence de normalité des acides dans leurs milieux respectifs.

C) Estimation des masses équivalentes :

La masse équivalente se définit par le rapport entre la masse de polymères en solution et le nombre d'équivalents acides mesurés. Elle correspond donc à la masse d'un équivalent acide. Elle est d'autant plus élevée que la proportion entre les radicaux neutres et acides est plus grande. Les quantités relatives de ces deux catégories de radicaux, déterminées par dosages colorimétriques et par C.P.G. permettent de calculer une première estimation des masses équivalentes des échantillons étudiés (tableau II-8). La masse équivalente des P.P.A. de 7 jours varie entre 375 et 570 g alors que celle des P.P.A. de 14 jours est en moyenne de 340 g.



La détermination des masses équivalentes à partir des courbes de titrage présente une difficulté à cause du nombre variable de sites dosés en présence d'ions mono- ou divalents. Les valeurs obtenues en présence de calcium s'échelonnent entre 90 g (P.P.A. de 7 jours) et 150 g (P.P.A. de 14 jours) et sont donc inférieures à la masse équivalente théorique de l'acide polygalacturonique (176 g). En présence de monovalents, la masse équivalente des P.P.A. de 7 jours est en moyenne de 140 g ; celle des P.P.A. de 14 jours varie entre 175 g et 500 g, les masses les plus élevées étant obtenues dans le cas d'un virage unique (Tableau II-8). D'après ces calculs, leurs valeurs sont plus élevées en fin de culture, ce qui est en contradiction avec la première série d'estimations. Pour résoudre ce problème, des pseudo masses équivalentes sont calculées en affectant l'ensemble de la masse à chacune des classes d'acides. Dans ces conditions, la masse équivalente du premier virage est voisine quels que soient les P.P.A. alors que celle du deuxième virage tend à se rapprocher des valeurs estimées à partir des dosages colorimétriques.

#### D) Degré d'estérification :

Il est fréquent que les pectines naturelles aient leurs groupements carboxyliques estérifiés, notamment par des radicaux méthyles, ce qui facilite leur extractibilité de la paroi. Il est donc nécessaire de déterminer le degré d'estérification des P.P.A. qui sont des polymères excrétés dans leur milieu de culture par les cellules en suspensions.

Le degré d'estérification d'un acide se mesure suite à la saponification de la fonction ester par une base forte. Les P.P.A. préalablement titrés sont traités par NaOH 1 N à 4°C, pendant 4 heures (voir fiche technique N° 9). Ils sont à nouveau titrés et le surcroît d'acidité mesurée correspond donc aux groupements carboxyles qui ont été démasqués par la saponification. Le rapport entre ce supplément d'acidité et la totalité mesurée représente donc le degré d'estérification des polymères.

Dans les cas où les acides présentent deux virages, la question se pose de savoir si l'estérification est distribuée de façon homogène ou si elle est attribuable préférentiellement à l'une des deux catégories.

Tableau II-8: Détermination des masses équivalentes des P.P.A. excrétés par les suspensions cellulaires de silène après 7 ou 14 jours de culture.

En potentiométrie, la masse équivalente (Me) est calculée par le rapport entre la masse de P.P.A. introduite dans la cellule de titrage et le nombre d'équivalents nécessaires pour neutraliser les acides présents.

Me t est rapportée à l'ensemble des équivalents (2 virages confondus)

Me 1 et Me 2 sont rapportées séparément au premier ou au second virage.

Me (+) et Me (2+) sont respectivement obtenus en présence de contre-ions mono- ou divalents.

Les masses équivalentes théoriques (Me th) sont calculées à partir des dosages colorimétriques ou par C.P.G.

POTENTIOMETRIE (n = 2)	7 jours	14 jours
Me t(+)	135	135 (480*)
Me t(2+)	85	105
Me 1	225	235
Me 2(+)	260	350
Me 2(2+)	120	190
DOSAGES COLORIMETRIQUES (n = 6)		
Oses acides / oses totaux	0,45	0,47
Me th	385	370
C.P.G. (n = 2)		
Oses acides / oses totaux	0,30	0,50
Me th	580	350

(\*) 1 seule mesure obtenue (courbe avec 1 seul virage)

Pour apporter une réponse à cette interrogation, il suffit de repasser les échantillons saponifiés sous forme H par échange contre une résine adéquate et de titrer à nouveau l'ensemble de l'acidité. Il apparaît alors que seul le second virage se trouve déplacé par le supplément d'acidité (figure II-15). Ce résultat trouve son intérêt dans le fait qu'il conforte l'hypothèse selon laquelle les deux niveaux d'acidité correspondent à un changement conformationnel des polymères au cours de la titration. Il est en effet logique que les ester-méthyles hydrophobes aient tendance à se regrouper entre eux, favorisant ainsi l'arrangement spatial des polymères et leur tendance à se condenser.

Les degrés d'estérification ont donc été calculés par rapport au deuxième virage lorsque les courbes de neutralisation par les monovalents en comportaient effectivement deux. Dans ces conditions, les valeurs obtenues se répartissent entre 8 et 15 % pour les P.P.A. de 14 jours et entre 35 et 56 % pour ceux de 7 jours.

## 2. Détermination de la sélectivité ionique des P.P.A.

L'attrait particulier que manifestent les pectines à l'égard du calcium et le rôle que ce dernier joue dans leur cohésion intra- et intermoléculaire et par voie de conséquence dans l'adhésion des cellules les unes avec les autres est l'argument initial des considérations concernant la sélectivité des P.P.A.. La notion de sélectivité naît du constat que les polymères peuvent avoir une tendance à se lier préférentiellement avec telle espèce ionique plutôt qu'avec telle autre. La conséquence de ces liaisons est que l'activité de l'ion considéré diminue et que les conditions d'échanges se trouvent modifiées localement.

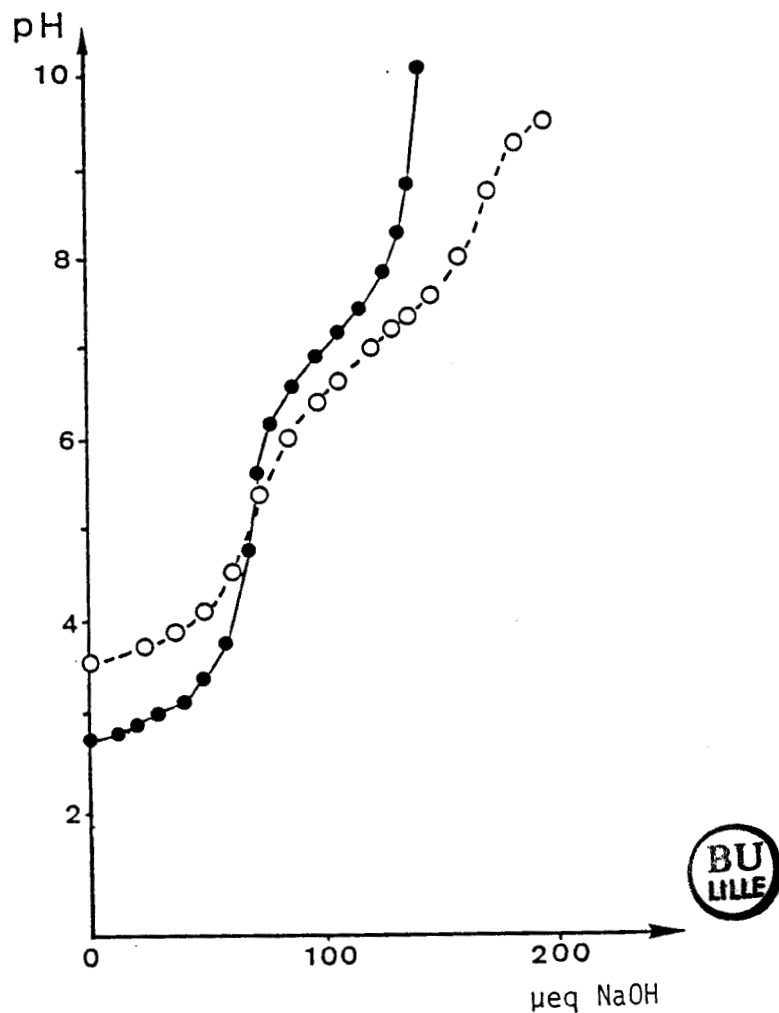


Figure II.15 : Courbes de neutralisation par NaOH des P.P.A excrétés par la suspension cellulaire de silène (7 jours) avant et après saponification des fonctions esters.

( ● ) Premier titrage avant saponification ;  
( ○ ) Deuxième titrage après saponification (1 ml NaOH 1N, 4°C, 4 h et retour sous forme H<sup>+</sup> (amberlite IR 120)).

A) Variations des coefficients d'activité du calcium dans le milieu de culture :

En mesurant simultanément la quantité totale de calcium présente dans le milieu à différents moments de la culture par photométrie de flamme ou par absorption atomique (fiche technique N° 5) et l'activité de cet ion par conductimétrie (fiche technique N° 9), des coefficients d'activité ( $\gamma_{Ca} = \text{activité} / \text{concentration}$ ) peuvent être calculés (tableau II-9). Les valeurs diminuent régulièrement au cours de la culture alors que les quantités de P.P.A. excrétés sont en augmentation continue. Un tel résultat est conforme à l'idée générale que les composés pectiques présentent une grande affinité pour le calcium. La présence des P.P.A. dans les milieux diminue donc l'activité calcique extracellulaire. Le coefficient d'activité calculé après 3 jours de culture semble faible et la valeur absolue de calcium retenu paraît hors de proportion avec la quantité d'acides uroniques présente dans le milieu. Le fait que les échantillons ont été congelés avant les mesures peut aboutir à un changement de conformation des polymères et provoquer une rétention supplémentaire de cations.

B) Estimation des coefficients d'activité à neutralisation complète :

Les mesures des activités et concentrations dans le milieu de culture sont assujetties à la présence d'autres espèces ioniques et des interférences peuvent en résulter. De ce fait, l'estimation des coefficients d'activité à la fin de la neutralisation des P.P.A. par la base correspondante est une méthode qui évite les problèmes d'interférence et donne une image directe de l'effet propre des polymères. Le rapport entre l'activité mesurée à neutralisation complète et le nombre d'équivalents ajoutés pour l'atteindre fournit directement la valeur de  $\gamma$ .

Les coefficients d'activité mesurés à neutralisation complète représentent directement la sélectivité que manifestent les P.P.A. à l'égard des cations. Les mesures effectuées sur des P.P.A. de 7 et 14 jours fournissent des résultats différents selon que la titration a été faite par la chaux ou par la potasse. Les coefficients d'activités du calcium sont faibles et variables, ceux du potassium sont tous voisins de l'unité.

Tableau II.9 : Variation des concentrations, activités et coefficients d'activité du calcium dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de silène.

	3 jours	7 jours	13 jours
Concentration (Ca <sup>2+</sup> ) meq.l <sup>-1</sup>	2,32	1,82	0,91
Activité A Ca <sup>2+</sup> meq.l <sup>-1</sup>	1,32	0,72	0,33
Coefficient d'activité	0,57	0,40	0,33
Acides uroniques mM.l <sup>-1</sup>	0,038	0,147	0,389



Les P.P.A., comme les parois dont ils sont issus, ne présentent aucune sélectivité à l'égard du potassium. Par contre, l'affinité des P.P.A. vis à vis du calcium se trouve confirmée : si  $Y_{Ca}$  augmente avec l'âge de la culture, ceci peut provenir de la nature des P.P.A. rejetés en fin de culture, moins sélectifs en faveur du calcium et/ou d'une perte d'affinité des P.P.A. présents dans le milieu au moment où les parois assurent à nouveau leur sélectivité calcique. Dans le cas contraire, il faut vérifier que la baisse des coefficients d'activité ne provient pas simplement de l'augmentation de la concentration des P.P.A. dans le milieu.

## ACTIVITE BIOLOGIQUE DES POLYMERES PECTIQUES ACIDES.

La démonstration que des fragments pariétaux peuvent produire des effets sur des tissus ou des organismes végétaux n'a été faite que très récemment. Il s'agit de composés séparés et purifiés à partir de parois de microorganismes, de suspensions cellulaires ou de plantes entières. Les effets observés sont principalement des inductions de réactions de défense et des modifications de réponses morphogènes.

Le premier objectif de l'expérimentation entreprise avec les P.P.A. excrétés par les suspensions cellulaires de silène, est de démontrer que leur présence dans le milieu de culture induit des modifications de la croissance des cellules qui les produisent.

Les P.P.A. étant constitués d'un mélange complexe de molécules de taille et de charge variées, il convient ensuite de préciser le rôle de chacune des catégories qui ont pu être séparées et analysées. De plus, les fractions chargées, riches en acides uroniques, ont subi des traitements destinés à modifier leurs propriétés physico-chimiques.

Enfin, les P.P.A. produits par la suspension cellulaire de silène ont été utilisés sur d'autres systèmes biologiques pour vérifier leur spécificité et comparer leurs effets à ceux provoqués par d'autres substances de croissance.



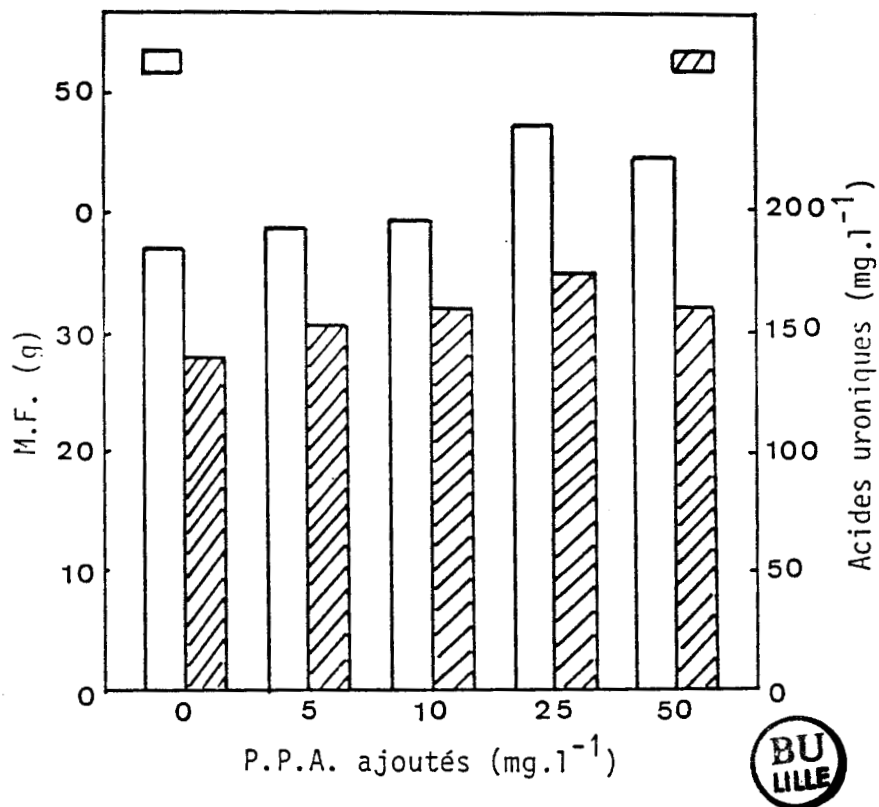


Figure III.1 : Effets des P.P.A. introduits dans un milieu neuf, sur la croissance de la suspension cellulaire de silène et sur l'excrétion de nouveaux P.P.A. dans le milieu de culture.

Les mesures de M.F. (g par flacon) et des P.P.A. (mg.l<sup>-1</sup> d'équivalents d'acides uroniques) ont été faites après 12 jours de culture et les résultats correspondent à la moyenne d'au moins trois essais indépendants.

## I .EFFETS DES P.P.A. SUR LA CROISSANCE DE LA SUSPENSION CELLULAIRE DE SILENE

L'idée de réintroduire les P.P.A. dans une solution nutritive neuve a pris naissance en considérant le caractère acide des polymères et la sensibilité de la suspension cellulaire de silène au pH du milieu de culture. C'est donc la concentration en acides uroniques qui a servi de référence initiale, lors des expériences préliminaires entreprises avec des P.P.A. bruts, extraits selon le même protocole que celui employé pour leur analyse biochimique.

### 1 -Effets des P.P.A. bruts .

Plusieurs séries d'essais ont été réalisées pour mesurer les conséquences de l'addition de quantités variables de P.P.A. dans les milieux de culture neufs, sur la croissance des cellules. Pour faciliter la mise en oeuvre expérimentale, les P.P.A. bruts ont été finalement lyophilisés, de telle sorte que la dose introduite dans chaque flacon est définie par la masse de poudre utilisée. Les résultats obtenus après 12 jours de culture (figure III-1), montrent que l'addition des P.P.A. provoque une stimulation de la M.F. par rapport à un témoin n'ayant reçu aucun apport et cultivé dans les mêmes conditions. La meilleure efficacité est obtenue en ajoutant  $25 \text{ mg.l}^{-1}$  de P.P.A.. Il en résulte également une augmentation de l'excrétion, mesurée par la quantité d'acides uroniques rejetés dans le milieu de culture.

Pour préciser la notion de dose efficace et montrer que l'action stimulante des P.P.A. n'a pas de caractère trophique, ceux-ci sont introduits à différentes concentrations en présence de quantités variables de saccharose (tableau III-1). Sans considérer l'influence propre du saccharose en tant que facteur nutritif essentiel, l'introduction de P.P.A. est d'autant plus efficace que la croissance des témoins est elle-même meilleure (52 % d'augmentation de M.F. en présence de  $50 \text{ mg.l}^{-1}$  de P.P.A. et  $40 \text{ g.l}^{-1}$  de saccharose). La présence des P.P.A. améliore également la M.S. produite mais d'une manière moins apparente que la M.F.. Par ailleurs, la dose optimale varie selon la quantité de saccharose utilisée de telle sorte qu'il est possible de définir le rapport pondéral P.P.A. / saccharose le plus favorable comme étant égal à  $1,25.10^{-3}$ . Ces résultats montrent que les P.P.A. n'ont pas de rôle dans la nutrition des cellules de silène. Cependant, lorsque les conditions sont défavorables (absence de saccharose), ceux-ci sont effectivement absorbés par les cellules.

TABLEAU III-1 : Influence de la quantité de saccharose et de P.P.A. ajoutés dans le milieu de culture sur la croissance et l'excrétion de P.P.A. par les suspensions cellulaires de silène.

Les mesures sont effectuées après 14 jours de culture.  
Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5%,  
n étant indiqué entre parenthèses

Saccharose (g l <sup>-1</sup> )	P.P.A ajoutés (mg l <sup>-1</sup> )	croissance		excrétion P.P.A. (mg)
		MF (g)	MS (g)	
0	0	1,1 ± 0,2 (5)	-	1 (*)
	50	1,4 ± 0,6 (4)	-	3 ± 1 (4)
20	0	38,4 ± 4,3 (6)	1,8 ± 0,2 (6)	28 ± 5 (4), 30 (*)
	25	48,1 ± 3,2 (12)	2,2 ± 0,3 (5)	41 ± 6 (5)
	50	44,7 ± 4,2 (6)	2,0 ± 0,2 (6)	40 ± 5 (6)
40	0	51,8 ± 3,4 (11)	3,5 ± 0,3 (6)	60 ± 9 (4), 63 (*)
	25	68,1 ± 2,6 (6)	3,8 ± 0,2 (6)	75 ± 5 (6)
	50	78,8 ± 6,1 (6)	3,9 ± 0,2 (6)	84 ± 8 (6)



(\*) valeurs estimées à partir des acides uroniques mesurés par un dosage au carbazol sulfurique.

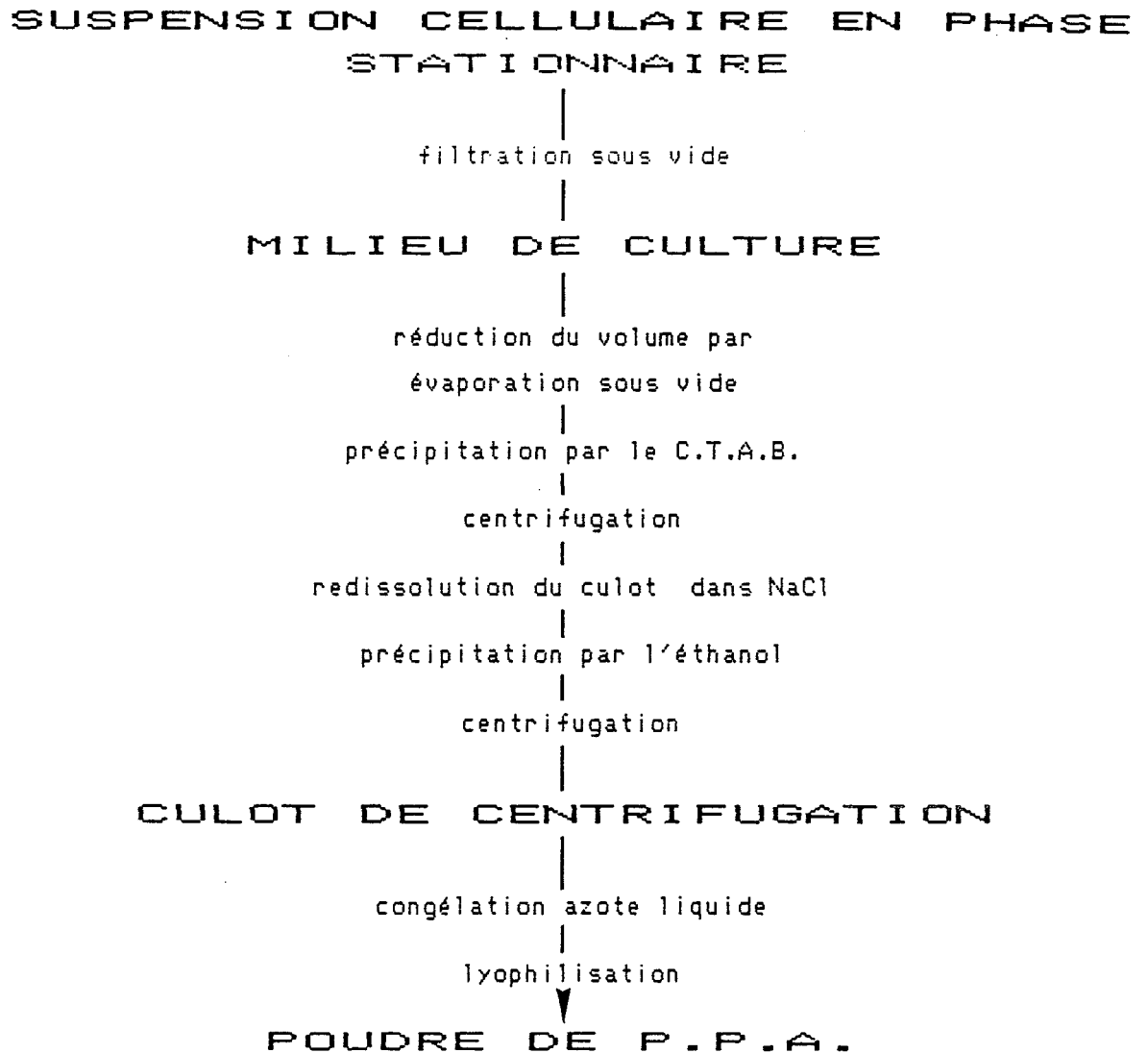


Figure III.2 : Modification du protocole de préparation des P.P.A.

Enfin, l'excrétion de nouveaux P.P.A. dans les milieux est d'autant plus active que la croissance des suspensions cellulaires a été stimulée.

A. Caractérisation des effets des P.P.A. sur l'ensemble des paramètres de croissance :

Les limites de l'action stimulante des P.P.A. bruts étant définies quantitativement sur la M.F. produite au cours d'un cycle de culture, la caractérisation de leurs effets a été étendue à d'autres paramètres de croissance (M.S., N.C. et dimensions cellulaires).

Pour disposer de quantités suffisantes de poudre, le mode d'extraction des P.P.A. a été modifié (figure III-2) en concentrant le milieu de culture par réduction sous vide de son volume, avant la précipitation par le C.T.A.B.. Pour cette série d'essais, les P.P.A. lyophilisés ont été introduits à raison de  $50 \text{ mg.l}^{-1}$ , en présence de  $40 \text{ g.l}^{-1}$  de saccharose, ces conditions permettant d'obtenir la stimulation de croissance la plus importante. La M.F., la M.S., le nombre et la taille des cellules ont été mesurés après 5, 9, 12 et 18 jours de culture.

L'augmentation de M.F. des cellules en présence des P.P.A. (figure III-3, A) se manifeste après 5 jours de culture, devient significative (au seuil de 5 %) au 9ème jour et se poursuit jusqu'à la fin de la culture. La M.S. des cellules est également accrue suite à l'addition des P.P.A., avec un effet optimal au 12ème jour de culture (figure III-3, B). La différence entre les deux paramètres (M.F. et M.S.) résulte du fait que la teneur en eau des cellules est plus élevée en présence des P.P.A., notamment à la fin de la culture.

Le nombre des cellules par ml de milieu de culture (figure III-3, C) évolue peu jusqu'au 5ème jour de culture puis augmente sous l'effet stimulant des P.P.A. bien que la taille des cellules soit alors plus faible que celle des témoins (figure III-3, D et E), en particulier au 9ème jour de culture. Du 9ème au 12ème jour, les cellules continuent de se multiplier plus rapidement en présence des P.P.A., alors que leurs dimensions augmentent à nouveau. Au cours de la dernière période de culture, le nombre de cellules diminue dans les flacons ayant reçu initialement des P.P.A., à cause d'une lyse probable des cellules les plus âgées. Celles-ci sont aussi les plus grandes et les plus riches en eau.

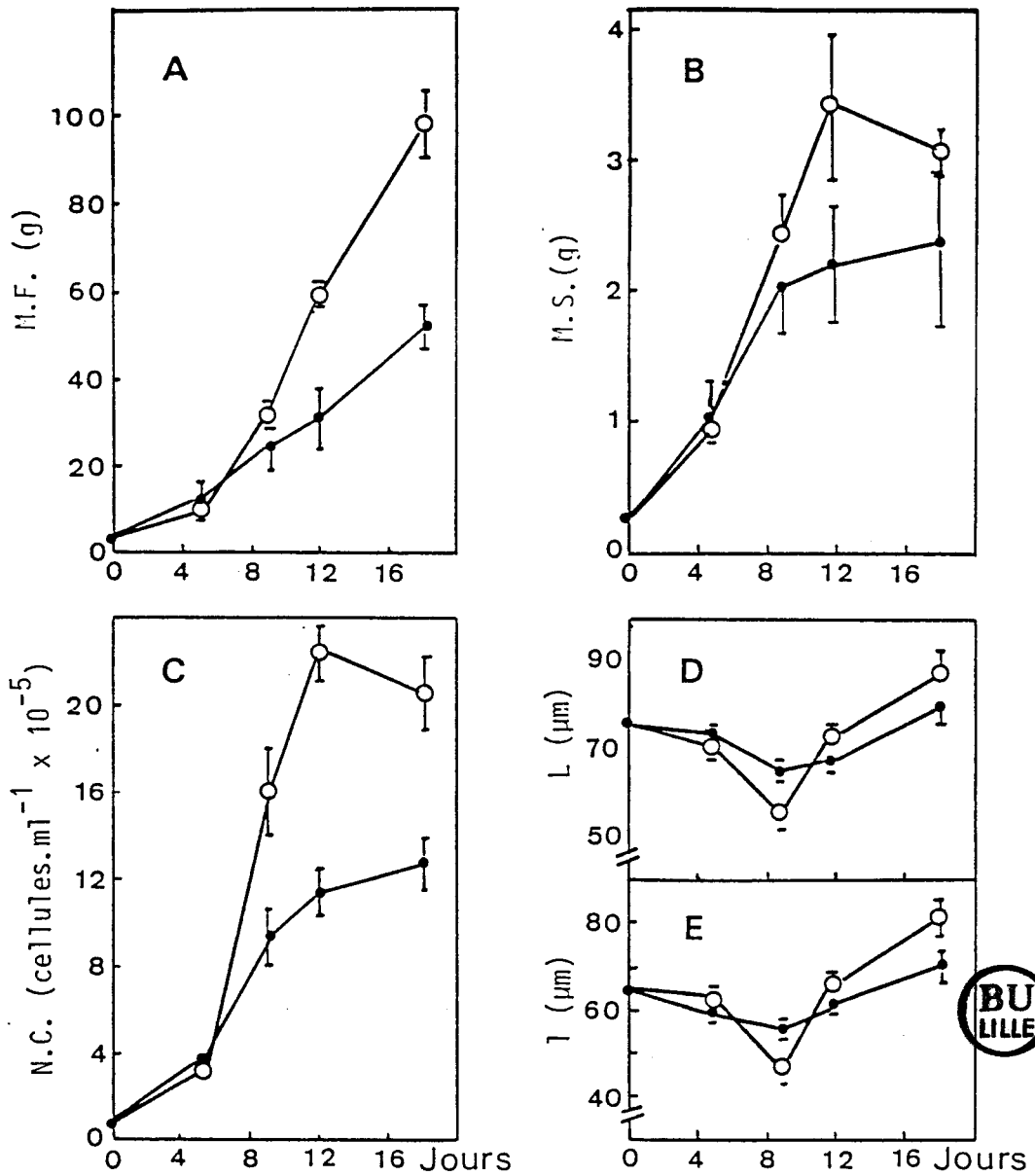


Figure III.3 : Effets des P.P.A. sur la croissance de la suspension cellulaire de silène.

A : masse fraîche (M.F.) en g par flacon

B : masse sèche (M.S.) en g par flacon

C : nombre de cellules par ml

D et E : taille des cellules en  $\mu\text{m}$

L et I représentent respectivement la plus grande et la plus petite dimension.

● : milieu témoin (sans P.P.A.) ;

○ : addition de P.P.A. (50 mg.l<sup>-1</sup>) ;

Ces intervalles de confiance de chaque volume sont calculés au seuil de 5 %,  $n = 6$  (M.F., M.S. et N.C.),  $80 < n < 100$  (L et I).

Ces résultats indiquent donc que les P.P.A. stimulent à la fois la multiplication et le grandissement des cellules de silène. Toutefois, l'entrée d'eau plus importante et l'augmentation finale de la taille des cellules, montrent que l'addition de P.P.A. favorise le processus de grandissement tout en augmentant simultanément l'excrétion de nouveaux P.P.A..

#### D. Caractérisation des effets sur les paramètres du milieu de culture:

L'introduction de différentes doses de P.P.A. dans le milieu n'affecte pas ses paramètres initiaux (volume, potentiel osmotique, pH). Par contre, après 14 jours de culture, quelques modifications apparaissent dans le milieu (tableau III-2). Le volume final du milieu de culture diminue. Les différences mesurées, bien que peu significatives, reflètent l'effet favorable produit par les P.P.A. sur l'absorption d'eau, suite à la stimulation du grandissement cellulaire. La diminution du potentiel osmotique, relativement discrète, traduit l'effet des P.P.A. sur les quantités finales de substances dissoutes. En effet, les concentrations des principaux cations, mesurées après 14 jours de culture sont plus ou moins modifiées par l'addition de P.P.A. à la dose optimale (tableau III-3). La concentration en  $K^+$ , réduite de près de 30% par rapport à celle des milieux témoins apparaît comme la réponse la plus marquée. Elle témoigne d'une stimulation de la consommation de cet élément et apparaît comme un moyen efficace de redistribuer les forces osmotiques entre les cellules et le milieu de culture. La présence des P.P.A. affecte peu la concentration finale des autres cations à l'exception de celle du  $Ca^{2+}$ . L'affinité particulière entre cet élément et les composés pectiques peut expliquer sa rétention dans le milieu de culture.

Le pH du milieu subit des modifications qui sont également intéressantes. En effet, l'addition de P.P.A. bruts ne modifie pas le pH initial du milieu mais son élévation au cours de la culture est moins accentuée de telle sorte qu'il demeure constamment inférieur à 7 (figure III-4). L'emploi de P.P.A., préalablement mis sous forme  $H^+$  par échange des contre-ions contre une résine, n'abaisse pas sensiblement le pH de départ mais ralentit son augmentation pendant les 6 premiers jours de culture.

TABLEAU III-2 : Effets des P.P.A. introduits dans le milieu sur l'évolution de ses paramètres (volume, potentiel osmotique, pH) après 14 jours de culture de la suspension cellulaire de silène.

Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5%, n étant indiqué entre parenthèse.

---

PARAMETRES DU MILIEU DE CULTURE

---

Quantités de P.P.A.

ajoutés (mg l <sup>-1</sup> )	Volume (ml)	Potentiel osmotique (mOs)	pH
0	152 ± 3 (12)	- 35 ± 2 (6)	7,15 ± 0,11 (12)
10	148 ± 4 (4)	- 31 ± 3 (4)	7,02 ± 0,08 (4)
25	140 ± 4 (12)	- 29 ± 2 (6)	6,93 ± 0,07 (12)
50	145 ± 4 (4)	- 30 ± 3 (4)	6,95 ± 0,10 (4)

---






TABLEAU III-3 : Concentrations des cations ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) dans le milieu après 14 jours de culture de la suspension cellulaire de silène, en présence ou non de P.P.A..

Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5%,  
 $n = 6$ .

---

CONCENTRATIONS ( $meq\ l^{-1}$ )

Conditions				
de				
culture	$K^+$	$Na^+$	$Ca^{2+}$	$Mg^{2+}$
Témoïn	$17,02 \pm 1,95$	$0,45 \pm 0,10$	$1,18 \pm 0,10$	$0,75 \pm 0,09$
+P.P.A. ( $25\ mg.l^{-1}$ )	$12,05 \pm 1,57$	$0,43 \pm 0,11$	$1,35 \pm 0,09$	$0,70 \pm 0,06$

---



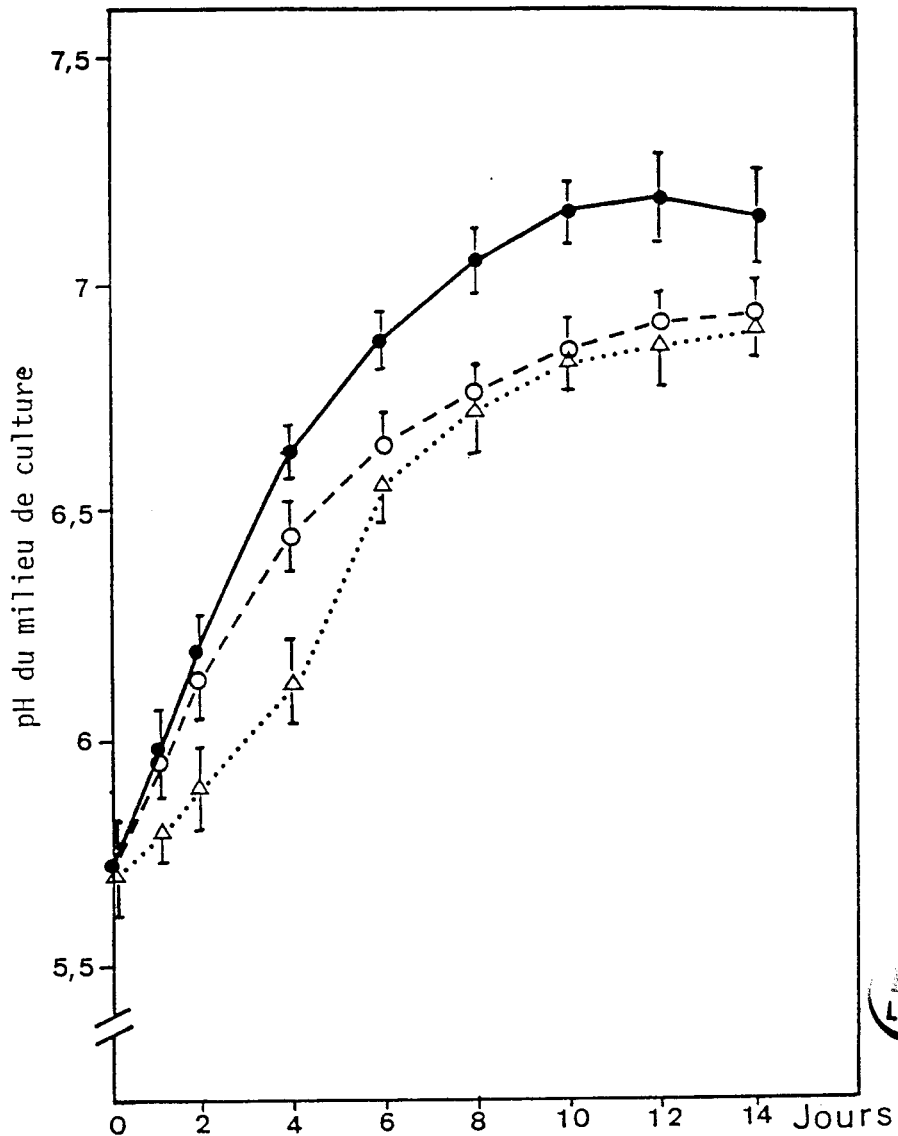


Figure III.4 : Effets de l'addition de P.P.A. bruts ou de P.P.A. (H<sup>+</sup>) sur l'évolution du pH du milieu, au cours de la culture de la suspension cellulaire de silène.

- (●) : milieu témoin (sans P.P.A.) ;
- (○) : addition de P.P.A. bruts (25 mg.l<sup>-1</sup>) ;
- (△) : addition de P.P.A. (H<sup>+</sup>) (25 mg.l<sup>-1</sup>).

Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5 %, n = 17 (témoin), n' = 6 (addition P.P.A.).

Par la suite, il évolue parallèlement à celui mesuré en présence de P.P.A. non traités. Il se produit donc, pendant quelques jours, une stabilisation du pH qui favorise finalement la croissance de la suspension cellulaire.

#### C. Influence de l'origine des P.P.A.:

La composition biochimique des P.P.A. évoluant au cours de la culture, la question est de savoir s'il en résulte des modifications de leurs propriétés stimulantes sur la croissance. Plusieurs séries de pré-cultures de 4, 7, 10 et 14 jours respectivement ont été réalisées pour extraire les quantités de P.P.A. nécessaires aux essais et les poudres ont été finalement mélangées dans les deux premiers cas (pré-cultures de 4 et 7 jours). Trois séries expérimentales, comprenant chacune 2 flacons dans lesquels 5 mg de P.P.A. ont été introduits avant l'ensemencement, ont été réalisées successivement. Les mesures de la croissance (M.F.) et de l'excrétion des P.P.A. ont été effectuées après 14 jours de culture.

Les résultats réunis dans le tableau III-4, attestent que les effets stimulants provoqués par l'addition d'une même quantité de P.P.A. s'accroissent avec l'augmentation de la durée de la pré-culture qui a permis de les produire. Les différences de M.F. mesurées dans les différentes conditions sont à chaque fois significatives par rapport aux témoins mais la stimulation la plus efficace est obtenue indifféremment avec des P.P.A. de 10 ou de 14 jours. L'excrétion de nouveaux P.P.A. dans les milieux de culture évolue parallèlement à la croissance, conformément à toutes les observations préalables. Enfin, des effets inhibiteurs ont été constatés en présence de P.P.A. issus d'une pré-culture de 14 jours. Ces derniers cas n'ont pas été pris en compte pour établir les résultats présentés. La question est de savoir si les conditions d'extraction et de conservation des échantillons n'ont pas été modifiées.

#### D. Mise en évidence d'effets inhibiteurs . :

L'ensemble des essais réalisés au cours de cette étude a été réexaminé, notamment les résultats négatifs obtenus en présence de doses de P.P.A. habituellement stimulantes. Les échantillons ont été regroupés arbitrairement en deux classes, selon le pourcentage d'inhibition de croissance observé.

TABLEAU III-4 : Effet des P.P.A. extraits après différents temps de culture et introduits dans les milieux neufs avant l'ensemencement, sur la croissance des suspensions cellulaires de silène et sur l'excretion de P.P.A., après 14 jours de culture.

Origine et quantités de P.P.A. ajoutés (mg l <sup>-1</sup> )		Croissance (M.F.en g)	excrétion de P.P.A. (mg)
Témoin	(0)	37,2 ± 2,9 (6)	26 ± 6 (6)
4 jours	(25)	41,2 ± 1,0 (4)	35 ± 2 (4)
7 jours	(25)	45,7 ± 3,9 (6)	40 ± 4 (6)
10 jours	(25)	48,2 ± 4,2 (6)	43 ± 7 (6)
14 jours	(25)	48,8 ± 4,2 (4)	41 ± 6 (4)*

\* 2 flacons présentaient des effets inhibiteurs.



La croissance des pré-cultures a été notée, les moyennes calculées et comparées à celles produisant des P.P.A. stimulants. Aucune relation significative ne peut être dégagée entre les propriétés des P.P.A. et les antécédents culturels des suspensions cellulaires qui les ont excrétés. Cependant, il faut noter que seules les pré-cultures de durée au moins égale à 14 jours produisent des P.P.A. inhibiteurs. Par ailleurs, certains flacons présentent, en fin de culture, des particules qui flottent à la surface du milieu. Recueillis avec soin, rincés abondamment puis lyophilisés, ces composés sont introduits, toujours à la même dose ( $25 \text{ mg.l}^{-1}$ ), dans des milieux de culture neufs. Ils se dissolvent très difficilement et provoquent toujours une inhibition sévère de la croissance des suspensions cellulaires (figure III-5). Lorsque le volume du milieu est réduit avant de précipiter des P.P.A. par le C.T.A.B. (voir figure III-2), les polymères du milieu s'agglutinent sous forme de particules flottantes semblables à celles présentes dans les flacons, en fin de culture (voir figure II-12). Les particules, isolées et préparées comme précédemment, s'avèrent également inhibitrices de la croissance des suspensions cellulaires (figure III-5). Comme l'analyse biochimique de ces particules révèle des différences nettes par rapport aux P.P.A. issus des mêmes milieux, le procédé de préparation peut être mis en cause pour expliquer l'inversion des effets observés.

## 2 - Effets des P.P.A. après fractionnement.

Les composés d'origine pariétale dont les effets biologiques ont été décrits dans la littérature, sont essentiellement des oligosaccharides (entre 7 et 12 radicaux glycosyls). Pour attribuer plus précisément les effets provoqués par les P.P.A. bruts, ceux-ci ont été séparés en fonction de leur masse et de leur densité de charge.

### A. Fractionnement par dialyse et tamisage moléculaire :

Après 14 jours de culture, les contenus de 6 flacons sont filtrés, ce qui permet de collecter 1 litre de milieu. La moitié sert à préparer des P.P.A. selon la technique habituelle. Ceux-ci sont ensuite divisés en deux lots égaux dont l'un est dialysé à travers une bougie (Millipore 10000) pour recueillir séparément les polymères dans le rétentat et les oligomères dans le dialysat.

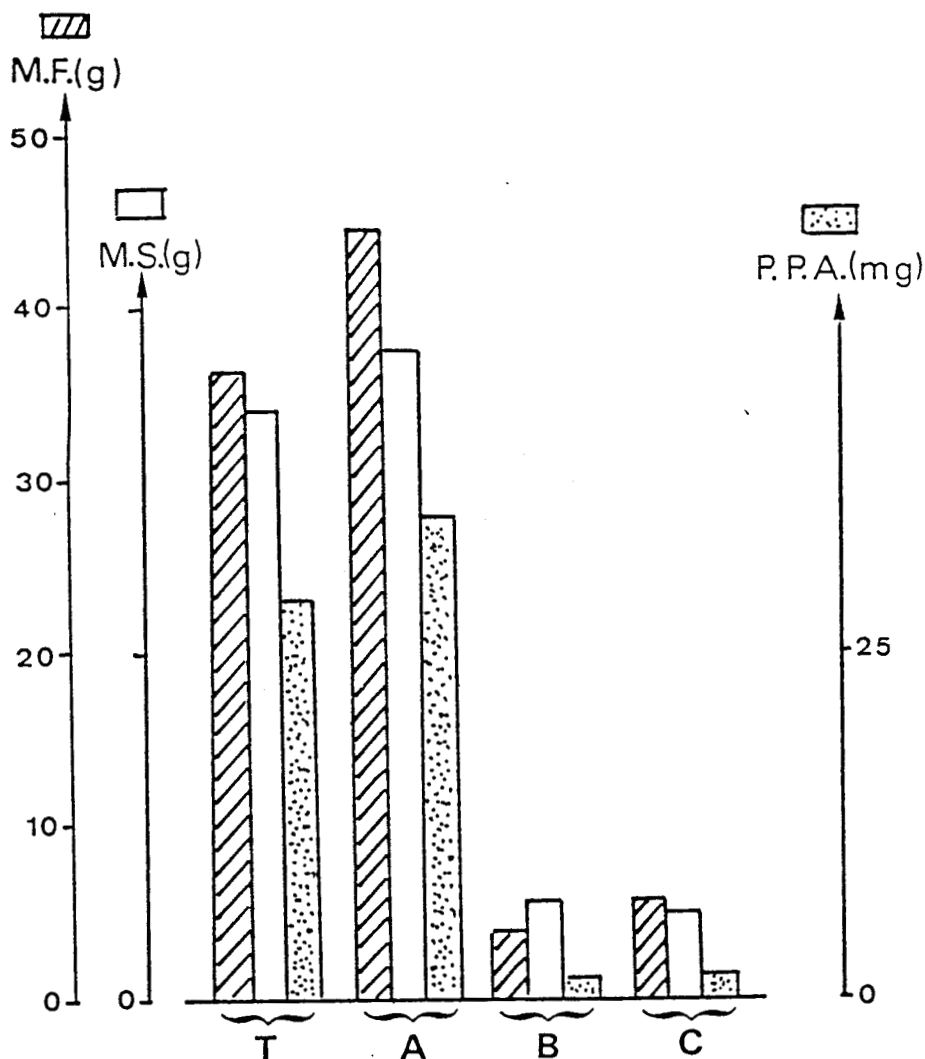


Figure III.5 : Comparaison entre les effets provoqués sur la croissance (M.F. et M.S. en g/flacon) et sur l'excrétion de nouveaux P.P.A. (mg/flacon), par l'introduction de polymères recueillis par différentes voies, à partir de milieux de culture de 14 jours.

Les polymères sont introduits dans les milieux neufs, à raison de 25 mg.l<sup>-1</sup>.

A : P.P.A. extraits par précipitation au C.T.A.B.

B : amas polysaccharidiques en suspension, recueillis directement dans le milieu de culture.

C : amas polysaccharidiques formés pendant la réduction sous vide du volume du milieu de culture.

Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5 %, n = 6.

La seconde moitié du milieu est concentrée sous vide puis chromatographiée sur un gel Sephadex G 25, élué par l'eau distillée. Après élimination des 3/4 du volume mort de la colonne, des fractions de 10 ml sont collectées, tout en contrôlant le profil d'éluion par la mesure simultanée de la lumière transmise à 265 nm (figure III-6, A). Les fractions correspondantes, obtenues par plusieurs chromatographies successives, sont mélangées puis lyophilisées.

Introduites dans des milieux de culture neufs à raison de  $25 \text{ mg.l}^{-1}$  (figure III-6, B), les poudres correspondant à chacune des fractions provoquent des effets différents sur la croissance. Celle-ci, exprimée par rapport à celle des témoins (100 %), s'avère tantôt activée, tantôt inhibée. En fin de culture, le milieu contient donc en mélange des molécules susceptibles d'interférer sur la croissance des suspensions cellulaires, favorablement ou non. Les fractions 6 et 7, correspondant à l'optimum du premier pic élué (P), présentent les effets stimulants les plus nets mais les fractions voisines sont sans effet ou inhibitrices de telle sorte que l'ensemble (fractions 4 à 8 mélangées) ne favorise la croissance que faiblement (8,5 % d'augmentation de M.F.).

Les P.P.A., remis en solution dans l'eau distillée, peuvent également être soumis à un tamisage moléculaire sur un gel Sephadex G 25 (figure III-7, A). Le profil d'éluion à 265 nm est beaucoup plus simple, avec un premier pic (P') correspondant aux fractions 5 à 7 et un second moins important dans la 10ème fraction. Introduits dans des milieux de culture neufs, dans les mêmes conditions que précédemment, les fractions du pic P' stimulent activement la croissance alors que les composés élués dans la 10ème fraction sont légèrement inhibiteurs (figure III-7, B).

Ces résultats concordent avec ceux obtenus en introduisant dans les milieux de culture neufs, des masses égales de poudres provenant du rétentat ou du dialysat des P.P.A. bruts (tableau III-5). Les polymères retenus par la bougie stimulent davantage la croissance que les P.P.A. non dialysés alors que les oligomères du dialysat s'avèrent inhibiteurs.

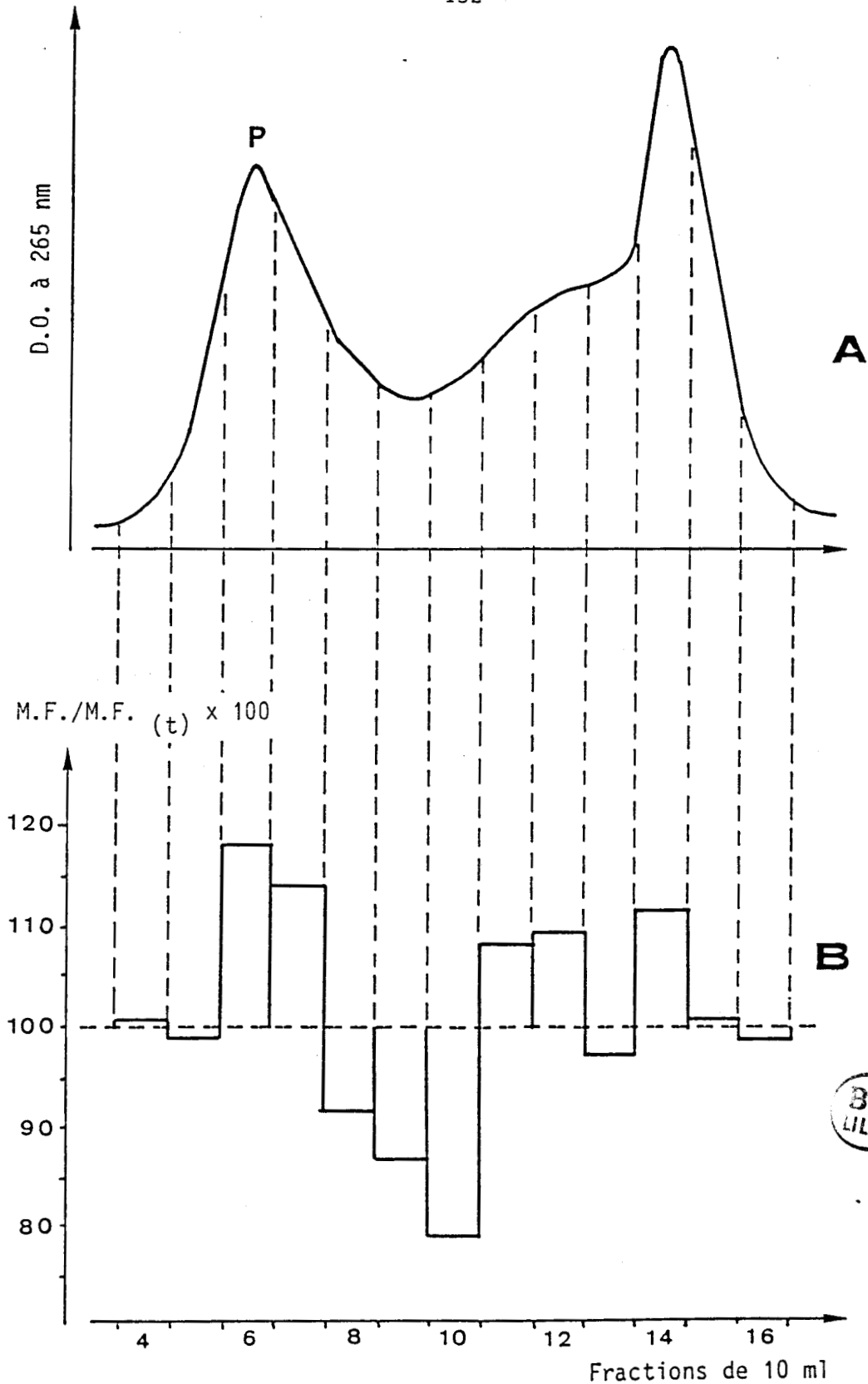


Figure III.6 : Distribution des effets provoqués sur la croissance, par les constituants du milieu de culture, après leur fractionnement par tamisage moléculaire.

A : profil d'éluion à 265 nm de la séparation sur gel séphadex G 25, d'un milieu de culture de 14 jours.

B : effets des différentes fractions introduites dans les milieux neufs à raison de  $25 \text{ mg.l}^{-1}$ , sur la croissance ( $M.F./M.F._t \times 100$ ) de la suspension cellulaire de silène après 14 jours de culture.

Les résultats sont la moyenne de 2 séries d'essais indépendants.



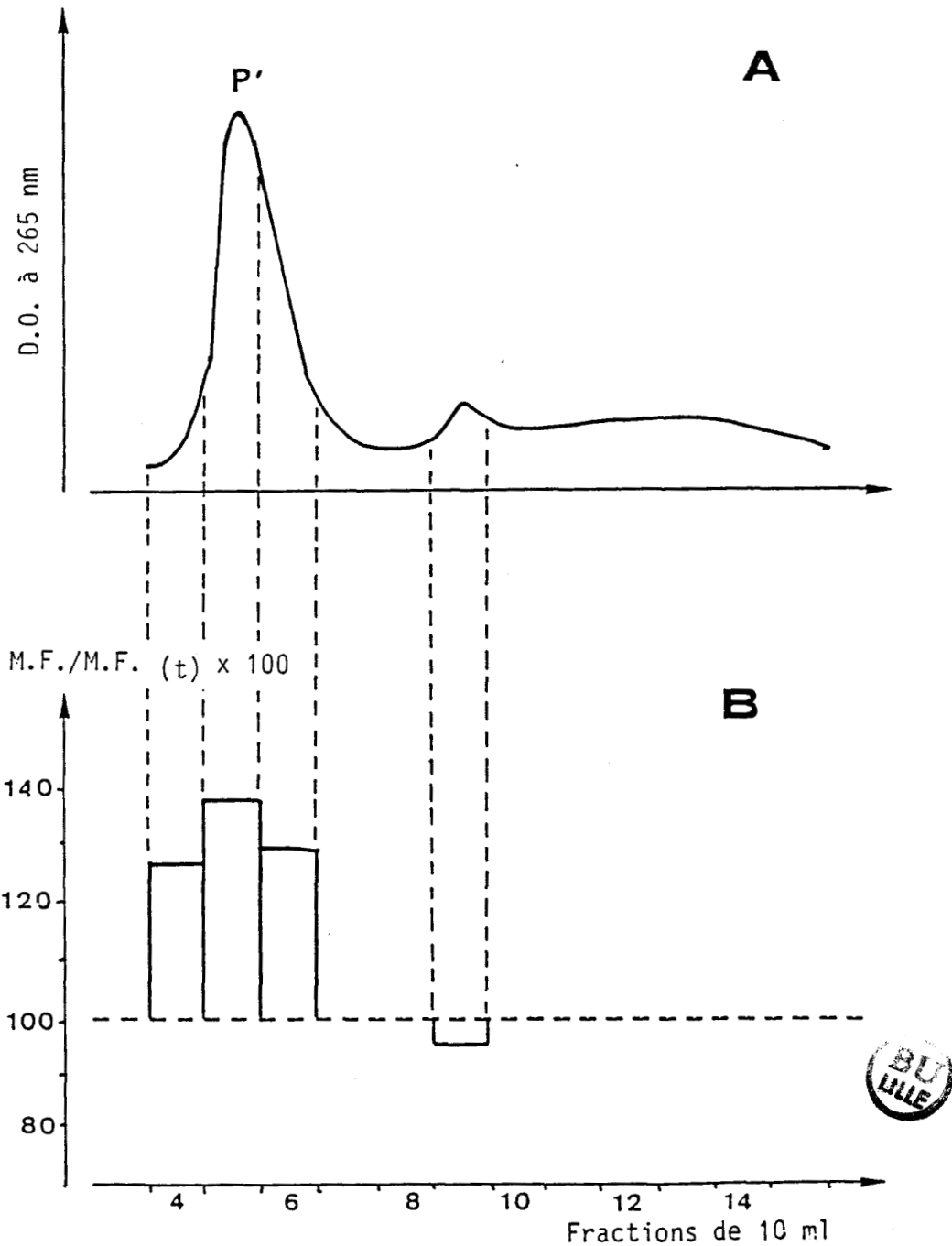


Figure III.7 : Distribution des effets provoqués sur la croissance, par des P.P.A. extraits par précipitation au C.T.A.B. et fractionnés par tamisage moléculaire.

A : profil d'éluion à 265 nm du fractionnement sur un gel G 25, des P.P.A. extraits d'un milieu de culture de 14 jours.

B : effets des différentes fractions réintroduites dans les milieux neufs à raison de  $25 \text{ mg.l}^{-1}$ , sur la croissance ( $\text{M.F./M.F.}_t \times 100$ ) de la suspension cellulaire de silène, après 14 jours de culture. Les résultats sont la moyenne de 2 séries d'essais indépendants.

TABLEAU III-5 : Comparaison des effets respectifs provoqués par les P.P.A. bruts et dialysés sur la croissance de la suspension cellulaire de silène (14 jours de culture).

Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5%, n = 4.

Conditions	CROISSANCE			
	MF		MS	
	(g)	(%)	(g)	(%)
Témoin	38,4 ± 3,4	(100)	1,79 ± 0,15	(100)
+P.P.A. bruts (5 mg)	45,3 ± 3,7	(118)	1,90 ± 0,17	(106)
+P.P.A. dialysés (5mg)	49,5 ± 4,1	(129)	1,88 ± 0,14	(105)
+ dialysat P.P.A.	17,2 ± 2,9	(45)	0,47 ± 0,09	(26)



B. Fractionnement par chromatographie d'échange d'ions :

Comme l'a montré l'analyse biochimique, les polysaccharides excrétés dans le milieu de culture sont des mélanges de plusieurs catégories de polymères et parmi eux, les P.P.A. se composent à la fois d'acides uroniques (20 à 80 %), de saccharides neutres (20 à 50 %) et de protéines (1 à 7 %). La présence de radicaux chargés permet de séparer les différents constituants après les avoir préalablement fixés sur une résine échangeuse d'anions, en les décrochant sélectivement par des concentrations croissantes d'un sel à forte affinité (NaCl).

Les fractions correspondant au premier pic (P), isolé par tamisage moléculaire, sont mélangées puis introduites dans une colonne chargée par un gel DEAE-Sephadex A 50. Une première élution par l'eau distillée permet de recueillir les composés sans charge apparente (Po). Les autres polymères sont ensuite séparés par un gradient discontinu de solutions de NaCl de concentrations croissantes (0,1 à 5 M). Le profil d'élution est suivi par la mesure de la lumière transmise à 265 nm (figure III-8, A), ce qui permet de mettre en évidence 4 autres pics. Les 6 fractions éluées par le NaCl sont ensuite dialysées puis lyophilisées. Les poudres sont ensuite introduites dans des milieux de culture neufs à raison de 5 ou 25 mg.l<sup>-1</sup> pour étudier les effets respectifs qu'elles provoquent sur la croissance des suspensions cellulaires (figure III-8, B). La fraction Po, élue à l'eau distillée est activatrice à faible dose mais perd son efficacité à concentration plus élevée. Toutes les autres fractions sont d'autant plus activatrices qu'elles sont chargées et utilisées à forte dose.

Le même procédé est utilisé pour séparer, en fonction de leur densité de charge, les polymères du pic P', isolés préalablement par tamisage moléculaire des P.P.A.. L'élution par l'eau puis par des solutions de NaCl de force ionique croissante permet de séparer 4 fractions qui sont repérées par la variation de lumière transmise à 265 nm (figure III-9, A). Une fois dialysés et lyophilisés, les différents P.P.A. sont introduits dans des milieux de culture neufs (25 mg.l<sup>-1</sup>). Ils activent d'autant plus la croissance des suspensions cellulaires que leur densité de charge est plus élevée (figure III-9, B).

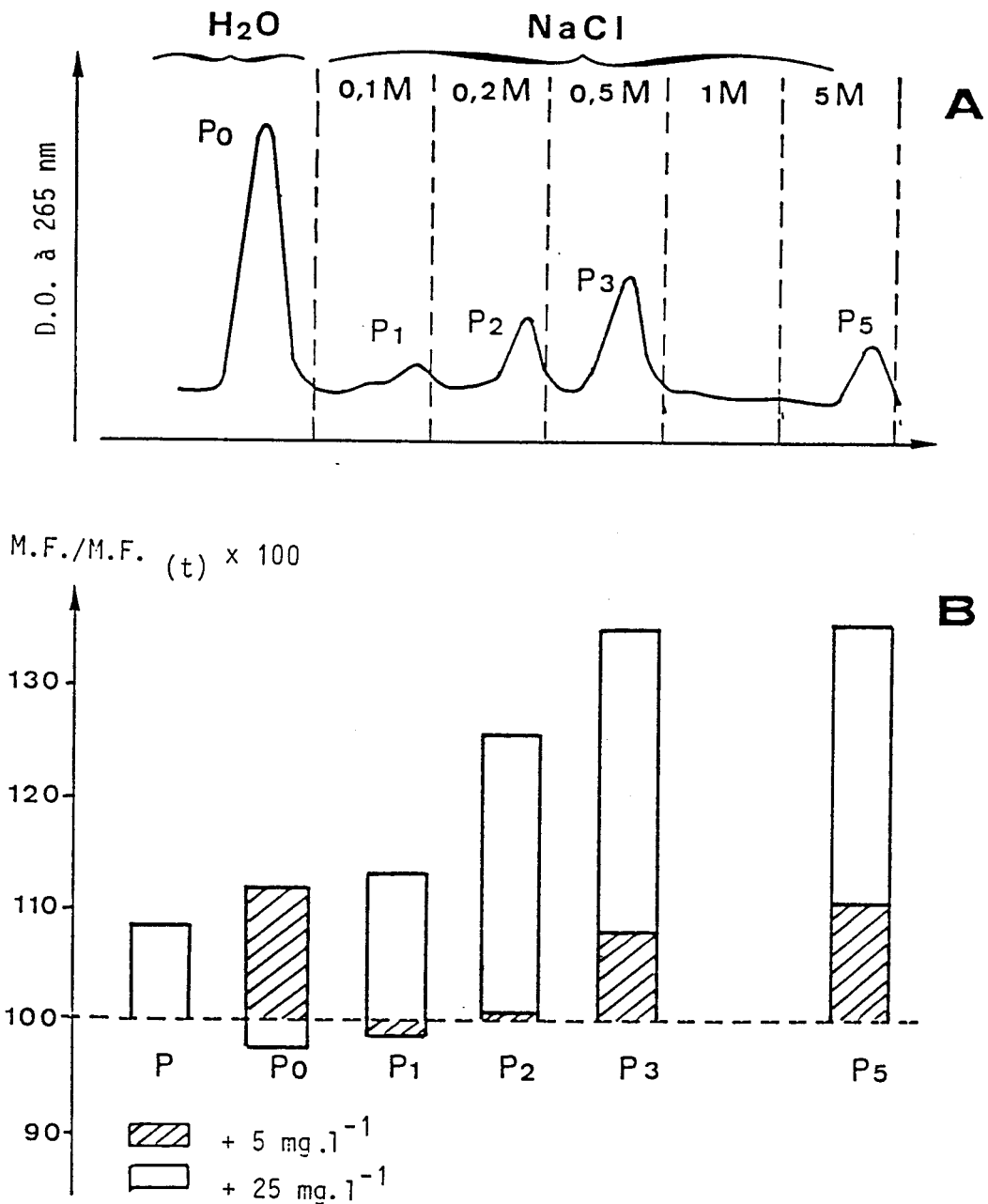


Figure III.3 : Distribution des effets provoqués sur la croissance, par des polymères du milieu de culture, après fractionnements successifs par tamisage moléculaire puis par chromatographie d'échange d'ions.

A : profil d'éluion à 265 nm du fractionnement sur DEAE séphadex A 50, par H<sub>2</sub>O puis NaCl (0.1 à 5 M.l<sup>-1</sup>), du pic (P) obtenu par tamisage moléculaire au milieu de culture.

B : effets des différentes fractions réintroduites dans les milieux neufs à raison de 5 et 25 mg.l<sup>-1</sup>, sur la croissance (M.F./M.F.<sub>t</sub> x 100) de la suspension cellulaire de silène, après 14 jours de culture. Les résultats sont la moyenne de 2 séries d'essais indépendants.

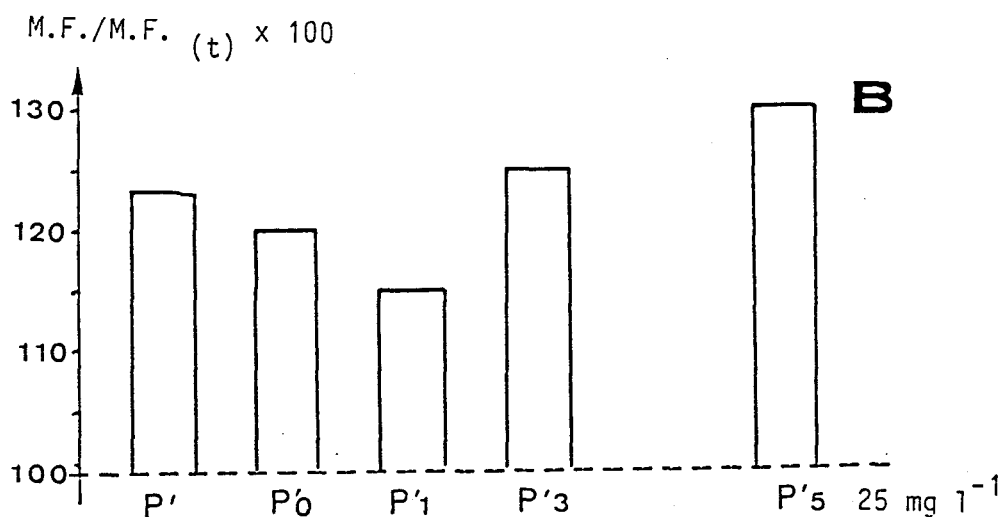
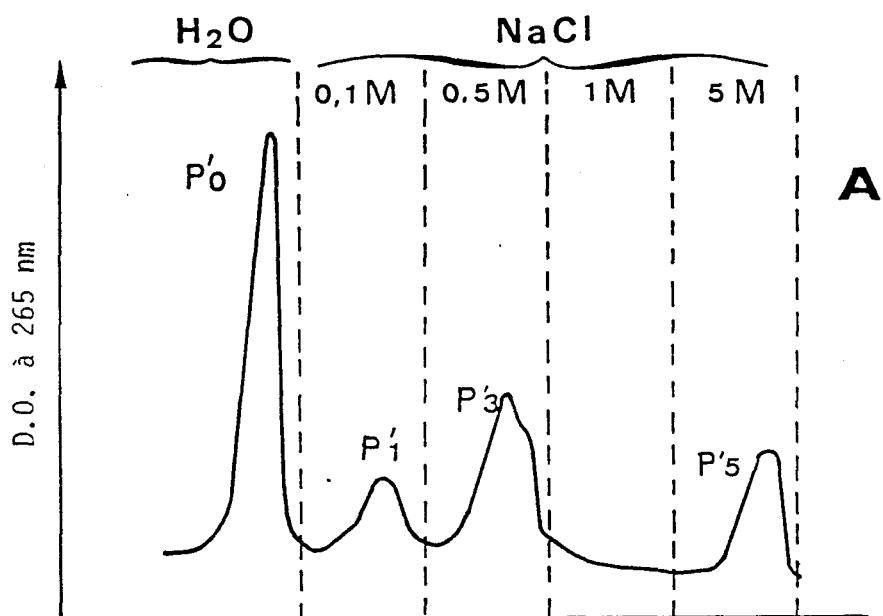


Figure III.9 : Distribution des effets provoqués sur la croissance, par des P.P.A. extraits par précipitation au C.T.A.B., après fractionnements successifs par tamisage moléculaire puis par chromatographie d'échange d'ions.

A : profil d'éluion à 265 nm du fractionnement sur DEAE séphadex A 50, par H<sub>2</sub>O puis NaCl (0.1 à 5 M.l<sup>-1</sup>), du pic (P') obtenu par tamisage moléculaire des P.P.A.

B : effets des différentes fractions réintroduites dans les milieux neufs à raison de 25 mg.l<sup>-1</sup>, sur la croissance (M.F./M.F.<sub>t</sub> x 100) de la suspension cellulaire de silène, après 14 jours de culture. Les résultats sont la moyenne de 2 séries d'essais indépendants.



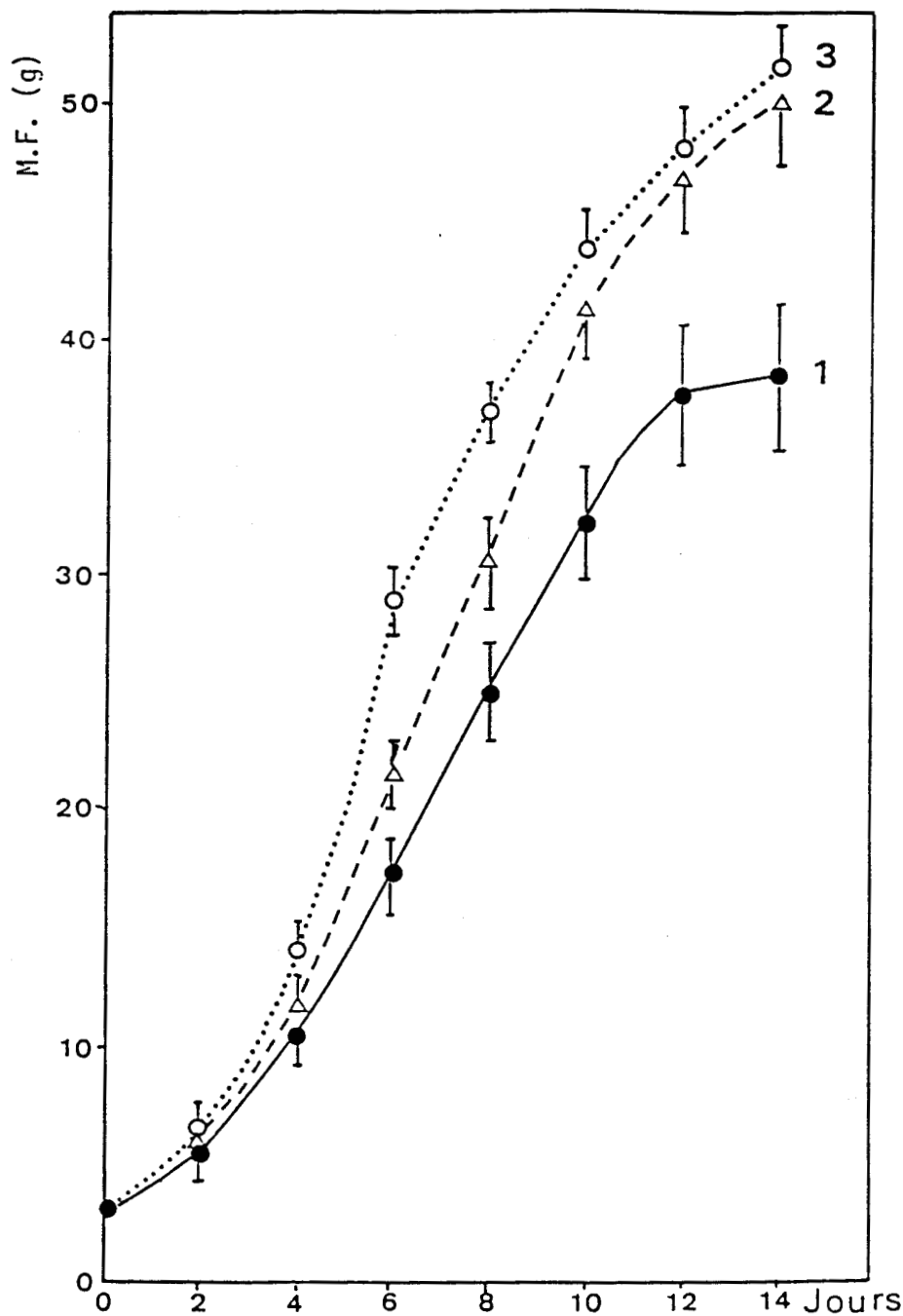


Figure III.10 : Effets provoqués sur la croissance (M.F. en g/flacon) de la suspension cellulaire de silène, par l'addition de P.P.A. bruts ou de P.P.A. (H<sup>+</sup>).

1 : milieu témoin (sans P.P.A.)

2 : addition de P.P.A. bruts (25 mg.l<sup>-1</sup>)

3 : addition de P.P.A. (H<sub>+</sub>) (25 mg.l<sup>-1</sup>)

Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5 %, n = 6.

Les méthodes très simples, utilisées pour séparer les différents constituants en solution dans le milieu après un cycle de culture de 14 jours, permettent de montrer que les P.P.A. isolés initialement par précipitation au C.T.A.B. constituent en fait un mélange complexe, de nature principalement polysaccharidique. L'effet global qu'il provoque sur la croissance peut masquer les effets stimulants des composés les plus lourds et les plus chargés.

### 3 - Effets des P.P.A. après traitements physico-chimiques.

Les expériences précédentes ont montré que parmi les polysaccharides excrétés dans le milieu de culture, ceux qui possèdent la densité de charge la plus élevée sont également ceux qui s'avèrent les plus actifs pour stimuler la croissance. Pour préciser davantage le mode d'action des P.P.A., les groupements acides ont été protonés ou démasqués (saponification des fonctions estérifiées) en vue d'examiner les conséquences de ces traitements sur les propriétés activatrices de la croissance.

#### A. Protonation des groupements acides :

Les P.P.A. bruts, comme les différentes fractions recueillies après chromatographie sur DEAE-Sephadex, se présentent sous forme de sels sodiques et le pH des solutions est compris entre 6 et 6,8 après dialyse. Ils sont alors passés sur une résine Dowex 50 x 8 sous forme  $H^+$  qui fixe donc les contre-ions en libérant des protons. Le pH des solutions de P.P.A. est alors compris entre 2,6 et 3,4.

Lorsqu'ils sont introduits dans des milieux de culture neufs sous cette forme, les P.P.A. n'en modifient pas le pH initial (voir précédemment). Qu'il s'agisse des P.P.A. bruts (P') ou des fractions isolées par chromatographie d'échange ionique, ils provoquent une légère amélioration des effets stimulants, même si les différences ne sont pas statistiquement significatives (tableau III-6). L'évolution des effets observés au cours de la culture (figure III-10) révèle que, sous forme  $H^+$ , les P.P.A. de la fraction P' stimulent principalement l'augmentation de M.F. pendant la première partie du cycle de culture, la différence n'étant significative qu'entre les 6ème et 8ème jours de culture.

TABLEAU III-6 : Comparaison des effets produits sur la croissance par des P.P.A. séparés par chromatographie d'échange d'ions (DEAE Séphadex A 50) puis modifiés (forme H) ou non

Les résultats correspondent à la moyenne de 2 essais indépendants. Les intervalles de confiance n'ont pas été calculés.

Références des fractions ajoutées (25 mg l <sup>-1</sup> )	CROISSANCE	
	Témoin	Forme H
P'	48,5	50,2
P'1	44,2	48,1
P'3	49,8	52,1
P'5	51,4	53,8





Simultanément, la variation du pH du milieu de culture s'infléchit (voir figure III-4), avant d'atteindre celle obtenue en présence de P.P.A. bruts. Il semble, en première analyse, que la stimulation de la croissance soit une conséquence du ralentissement de l'élévation du pH. De plus, le fait que les groupements carboxyliques soient protonés au moment de leur introduction dans le milieu de culture peut également modifier la disponibilité des cations bivalents, notamment le calcium, dont l'affinité à l'égard des charges acides libres a été démontrée.

#### B. Déestérification des groupements carboxyles :

Certains groupements carboxyliques sont estérifiés comme l'ont montré les résultats présentés dans le chapitre précédent. Après titration, les échantillons sont soumis à une déestérification par NaOH 1 N, suivie d'une neutralisation par une quantité identique d'HCl 1 N. Le supplément d'acidité qui apparaît est de nouveau titré, ce qui permet de calculer le degré d'estérification des acides uroniques. Les charges démasquées sont de nouveau protonées avant que les P.P.A. ne soient utilisés pour mesurer leurs effets sur la croissance.

Les P.P.A. sont répartis en deux classes selon leur degré d'estérification plus ou moins élevé. En dépit du nombre assez restreint d'essais effectués, il semble que les effets stimulants s'accroissent légèrement lorsque les P.P.A. sont davantage estérifiés initialement (tableau III-7). La fraction neutre (P'o), séparée par chromatographie d'échange ionique, a été soumise aux mêmes traitements. Elle favorise alors la croissance comme précédemment. Ainsi, c'est probablement le démasquage de nouveaux sites acides qui est à l'origine de ce regain de stimulation de la croissance cellulaire.

## II. EFFETS DES P.P.A. SUR D'AUTRES SYSTEMES BIOLOGIQUES

Parallèlement aux nombreux essais entrepris pour caractériser et comprendre les effets stimulateurs des P.P.A., ceux-ci ont été utilisés pour mesurer leur efficacité sur d'autres systèmes biologiques. Il s'agit de préciser la nature de ces effets, notamment leur spécificité, et de les comparer avec ceux déjà bien connus des substances de croissance (auxines et gibbérellines).

TABLEAU III-7 : Influence d'un traitement de déestérification des acides uroniques sur les effets produits par les P.P.A. sur la croissance de la suspension cellulaire de silène.

Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5%, n = 4. Ils ne sont pas calculés pour la fraction P'0 dont les résultats des effets ne sont que la moyenne de 2 essais indépendants.

CROISSANCE		
Références des P.P.A.		
(taux d'estérification)	Témoin	Forme H
P.P.A. classe I ( < 20 % )	48,2 ± 3,5	51,8 ± 3,0
P.P.A. classe II ( 30 à 40% )	45,8 ± 3,9	52,2 ± 2,4
Fraction P'0	46,1	51,4



## 1 - Effets sur la croissance.

Dans un premier temps, l'expérimentation a été limitée à deux autres suspensions cellulaires, celles d'érable et de ronce. Ensuite, les essais ont été étendus aux lentilles d'eau. Ce sont des végétaux aquatiques dont le développement végétatif est très rapide, lorsque les conditions sont favorables. Elles sont également très sensibles aux variations des qualités nutritionnelles de leur milieu de culture.

### A. Effets sur la croissance des suspensions cellulaires d'Érable et de Ronce :

Les suspensions cellulaires de silène et d'érable sont cultivées dans le milieu nutritif de LAMPORT modifié par LESCURE (1966) et celle de ronce sur celui de HELLER (1953). La croissance est suivie en mesurant les M.F. et M.S., après respectivement 14, 20 et 30 jours de culture, pour chacune des trois suspensions considérées. Le même protocole est appliqué scrupuleusement dans tous les essais (ensemencement par 3 g de M.F., introduction de  $25 \text{ mg.l}^{-1}$  de P.P.A.). Les diagrammes présentés sur la figure III-11 montrent que l'addition des P.P.A. de silène dans les milieux de culture stimule légèrement la croissance des trois suspensions cellulaires, ce qui indique que ces effets ne présentent pas de spécificité à l'égard de la souche qui les produit. Cependant, l'augmentation de M.F. ne dépasse pas 10 % et n'est pas significative pour la suspension cellulaire de ronce alors qu'elle est comprise entre 25 et 30 % pour les deux autres souches. Les variations de M.S. ne sont pas significatives, ce qui confirme que l'effet des P.P.A. affecte principalement le grandissement cellulaire, en favorisant l'entrée d'eau dans les cellules. Il en résulte une augmentation de l'excrétion de P.P.A. par les trois suspensions cellulaires et en particulier par celle d'érable. Dans ces conditions, la libération des P.P.A. dans les milieux de culture apparaît comme l'expression au niveau pariétal de la réponse du métabolisme cellulaire à une stimulation externe.

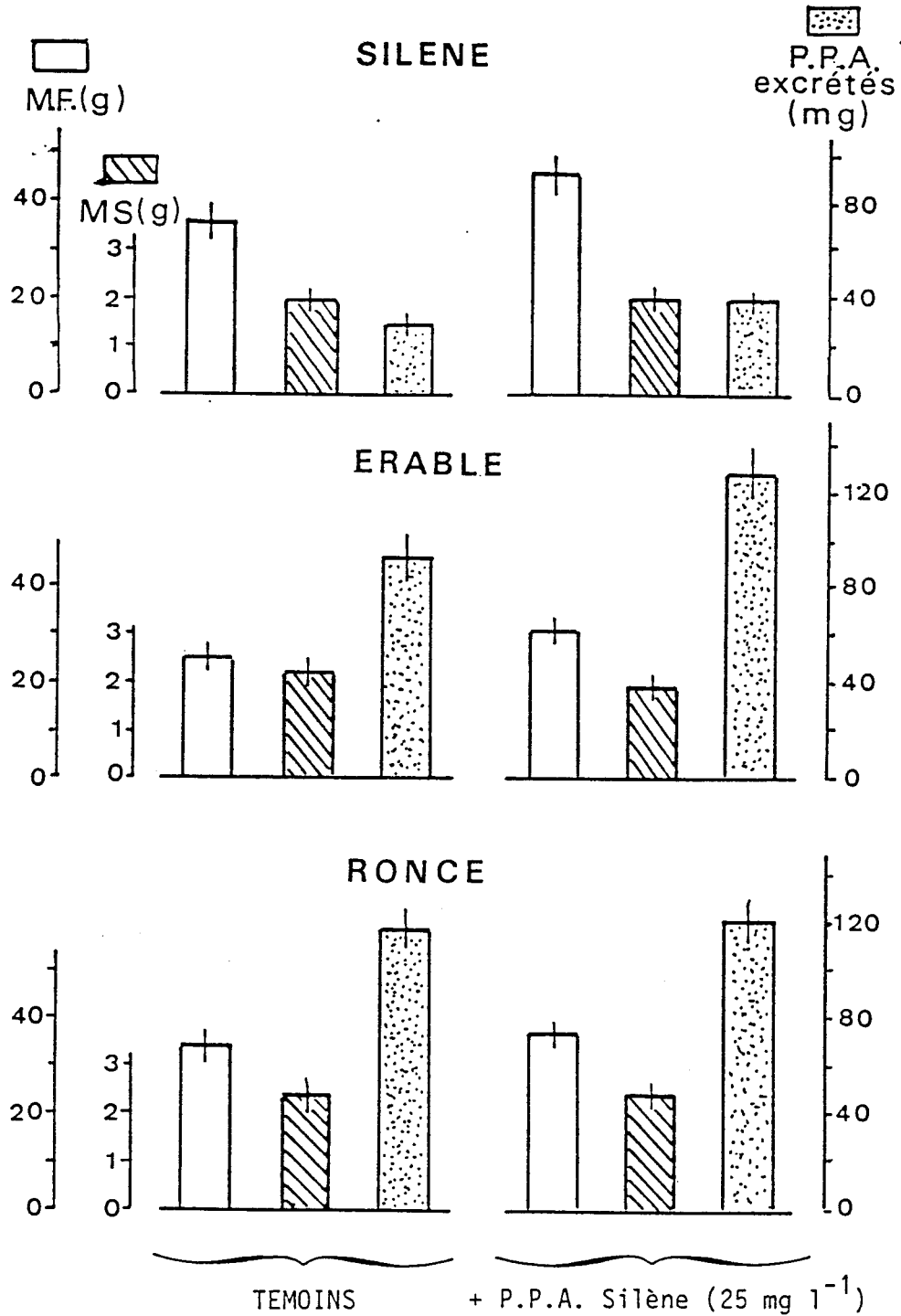


Figure III.11 : Effets provoqués par l'addition de P.P.A. de silène, dans les milieux de culture neufs des suspensions cellulaires de silène, d'érable et de ronce, sur leur croissance (M.F. et M.S. en g par flacon) et sur l'excrétion de nouveaux P.P.A. (mg par flacon).

Ensemencement :  $3 \pm 0.2$  g de M.F. par flacon.  
 Durées des cultures : 14 jours (silène), 20 jours (érable) et 30 jours (ronce).

Cette absence de spécificité se confirme d'ailleurs puisque les P.P.A. excrétés par les suspensions cellulaires de ronce et d'érable s'avèrent tout autant inhibiteurs de la croissance des souches qui les produisent que de celle des autres espèces (tableau III-8). L'inhibition est très marquée (supérieure à 80 %) et il ne subsiste dans le milieu que des traces de P.P.A. en fin de culture, ce qui confirme que ceux qui ont été introduits ont été absorbés et qu'aucune libération de nouveaux P.P.A. n'intervient malgré la lyse de nombreuses cellules.

#### B.Effets des P.P.A. sur la multiplication végétative des Lentilles d'eau :

Les lentilles d'eau (Lemna minor L.) sont des végétaux aquatiques dont les frondes se développent activement dès que les conditions de température et d'ensoleillement deviennent favorables, à la surface des plans d'eau et des canaux à faible débit et ce d'autant mieux que les eaux sont enrichies en azote. Ces végétaux ont été fréquemment utilisés comme matériel d'essais en raison de leur sensibilité aux facteurs nutritionnels. Ils sont cultivés dans des flacons d'Erlenmeyer sur un milieu minéral simple (MORVAN et al., 1983) et l'introduction d'une dizaine de frondes permet après 4 semaines de culture de recouvrir complètement la surface disponible. La croissance est suivie aisément en comptant le nombre de frondes ou en mesurant la surface et la masse moyenne des frondes sur des lots de 25 échantillons. L'introduction de P.P.A. de silène, à des doses comprises entre 5 et 25 mg.l<sup>-1</sup>, stimule la multiplication végétative, représentée par l'augmentation régulière du nombre de frondes (figure III-12, B). La masse (figure III-12, A) et la surface moyenne des frondes (figure III-12, C) évoluent également au cours de la culture. Généralement les valeurs obtenues diminuent pendant la première semaine car l'apparition de jeunes frondes réduit artificiellement les valeurs moyennes calculées sur des échantillons récoltés au hasard. Ensuite, les deux paramètres augmentent à nouveau et l'effet favorable des P.P.A. se fait surtout sentir sur la masse moyenne des frondes qui augmente de 20 % en présence de la dose optimale de P.P.A. (25 mg.l<sup>-1</sup>). En fait, les masses sèches ne varient pratiquement pas en présence ou non de P.P.A.. Les effets stimulants se traduisent principalement au niveau de la multiplication végétative et secondairement par une légère augmentation de la teneur en eau, déjà très élevée chez ces végétaux aquatiques.

TABLEAU III-8 : Effets des P.P.A., extraits des milieux de culture des suspensions cellulaires de silène, d'érable et de ronce et réintroduits dans les milieux neufs, sur la croissance de ces trois souches.

Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5%, n = 6.

CROISSANCE (M.F. en g)			
Origine et quantités de P.P.A. additionnés (mg.l <sup>-1</sup> )	silène	érable	ronce
Témoin sans P.P.A	36,5 ± 3,2	24,8 ± 2,8	34,5 ± 3,6
+P.P.A. silène (25mg.l <sup>-1</sup> )	45,8 ± 5,5	30,6 ± 3,1	37,2 ± 2,2
+P.P.A. érable (25mg.l <sup>-1</sup> )	10,2 ± 4,8	7,2 ± 1,1	5,8 ± 1,9
+P.P.A. ronce (25mg.l <sup>-1</sup> )	3,2 ± 0,8	2,2 ± 0,9	1,2 ± 1,1



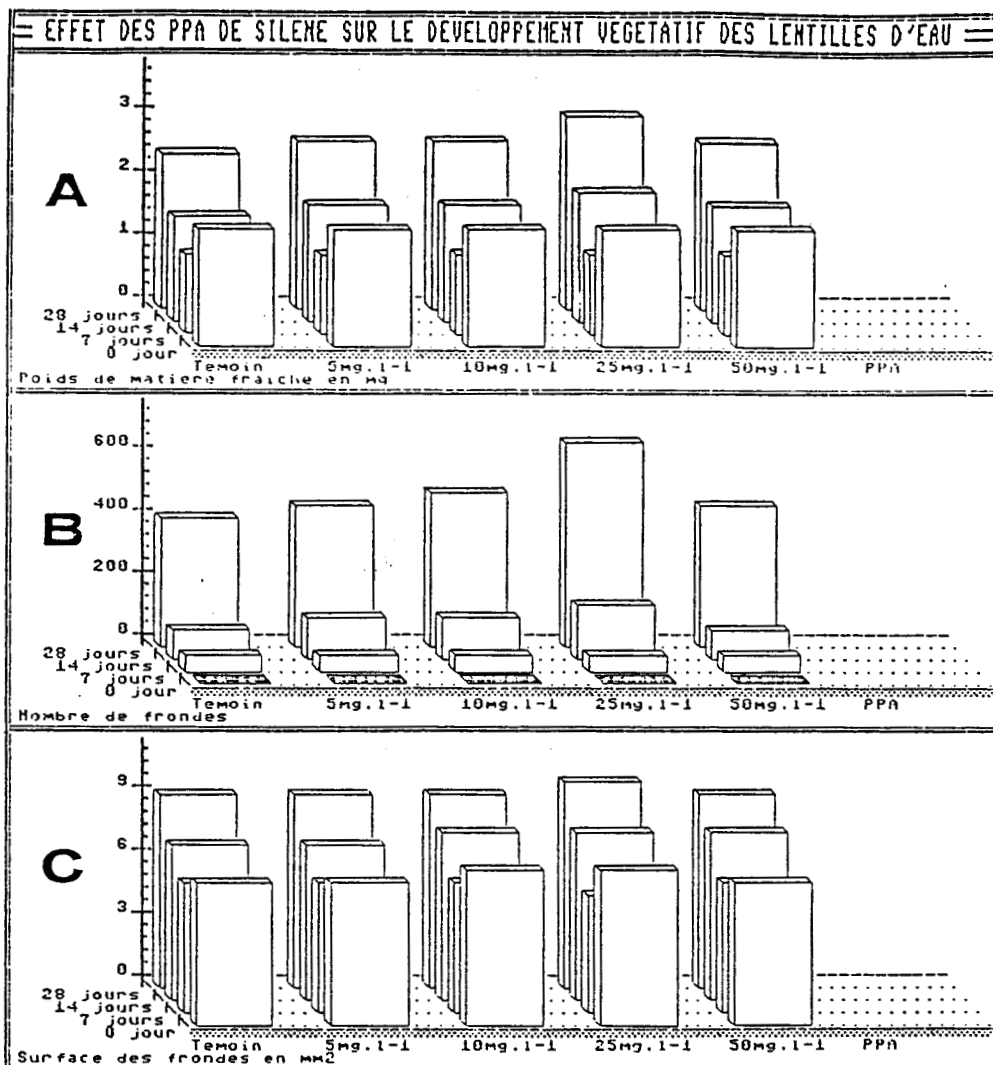


Figure III.12 : Effets provoqués par l'addition de P.P.A. de silène, sur le développement végétatif des lentilles d'eau.

A : masse fraîche moyenne d'une fronde (mg)

B : nombre de frondes par flacon (ensemencement par fronde)

C : surface moyenne d'une fronde (mm<sup>2</sup>).

Les mesures sont faites après 7, 14 et 28 jours de culture. Les valeurs exprimées sont les moyennes de 20 mesures (A et C) ou 5 dénombrements (B).



TABLEAU III-9 : Croissance des plantules de concombre mises à germer sur différentes solutions de 2,4-D.

La croissance est exprimée par la longueur totale des plantules après 2, 3 et 4 jours de culture. Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5 %,  $18 < n < 58$ .

Solution d'imbibition	Longueur des plantules (mm)		
	2 jours	3 jours	4 jours
Témoins	19,50 ± 5,50	32,67 ± 5,08	47,78 ± 2,14
+2,4-D 10 <sup>-8</sup>	26,50 ± 5,24	40,49 ± 4,82	61,06 ± 2,54
+2,4-D 10 <sup>-7</sup>	15,83 ± 3,38	17,66 ± 2,87	34,34 ± 2,23
+2,4-D 10 <sup>-6</sup>	7,72 ± 1,32	8,03 ± 1,52	17,77 ± 1,60
+2,4-D 10 <sup>-5</sup>	4,32 ± 0,58	4,96 ± 0,51	7,31 ± 0,69





## 2. Effets analogues à ceux de facteurs de croissance.

Par définition, toute substance d'origine organique, agissant sur la croissance ou le développement des végétaux à des doses trop faibles pour attribuer à leur action un caractère trophique, peut être considérée comme un facteur de croissance. Une étude bibliographique des nombreux travaux qui ont été consacrés à ces substances et à leurs multiples effets, permet de définir le domaine d'étude le plus intéressant. En agissant à la fois sur l'élongation cellulaire et sur le métabolisme des parois, les auxines et les gibbérellines sont les facteurs de croissance dont les effets s'apparentent le plus à ceux provoqués par les P.P.A.

### A. Mise en évidence d'une synergie avec le 2,4-D :

Très utilisé pour la culture des suspensions cellulaires en raison de sa capacité à faciliter la dissociation cellulaire, le 2,4-D est une auxine de synthèse qui présente d'autre part des effets inhibiteurs sur les végétaux entiers, selon la dose à laquelle il est utilisé. Parmi les végétaux qui sont sensibles à son action, le concombre (Cucumis sativus L.) est considéré comme un outil biologique du dosage du 2,4-D. Sa germination ou plus exactement l'élongation des plantules dépend directement de la concentration en 2,4-D introduite dans l'eau d'imbibition des graines.

Les graines de concombre sont mises à germer dans des boîtes de pétri, sur un double disque de papier filtre imprégné d'eau distillée dans laquelle sont dissoutes les substances à étudier. La mesure de la longueur des plantules peut se faire après 48 h de culture à l'obscurité mais il est parfois intéressant de prolonger de 1 ou 2 jours pour accentuer les écarts. Les plantules sont disposées entre deux plaques de verre et photographiées. La mesure de la longueur est alors effectuée au curvimètre, sur le document.

Les résultats obtenus en présence de doses croissantes de 2,4-D (0,1 à 10 mg.l<sup>-1</sup>), comparés à ceux acquis en présence d'eau distillée, pris comme témoins, apportent la confirmation que l'auxine inhibe sévèrement l'allongement des plantules (tableau III-9). Cet effet se manifeste à la fois au niveau de l'hypocotyle et de la racine.

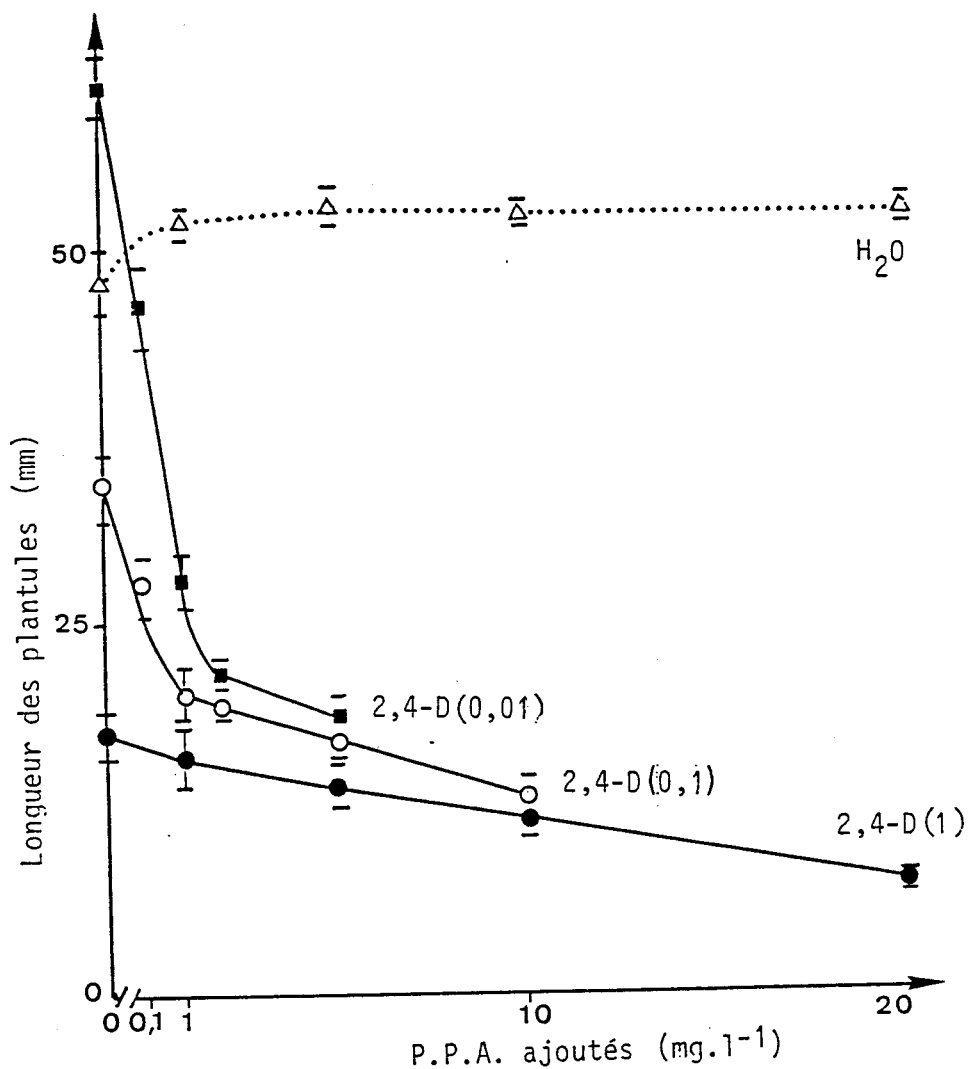


Figure III.13 : Effets combinés du 2,4-D et des P.P.A. de silice sur la croissance des plantules de concombre.

La croissance est exprimée par la longueur des plantules (mm) après 4 jours de culture. Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5 %, n = 40.

Les concentrations de 2,4-D utilisées sont exprimées en mg.l<sup>-1</sup> et indiquées entre parenthèses.



Morphologiquement les plantules sont très différentes et l'atrophie du système racinaire est évidente. Au contraire, une faible dose de 2,4-D ( $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$ ) stimule l'allongement des plantules. L'addition de P.P.A. dans l'eau distillée, à des doses comprises entre  $0,1$  et  $20 \text{ mg.l}^{-1}$ , n'affecte que très peu la croissance des plantules et provoque, tout au plus, un léger allongement de la racine principale (figure III-13). Par contre, l'addition combinée de 2,4-D et de P.P.A. annule l'action stimulante ou accentue l'effet inhibiteur du 2,4-D. En faisant varier systématiquement les doses respectives des deux substances, la combinaison la plus inhibitrice correspond à un rapport 2,4-D / P.P.A égal à  $0,05$ . Dans ce cas, l'effet obtenu est équivalent à celui produit par une dose 10 fois plus importante de 2,4-D seul.

Les résultats obtenus indiquent une relation de synergie entre des substances qui peuvent avoir en commun un lieu préférentiel d'action : la paroi. L'expérimentation effectuée sur les plantules de concombre revêt un caractère très fragmentaire et elle ne permet pas d'améliorer la compréhension du mode d'action des P.P.A. sur la croissance des suspensions cellulaires.

#### B Mise en évidence d'une action "like gibberelline" :

L'acide gibberellique ( $\text{AG}_3$ ) est la plus connue d'une grande famille de molécules dont les effets sur l'allongement des tiges sont la base de leur identification biologique. Ce facteur de croissance est par ailleurs très efficace sur la suspension cellulaire de Silène, provoquant une augmentation de M.F. de l'ordre de 30 % lorsqu'il est utilisé à la concentration de  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  (BRASSART et al., 1982). En fait, son action se situe principalement au niveau du grandissement cellulaire comme en témoignent les variations de dimensions des cellules et l'augmentation de leur teneur en eau. Les effets provoqués par des doses efficaces de P.P.A. sur la croissance des suspensions cellulaires de silène vont également dans ce sens (voir § 1, B). De plus, la stimulation de croissance obtenue en présence d' $\text{AG}_3$  ( $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ ) s'accompagne d'une excrétion plus abondante de P.P.A. dans le milieu de culture (figure III-14). L'emploi de l'AMO 1618, considérée comme une anti-gibberelline, provoque simultanément une chute de la croissance et de l'excrétion des P.P.A..

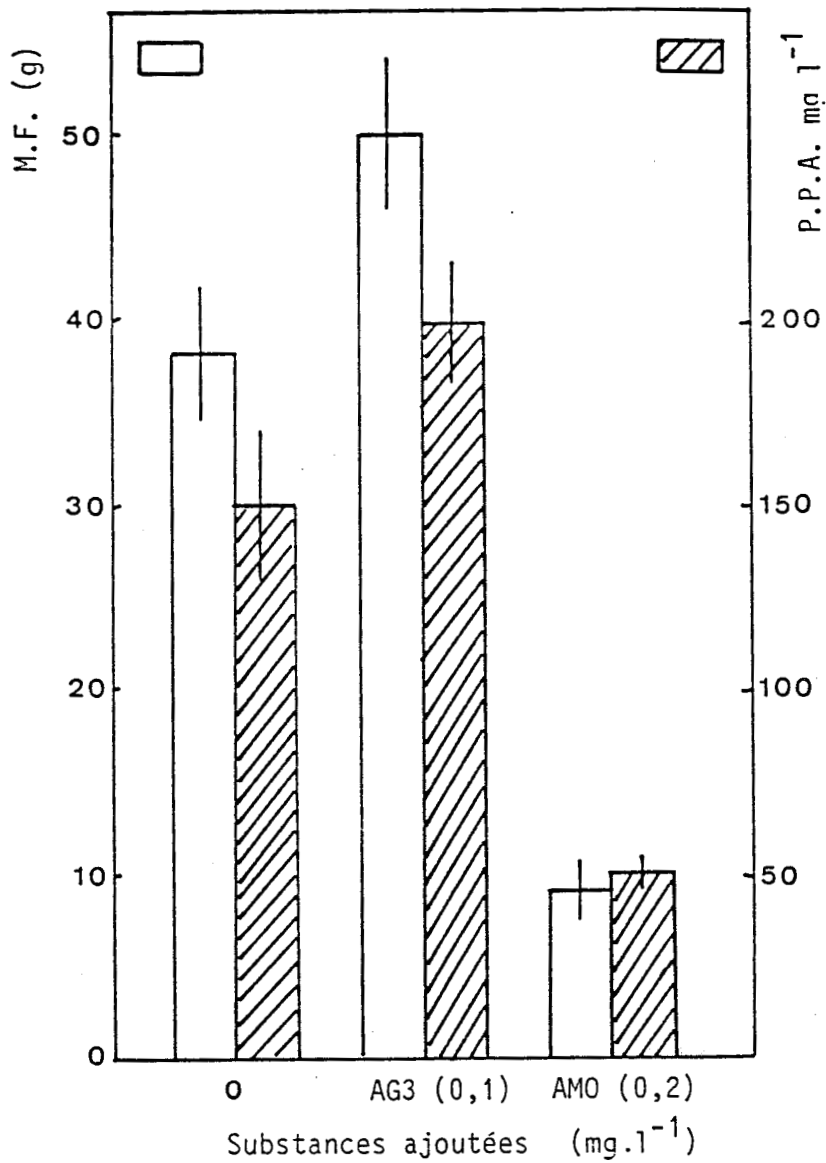


Figure III.14 : Action de l'acide gibberellique (AG<sub>3</sub>) et de l'AMO<sub>1619</sub> sur la croissance de la suspension cellulaire de silène et sur l'excétion des P.P.A. dans le milieu de culture.

Les mesures de M.F. (g par flacon) et des P.P.A. (mg.l<sup>-1</sup> d'équivalents d'acides uroniques) ont été effectuées après 14 jours de culture. Les intervalles de confiance sont calculés au seuil de 5 %, n = 6.

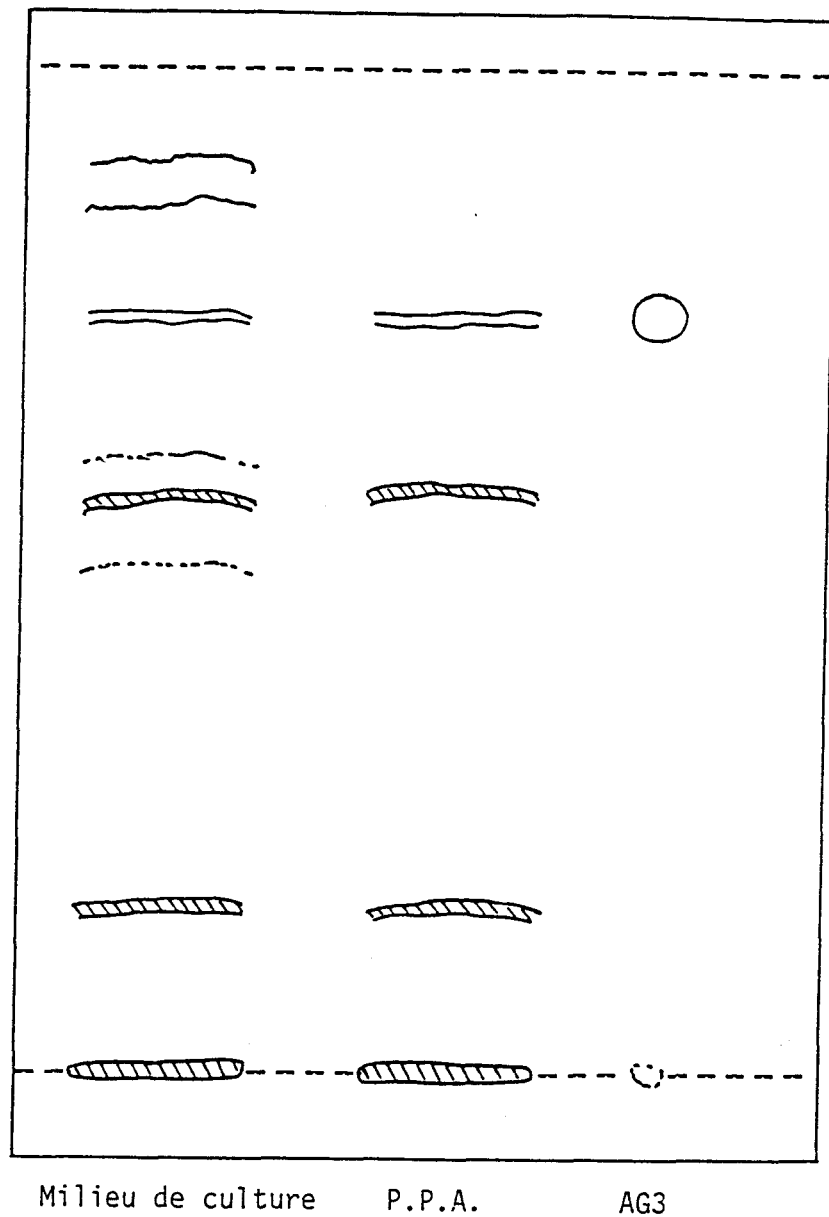


Figure III.15 : Mise en évidence des gibberellines et des saccharides associés présents dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de silène (14 jours), après leur séparation par chromatographie sur couche fine (KIESELGEL de silice 60 F 254).

Solvant : isopropanol/ammoniaque/eau (60/0.05/19.95) ;  
Fluorescence à 254 nm : zones délimitées en traits pleins ;  
Coloration pourpre révélée à l'orcinol : zones hachurées ;

TABLEAU III-10 : Répartition de la radioactivité introduite sous forme de ( $^{14}\text{C}$ ) $\text{GA}_3$  dans le milieu de culture de suspensions cellulaire de silène âgées de 14 jours, après précipitation de l'ensemble des polymères par l'éthanol (1) et des P.P.A. par le cétavlon (2,3,4).

Echantillon	$^{14}\text{C}$ total	Précipité		Cétavlon		Ethanol	
	(dpm)	(dpm)	%	(dpm)	%	(dpm)	%
1	218643	2476	1,13	-	-	216167	98,86
2	535874	549	0,10	522800	97,56	12525	2,34
3	600184	128	0,02	599050	99,81	1006	0,16
4	474647	245	0,05	472800	99,61	1602	0,33



Le milieu de culture filtré et les P.P.A. extraits de ce milieu par la méthode habituelle sont traités pour en extraire les gibbérellines (fiche technique N° 10) puis chromatographiés sur une plaque de silice imprégnée d'une substance fluorescente (MERK F 254), en présence d'AG<sub>3</sub> comme témoin. Après 2 h de migration ascendante dans le solvant isopropanol / ammoniac / eau (60 / 0,05 / 19,95) la plaque reçoit une vaporisation par du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dilué puis est chauffée quelques minutes à 100°C. Elle est ensuite soumise à des rayonnements U.V. à 254 nm. Il se produit alors des émissions caractéristiques permettant de repérer la position des gibbérellines. Plusieurs zones sont repérables parmi les produits séparés à partir du milieu de culture et 4 d'entre elles sont communes avec ceux séparés à partir des P.P.A.. La première reste sur la base de dépôt et correspond à des substances non déplacées par le solvant utilisé. La seconde (RF = 0,16) et la troisième (RF = 0,58) sont très peu marquées et n'ont pu être identifiées par comparaison avec d'autres gibbérellines, faute de témoin. La quatrième (RF = 0,75) correspond à l'emplacement caractéristique de l'AG<sub>3</sub> (figure III-15).

Les suspensions cellulaires de silène libèrent donc dans leur milieu de culture des substances réagissant comme des gibbérellines (y compris l'AG<sub>3</sub>), lorsqu'elles sont irradiées par des rayons U.V.. Ces substances sont précipitables par le C.T.A.B., dans le complexe représenté par les P.P.A. alors que l'AG<sub>3</sub> seul n'a pu être entraîné de la même manière. En introduisant un peu d'orcinol (réactif des saccharides) dans la solution de vaporisation utilisée pour révéler la fluorescence et en maintenant le chauffage plus longtemps, apparaissent des colorations pourpres caractéristiques qui permettent de constater que des composés saccharidiques sont strictement superposés aux trois premières zones de fluorescence décrites. Pour vérifier que la présence d'AG<sub>3</sub> en mélange avec les P.P.A. n'est pas due à une agglutination circonstancielle, lors de leur précipitation par le C.T.A.B., un peu d'AG<sub>3</sub> marqué (14C) a été introduit dans le milieu de culture de 14 jours avant la préparation des P.P.A.. Chaque fraction a été conservée puis soumise à un comptage de la radioactivité (tableau III-10). La quasi totalité du marquage se retrouve dans le premier surnageant, indiquant qu'au cours de leur précipitation, les P.P.A. n'ont pas entraîné l'acide gibberellique marqué.

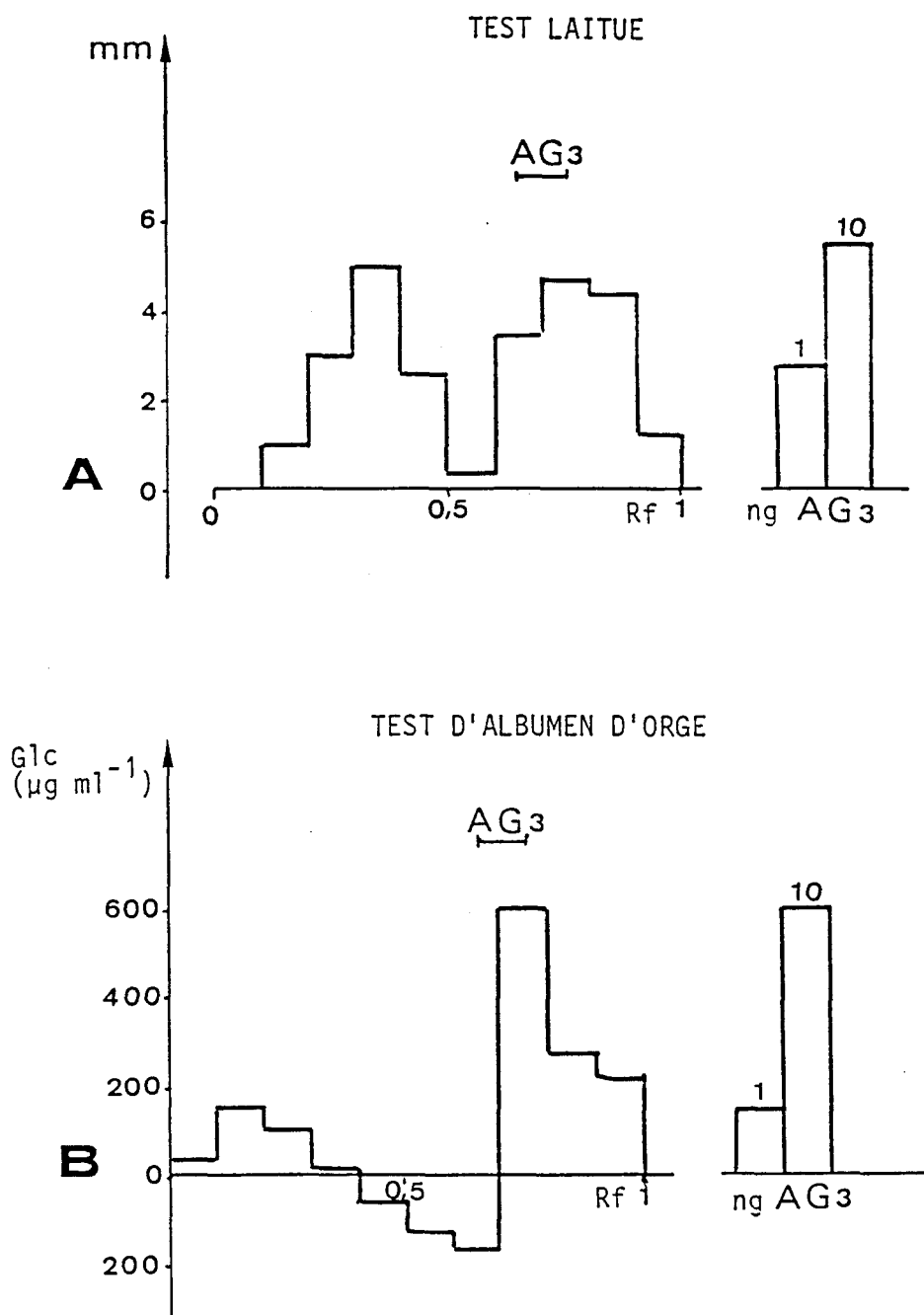


Figure III.16 : Activité gibberellinique dans le milieu de culture de la suspension cellulaire de silène.

A : différence de longueur entre les hypocotyles de laitues (batavia dorée de printemps) cultivées en présence de l'extrait chromatographié du milieu et ceux de laitues cultivées en présence du solvant chromatographié.

B : activité  $\alpha$ -amylasique des extraits chromatographiés, diminuée des saccharides réducteurs présents à l'origine dans le milieu et de l'influence (combinée du silicagel et du solvant sur cette activité enzymatique. D'après MARIE-ALSABEK, 1985.



La confirmation de la présence de gibbérellines dans les P.P.A. a été obtenue par des essais biologiques généralement utilisés pour cet usage : la stimulation de la croissance des plantules de laitue et la stimulation de l'activité  $\alpha$ -amylasique dans l'albumen d'orge.

La séparation des gibbérellines est effectuée directement sur le milieu, après 14 jours de culture de la suspension cellulaire. Après évaporation sous vide de la phase aqueuse, les gibbérellines sont extraites par deux solubilisations successives par le méthanol à 80 % puis par l'acétate d'éthyle. L'extrait est chromatographié sur couche mince de silicagel dans le même solvant que précédemment puis la hauteur du chromatogramme comprise entre la ligne de dépôt et le front du solvant est divisée en 10 bandes d'égale largeur qui sont ensuite recueillies séparément par grattage du silicagel. Les essais biologiques mis au point par COUILLEROT et YI (1985) prévoient à chaque fois une série de témoins destinés à apprécier l'effet du solvant de migration, du silicagel et la présence à l'origine de sucres réducteurs dans le milieu. Les résultats obtenus sont finalement retranchés de ceux des séries expérimentales.

L'essai concernant l'allongement des hypocotyles de laitue (figure III-16, A) montre que la plupart des fractions issues du milieu de culture sont stimulantes, notamment celle qui correspond à la zone de migration de l'AG<sub>3</sub> (RF = 0,75). Les résultats acquis sur l'activité  $\alpha$ -amylasique de l'albumen d'orge (figure III-16, B) permettent la mise en évidence d'effets activateurs ou inhibiteurs selon les fractions considérées. La 8ème fraction, qui correspond à celle où migre l'AG<sub>3</sub> utilisé comme témoin, est celle qui stimule le plus efficacement l'activité enzymatique.

Ces deux séries d'essais, relativement démonstratives, s'intègrent dans un faisceau d'arguments plaidant en faveur de la présence de gibberellines dans le complexe polysaccharidique que constituent les P.P.A., conformément aux hypothèses évoquées préalablement (MORVAN, 1982 ; MARIE-ALSABEK et al., 1984).

## BILAN ET DISCUSSION

A l'origine de cette étude, ce sont des préoccupations concernant les échanges cellulaires qui ont motivé la recherche et l'identification de polymères extracellulaires capables de modifier, par leur présence, les conditions d'alimentation ionique des cellules. De ce fait, les observations et les expérimentations ont été limitées au compartiment pariétal, d'une part et au milieu de culture, d'autre part. L'intérêt d'entreprendre une étude complète s'est trouvé accentué par la mise en évidence des effets produits par les polymères acides, extraits des milieux de culture de plusieurs suspensions cellulaires, sur la croissance des souches productrices (MORVAN, 1981). La suspension cellulaire de silène, mise au point au laboratoire (DUBOIS et BOURIQUET, 1973/74), a été choisie pour réaliser ce travail parce que certains des polymères qu'elle libère dans le milieu de culture stimulent sa propre croissance (MORVAN, 1982).

L'objectif de l'étude entreprise est de comprendre les causes et les conséquences de l'excrétion de polymères acides par un système biologique bien contrôlé. Les propriétés décrites dans les chapitres précédents permettent de confronter deux hypothèses sur l'origine des P.P.A. : i) les polymères sont excrétés hors de la matrice pariétale, à l'occasion des remaniements intervenant au cours de l'élongation cellulaire ; ii) l'émission de ces polymères constitue une réponse de la cellule aux signaux extérieurs ; dans ce cas, la paroi est un lieu de passage pour les polymères sans en être obligatoirement la source. Par ailleurs, deux autres hypothèses concernant les conséquences de la présence des P.P.A. dans le milieu de culture peuvent être posées : i) les propriétés acides de ces polymères affectent les activités des ions et leur distribution entre le milieu et la paroi ; ii) leur nature saccharidique classe ces composés parmi les molécules biologiquement actives, telles qu'elles sont définies dans la littérature (ALBERSHEIM et DARVILL, 1985).

La discussion a pour but d'établir un bilan argumenté des résultats acquis, de les confronter aux hypothèses de départ et de justifier la poursuite du travail engagé.

## I. INTERETS ET LIMITES DU MODELE BIOLOGIQUE

En tant que systèmes biologiques, les suspensions cellulaires sont principalement reconnues comme outils méthodologiques pour la production de métabolites et pour la vérification des théories concernant la croissance ou les échanges cellulaires. Il ne faut cependant pas oublier que la totipotence qui caractérise leur maintien dans un état de "flottement" suppose une dissipation de la mémoire cellulaire sous la pression constante des signaux externes (DEMARLY, 1978). Le comportement de croissance, la morphologie des cellules et des agrégats, les modes de culture, l'environnement physique (lumière, température), la composition initiale du milieu de culture sont autant d'éléments susceptibles d'intervenir sur l'expression moléculaire de l'état cellulaire, au moment où il est considéré. C'est la raison pour laquelle la marge de fluctuation expérimentale est limitée et qu'il convient d'examiner le comportement global de la suspension cellulaire, au niveau des critères de croissance, de la méthode de culture et des modifications enregistrées dans le milieu nutritif.

### 1) Caractéristiques de la suspension cellulaire de silène :

Le choix des critères de croissance est le premier obstacle que rencontre l'expérimentateur surtout lorsqu'il entend utiliser les mesures comme références, pour exprimer quantitativement les variations d'un processus métabolique. La mesure de la masse fraîche, par exemple, est souvent critiquée pour son imprécision et les cellules ne sont pas aisément dénombrables lorsqu'elles se présentent sous forme d'agrégats. Faut-il pour autant caractériser systématiquement la croissance des cellules par l'évolution de leur matériel nucléaire ?

Le cas de la suspension cellulaire de silène n'échappe pas à la règle et DUBOIS (1980) a décrit un cycle de croissance représentatif de la culture en milieu liquide non renouvelé. Ainsi, en maintenant les facteurs physiques constants, il se vérifie que l'utilisation de cellules trop âgées et/ou d'une densité d'ensemencement insuffisante retarde le démarrage de

la croissance. Par contre, un ensemencement plus fréquent et plus abondant modifie peu le temps de doublement de la M.F. (entre 50 et 55 heures). Compte tenu de ces résultats, il est possible de définir un cycle de culture ne présentant pas de phase de latence à l'origine ni de diminution de M.F. dans sa phase terminale :

- Inoculum :  $3 \pm 0,2$  g (M.F) de cellules
- Durée du cycle : 14 jours
- Milieu de culture : 200 ml de solution de LAMPORT modifié par LESCURE (1966), contenant 2 % de saccharose
- Température :  $25 \pm 1^\circ\text{C}$
- Lumière : 5 à 7 W . m<sup>2</sup>, 24 h par jour.

La mesure de la M.F. a été retenue comme référence principale, en dépit des réserves en usage. La M.S. a cependant souvent été mesurée car elle représente un bon paramètre lorsqu'il s'agit d'exprimer les rendements en masse des parois isolées et/ou des polysaccharides excrétés. En outre, par différence avec la M.F. elle permet de calculer la teneur en eau et d'estimer ainsi le grandissement cellulaire. Celui-ci intervient principalement à partir du 6ème jour de culture comme en témoigne également la mesure des dimensions cellulaires (DUBOIS et al., 1976). La quantité maximale de M.S. est obtenue au 12ème jour de culture. Elle est comprise entre 12 et 13 g.l<sup>-1</sup>, soit une productivité de 1 g.l<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>. Ces valeurs relativement faibles s'expliquent par l'épuisement progressif des réserves amylacées emmagasinées préalablement et par l'émission de 1,5 à 1,7 g de polymères par litre de milieu. Néanmoins, le rendement de production de biomasse, calculé par rapport à la quantité de saccharose fourni au début de culture, est compris entre 50 et 60 %.

La suspension cellulaire de silène s'avère donc un modèle biologique fiable dont les performances de croissance et les rendements de productivité sont du même ordre de grandeur que ceux des autres suspensions cellulaires (GUERN, 1979).

La paroi représente une part importante de la M.S. (15 à 18 %) qui demeure relativement stable au cours de la culture. Le volume pariétal, calculé à partir des dimensions cellulaires mesurées en microscopie optique et sur des micrographies électroniques, diminue progressivement pendant les 10 premiers jours puis double rapidement en fin de culture.

La raison principale de cette augmentation de volume est l'augmentation des dimensions cellulaires car l'épaisseur des parois reste relativement constante. Au cours de la culture, la capacité de rétention d'eau des parois varie : c'est au 10ème jour de culture que le taux de gonflement des pectines extractibles à l'eau chaude est maximal. Il s'agit là d'une circonstance favorable aux remaniements pariétaux car une bonne hydratation de la matrice facilite les échanges, les réactions métaboliques et les glissements interfibrillaires indispensables à l'élongation cellulaire.

## 2) Les événements dans le compartiment pariétal :

L'intérêt accordé au comportement de la paroi au cours de la culture résulte de deux interrogations :

- l'émission de polymères dans le milieu de culture traduit-elle des modifications ultrastructurales qui peuvent être mises en évidence par des techniques cytochimiques classiques ?
- Quelle est la relation entre les polymères extracellulaires et ceux de la matrice pariétale du point de vue composition biochimique et propriétés physico-chimiques ?

L'étude ultrastructurale, en microscopie électronique a comme objectifs de "visualiser" les apports de matériel polysaccharidique en provenance du cytoplasme, l'émission de fragments dans le milieu de culture et par voie de conséquence une éventuelle évolution morphologique de l'ultrastructure pariétale.

En dépit de leur faible spécificité (HAGEGE et HAGEGE, 1980 ; ROLAND, 1981), les méthodes cytochimiques utilisées permettent de retrouver chez le silène les modifications qui sont généralement attribuées aux cellules cultivées *in vitro* (SIDORENKO, 1970) : les espaces intercellulaires sont plus importants, les plasmodesmes disparaissent, le réticulum endoplasmique détermine des territoires cytoplasmiques très distincts, les vacuoles sont très développées et l'enveloppe nucléaire a tendance à s'invaginer.

Le premier résultat particulier qu'il convient de noter est la présence de vésicules à l'extérieur du plasmalemme, le plus souvent dans des dépressions périplasmiques. Le contenu polysaccharidique de ces vésicules, déjà repérable par le PATAg lorsqu'elles sont encore dans le cytoplasme, se déverse dans la paroi pour y constituer la phase matricielle. Il est généralement admis que les vésicules servent à exporter du matériel polysaccharidique vers la paroi (BONNETT et NEWCOMB, 1966). La présence de vésicules extracytoplasmiques est un phénomène fréquent chez les cellules végétales mais il est difficile à observer (PRAT, 1973). Le fait est mentionné contre la paroi de spores fongiques en germination (CHANG et TANAKA, 1970), dans le périplasme de cellules d'endosperme (CAMEFORT, 1970) et dans celui des hypocotyles (VIAN et ROLAND, 1974). Il ne semble pas avoir été signalé dans la suspension cellulaire d'érable (NOUGAREDE et al., 1968). Cependant, la présence de vésicules extracellulaires est signalée à la suite de traitements enzymatiques destinés à dégrader les parois (BAKER et al., 1980 ; KEON, 1985). Il s'agirait de formes de dégradation cytoplasmique chez des cellules soumises à des agressions chimiques et l'intensité de l'émission témoignerait de leur mauvais état physiologique. Par ailleurs, les protoplastes émettent de très nombreuses vésicules dans le milieu pendant la phase de régénération de leur paroi (BURGESS et al., 1973 ; PRAT, 1973). Les auteurs considèrent le phénomène comme une adaptation des protoplastes aux conditions du milieu extérieur, notamment à la pression osmotique (RAJ et HERR, 1970). Dans la suspension cellulaire de silène, les vésicules sont observables quel que soit le moment de prélèvement, ce qui témoigne du caractère permanent de leur émission. Il arrive parfois que des microfibrilles se déposent ultérieurement contre la face interne de la paroi. De ce fait, les vésicules se trouvent emprisonnées dans l'épaisseur de la paroi de telle sorte qu'elles peuvent être libérées dans le milieu de culture si les cellules se séparent.

Le second point caractéristique concerne les différentes formes d'émission de matériel pariétal. Que ce soit sous forme de fins filaments ou sous forme de lambeaux plus importants, force est de constater qu'il se produit une libération continue de fragments pariétaux. Ces éléments s'organisent en réseaux maillés facilement repérables dans les méats ou sous forme d'une gangue autour des cellules.

Il est très probable que les lambeaux les plus importants n'ont pas le caractère soluble des polymères qui sont recueillis après filtration. Ceux-ci correspondent plutôt aux éléments les plus fins qui participent également au réseau extracellulaire. Ces observations permettent de proposer le concept d'exo-paroi pour définir l'ensemble du matériel pariétal disséminé dans le milieu de culture. Il s'agit d'une structure lâche, propre aux cellules en culture, qui serait l'expression d'une réaction de protection contre les agressions physiques et chimiques occasionnées par les manipulations et les ensemencements fréquents. Au cours des premiers stades de la culture des protoplastes, il se forme également une structure peu cohérente qui constitue la première étape de reconstitution de la paroi néoformée (PRAT, 1973). L'organisation de réseaux de polysaccharides matriciels extracellulaires a été mentionnée dans de rares cas (ROLAND et al., 1977 ; HEINZE et AMELUNXEN, 1984). En l'absence d'une attention particulière lors de la préparation des échantillons en vue de l'observation en microscopie électronique, ces éléments se trouvent éliminés.

Il faut finalement signaler le caractère permanent des deux phénomènes décrits précédemment. Il n'a pas été possible de trouver la moindre évolution dans les aspects observés tout au long de la culture, exception faite de la gangue enrobant les cellules immédiatement après l'ensemencement. C'est probablement la raison pour laquelle l'épaisseur des parois et leur rapport pondéral à la M.S. demeurent si constants, pendant la culture. Tous ces faits traduisent l'importance du métabolisme pariétal pour les suspensions cellulaires puisque les parois et les polymères extracellulaires représentent 20 % du saccharose fourni initialement. Un tel rendement n'a rien d'exceptionnel : celui de la suspension cellulaire d'érable est de 24 % et celui de la suspension cellulaire de Myrtyllocactus geometrizans peut être estimé à plus de 30 % (GUDIN, 1984). Une comparaison peut être établie avec les protoplastes dont la reconstitution de leur paroi est la première manifestation métabolique et qui ne peuvent se diviser qu'une fois franchie cette étape. Les cellules en suspension dans un milieu liquide peuvent être considérées comme des structures différées des précédentes pour lesquelles le métabolisme pariétal est le témoin actif des pressions externes aboutissant au maintien de leur totipotence.

Les autres données concernant la paroi ont trait aux propriétés physico-chimiques des fractions pariétales que sont les pectines et les hémicelluloses. Selon l'âge de la culture, la proportion pondérale des pectines I et II varie, ce qui se traduit au niveau de la paroi par une plus ou moins grande capacité à retenir l'eau. Le taux de gonflement des parois est maximal en fin de phase exponentielle de croissance (10 jours), alors que les cellules sont en élongation puis il diminue en fin de culture. Dans le même temps la capacité d'échange cationique augmente, ce qui peut refléter à la fois des variations quantitatives de la masse, de la charge et de la conformation des pectines dans la paroi. Les propriétés physico-chimiques des parois entières (SENTENAC et GRIGNON, 1981 ; MORVAN C., 1983 ; BIGOT et BINET, 1984) comme celles des polymères qui en sont extraits (MORVAN C. et al., 1985) permettent d'interpréter le rôle que jouent ces composés dans la régulation des échanges ioniques, notamment par la sélectivité qu'ils manifestent à l'égard des ions divalents. L'inversion du coefficient de sélectivité  $K(\text{Ca}/\text{Mg})$  des parois au cours de la culture illustre parfaitement les propos précédents. L'évolution de ce paramètre témoigne de modifications de la nature chimique et/ou de la conformation des polymères dans la matrice pariétale. Dans ces conditions, la libération dans le milieu de culture d'une partie des polymères de la paroi aura des conséquences, notamment en ce qui concerne l'activité des ions divalents.

La composition en monosaccharides des pectines I, extraites à l'eau chaude, est très voisine de celle des polymères pectiques acides excrétés dans le milieu au cours de la culture : les arabinogalactanes et les rhamnogalacturonanes sont les familles de molécules principales dans les deux cas, ce qui confirme la parenté entre les deux fractions. La comparaison entre les polysaccharides des parois et ceux qui sont rejetés dans le milieu de culture par les suspensions cellulaires ont permis aux auteurs de relever l'analogie biochimique entre ces deux catégories de composés (BECKER et al., 1964 ; YAMAOKA et SATO, 1977 ; TAKEUCHI et KOMAMINE, 1978). La ressemblance la plus souvent mentionnée concerne la fraction hémicellulosique des parois et le complexe extracellulaire dont sont extraits des xyloglucanes de composition très voisine (BAUER et al., 1973 ; WILDER et ALBERSHEIM, 1973 ; KATO et NOGUCHI, 1976 ; BARNOUD et al., 1977 ; AKIYAMA et KATO, 1982 ; EDA et al., 1983-a ; JOSELEAU et CHAMBAT, 1984-a).



L'analyse de la composition biochimique des fractions pariétales est donc un moyen de démontrer l'origine des polymères recueillis dans le milieu de culture des suspensions cellulaires.

### 3) Le milieu de culture, témoin des échanges :

La dépendance des végétaux à l'égard de leur substrat naturel, le sol, est la caractéristique essentielle de ces organismes. La culture in vitro des cellules en suspension dans des milieux nutritifs artificiels renforce cette tendance. En effet, les cellules n'ont entre elles que très peu de contacts, même lorsqu'elles forment des agrégats et l'intérêt de cette situation réside justement dans le fait que l'ensemble du métabolisme cellulaire se traduit par leurs relations avec le milieu de culture. Seule source d'approvisionnement en nutriments, le milieu constitue également la seule possibilité pour l'évacuation des déchets cellulaires. Pour ces raisons, il est le véritable témoin des échanges nutritionnels et les variations de ses paramètres constituent des indicateurs fonctionnels du métabolisme cellulaire.

La première démarche consiste à suivre la diminution des éléments minéraux ou organiques qui ont été introduits au départ dans la solution nutritive. De ce point de vue, la disparition rapide du saccharose, n'est qu'une confirmation des résultats acquis antérieurement au laboratoire (BRASSART et al., 1977). Il s'agit d'un facteur limitant de la croissance puisqu'en doublant la concentration initiale, les M.F. et M.S. mesurées en fin de culture sont largement supérieures. La nutrition minérale a été suivie à travers la diminution de la concentration des principaux cations au cours de la culture. La concentration du sodium demeure faible et stable. L'absorption des autres cations est très intense pendant les premiers jours, notamment celle du magnésium, élément qui favorise également l'absorption des phosphates (BISTER-MIEL et al., 1985). En fin de culture, il ne subsiste que 22 % de magnésium et 36 % de calcium alors que la masse de potassium représente encore 60 % de celle introduite initialement dans chaque flacon (FEGHALI, 1985). Ce dernier résultat ne diffère pas sensiblement de ceux obtenus par GRIGNON (1969) avec la suspension cellulaire d'érable ni de ceux mentionnés par A. KATO et al. (1977) avec les cellules de tabac. Il ne fait aucun doute que la concentration élevée en potassium dans le milieu de culture en fin de culture contribue pour une part importante au maintien du potentiel osmotique externe.

En effet, ce paramètre diminue régulièrement au cours de la culture du fait de la consommation totale du saccharose et des nitrates (BRASSART et al., 1977 et 1978).

Le paramètre du milieu de culture dont les variations sont les plus systématiquement décrites est sans doute le pH. Dans le cas présent, il augmente au cours de la culture comme c'est la règle lorsque le milieu de culture est riche en nitrates, ceux-ci étant absorbés beaucoup plus rapidement que les cations. Le fait avait été noté par GRIGNON (1968), d'une part et par MORVAN (1974), d'autre part, avec les cellules d'érable cultivées dans des milieux dont les concentrations initiales en nitrates étaient très différentes. Toutefois, le pH ne résulte pas uniquement de l'absorption différentielle des anions et des cations puisque les cellules sont capables de le régulariser en fonction de la valeur à laquelle il est établi au départ (DUBOIS, 1980). Les P.P.A. excrétés dans le milieu sont également impliqués dans la régulation du pH (MARIE-ALSABEK, 1985). Cependant, l'effet tampon qui est décrit, a été obtenu en présence d'une concentration en P.P.A. 10 fois supérieure à celle qui est la leur dans le milieu, en fin de culture. Il n'en demeure pas moins vrai que le pH augmente moins rapidement lorsque des P.P.A. sont introduits dans les milieux de culture avant l'ensemencement.

L'observation quotidienne des flacons en culture permet de constater le rejet de matière par les cellules : avec l'augmentation de la durée de la culture, les milieux s'opacifient et se colorent. Il apparaît parfois de véritables lambeaux qui flottent à la surface du milieu ou adhèrent à la paroi des flacons. Ces constatations se trouvent confirmées par les méthodes de précipitation des polymères : l'éthanol permet la récupération de la totalité des macromolécules et le C.T.A.B., plus spécifiquement, celle des polyanions. La fraction totale augmente régulièrement de telle sorte qu'en fin de culture, sa masse sèche représente 60 % du résidu sec du milieu et est équivalente à la M.S. des parois isolées. Un tamisage moléculaire permet la mise en évidence directe de l'évolution de la taille des molécules séparées et donne une image instantanée des mouvements de substances. Il témoigne de l'enrichissement continu du milieu de culture en composés lourds initialement absents. Parallèlement, il apparaît également d'autres composés plus légers ou davantage retenus par le gel, notamment une substance colorée qui n'a pas été identifiée jusqu'à présent.

Le dosage colorimétrique des acides uroniques contenus dans la fraction polyanionique fournit une évaluation directe de l'intensité d'excrétion de ces composés par les cellules. Il ne s'agit que d'environ 20 % de l'ensemble du complexe polysaccharidique extracellulaire. Celui-ci évolue qualitativement et quantitativement au cours de la culture des suspensions cellulaires comme le mentionnent la plupart des auteurs (BECKER et al., 1964 ; STODDART et NORTHCOTE, 1967 ; OLSON et al., 1969 ; MANTE et BOLL, 1975 ; YAMAOKA et SATO, 1977 ; TAKEUCHI et KOMAMINE, 1978 ; BLASCHEK et al., 1981).

#### 4) Conclusion :

La suspension cellulaire de silène n'a pas été l'objet d'un nombre de travaux aussi considérable que celles d'érable ou de tabac et de ce fait apparait à la fois comme un modèle nouveau et attractif. Le choix délibéré de ne considérer la croissance qu'à travers les relations fonctionnelles entre le milieu de culture et la paroi des cellules présente l'avantage de pouvoir appréhender les observations d'une façon globale, sans avoir à tenir compte des difficultés méthodologiques et conceptuelles relatives aux compartiments cellulaires. En limitant l'étude entreprise aux événements extracellulaires, c'est le rôle de la paroi qui est mis en cause ou plus exactement mis en valeur. En effet, les polymères libérés vont modifier les relations entre les cellules et le milieu de culture.

L'évolution des potentialités de croissance de la suspension cellulaire de silène et les remarques concernant les protoplastes et les cellules qui subissent des attaques enzymatiques permettent : i) de considérer les cellules de silène comme des protoplastes différés ; ii) de s'interroger sur leur état physiologique ; iii) de suspecter des activités enzymatiques intrapariétales responsables de la dégradation permanente des parois.

Enfin, il n'est pas certain que les résultats acquis avec les cellules cultivées en suspension soient transférables à la plante entière. En effet, les relations intercellulaires sont très réduites et il ne subsiste guère de trace de différenciation.

## II . CONSIDERATIONS SUR L'EXCRETION DE POLYMERES PECTIQUES ACIDES

Un choix a été effectué, dès le départ, dans la manière d'aborder l'étude des polysaccharides extracellulaires. En effet, l'intérêt s'est centré sur les polymères dotés d'une charge électrostatique négative. Des préoccupations antérieures à propos de la distribution des potentiels intracellulaires (MORVAN, 1973) et du pH des milieux de culture (MORVAN, 1974) sont à l'origine de cette orientation. L'emploi d'une méthode de précipitation sélective par un sel d'ammonium quaternaire (C.T.A.B.) a permis de considérer que les polymères ainsi recueillis étaient des polyanions. En proposant le terme générique de polymères pectiques acides pour désigner cette fraction (MORVAN, 1982), une anticipation a été commise dans la mesure où aucune preuve directe de la nature pectique ni du caractère acide de ces polymères n'était présentée. Il convient donc de remédier à ce manque en démontrant le bien fondé de la proposition. Dans un premier temps, la nature biochimique des P.P.A. est étudiée et la comparaison avec les pectines pariétales effectuée. L'hétéropolymolecularité de ces composés, leurs variations quantitatives au cours de la croissance et un réexamen des arguments cytologiques permettent de tester l'hypothèse de l'origine pariétale des P.P.A. et de discuter de la validité du terme d'excrétion pour qualifier leur libération dans le milieu de culture. Enfin, les effets que provoquent ces composés, aussi bien sur la croissance des cellules qui les produisent, que sur celle d'autres systèmes biologiques peuvent être comparés aux effets traditionnels attribués aux substances de croissance que sont les auxines et les gibbérellines.

### 1) Nature et propriétés acides des P.P.A. :

La méthode de dosage colorimétrique au carbazol sulfurique (DISCHE, 1947) est généralement considérée comme le moyen d'apprécier quantitativement les acides uroniques contenus dans un échantillon. Les interférences dues à la présence de saccharides neutres peuvent être évitées par une correction (MONTREUIL et al., 1981) prenant en compte les absorbances respectives des radicaux neutres et acides à l'orcinol sulfurique et au carbazol.

Dans ces conditions, la présence d'acides uroniques dans les P.P.A. est démontrée, avec une reproductibilité satisfaisante.

La coupure des liaisons uronosidiques est une opération particulièrement difficile (LAMPORT, 1978) et il a fallu combiner des hydrolyses chimiques et enzymatiques, selon le principe utilisé par JONES et ALBERSHEIM (1972), pour parvenir à l'obtention des monomères acides tout en préservant l'intégrité des autres monosaccharides. Les rendements obtenus, supérieurs à 75 %, attestent de la fiabilité de la méthode employée. L'analyse directe des résidus acides par chromatographie en phase gazeuse est impossible. Une lactonisation est nécessaire avant de les transformer en alditols. La méthode de réduction par le carbodiimide (TAYLOR et CONRAD, 1972) n'étant pas quantitative sur les P.P.A. de silène (JACQUES, 1984), c'est le borodutérure de sodium qui a été choisi comme agent réducteur. L'excédent de galactose, détecté par C.P.G., provient effectivement de l'acide galacturonique présent dans les échantillons comme le confirme l'analyse par spectrométrie de masse (MATULEWICZ et al., 1984). L'application de la méthode décrite ci-dessus à l'analyse de la composition centésimale en monosaccharides des P.P.A. permet de vérifier que l'acide galacturonique est bien le constituant principal de ces composés et que sa proportion molaire augmente avec la durée de la culture.

L'acidité des P.P.A. est mesurée par titrage. Les valeurs des pK calculés après neutralisation sont voisins de celui de l'acide polygalacturonique (RAVANAT, 1979 ; CESARO et al., 1982). Néanmoins, les P.P.A. se différencient d'un acide polygalacturonique par la présence de deux pK apparents nettement distincts. Les degrés de dissociation étant toujours largement inférieurs à 1, le premier virage ne peut être attribué à une contamination par un acide fort. Le calcul des masses équivalentes à partir des titrations donne parfois des valeurs inférieures à celle de l'acide polygalacturonique, ce qui est en contradiction avec les résultats d'analyse chimique. L'hypothèse d'un surcroît de charges substituées sur certains radicaux peut être envisagée. La nature du contre-ion et la déméthylation influent sur l'acidité du second virage ce qui incite à penser qu'une partie des P.P.A. est capable de changer de conformation en fonction de l'environnement électrostatique (pH local, présence de calcium).

Selon CESARO et al. (1982), l'acide polygalacturonique subirait une transition entre une forme rigide à pH acide et une extension totale des polymères au voisinage de la neutralité. L'addition de sels accentuerait la stabilité de la configuration rigide sans modifier sensiblement son comportement à des pH plus élevés (RAVANAT et RINAUDO, 1980). MORRIS et al. (1982) signalent également des transitions lorsque les gels de pectate de calcium (de type "egg box") sont déshydratés pour les études de diffraction de la lumière. Cette propriété est intéressante dans la mesure où les polymères réagissant aux conditions locales, peuvent changer de conformation dans le milieu de culture et modifier les propriétés apparentes des molécules.

Le premier objectif qui consistait à justifier l'appellation des polymères pectiques acides est pratiquement atteint. Le point faible de la démonstration réside dans l'absence de détermination de la masse des molécules. Les expériences de tamisage moléculaire qui sont en cours indiquent que les masses sont très variables et comprises entre  $10^3$  et  $10^5$ . Il ne s'agit donc pas de très longs polymères et la présence d'oligosaccharides acides en mélange n'est pas exclue.

La nature pectique des P.P.A. est confirmée par l'analogie de leur composition avec celle des pectines I comme la démonstration en a été faite précédemment. La présence d'arabinose et de galactose dans les P.P.A. comme dans les pectines I n'est pas surprenante car ces deux oses sont souvent branchés sur le rhamnose intercalé entre les radicaux galacturonosyls de la chaîne principale (TALMADGE et al., 1973 ; Mc NEIL et al., 1980). Par contre, la proportion toujours importante de glucose laisse suspecter une contamination des échantillons par des chaînes cellulosiques (MONRO et al., 1976 ; CHAMBAT, 1982 ; LANVERS, 1982), entraînées lors de l'émission des P.P.A. dans le milieu. Cette hypothèse qui n'a pas été vérifiée expérimentalement n'est pas en contradiction avec les résultats de mesures physico-chimiques qui montrent les liaisons entre la cellulose et des composés acides puisqu'il subsiste une C.E.C associée à la fraction restante après l'extraction des pectines et des hémicelluloses par traitement alcalin. Il peut s'agir également d'une contamination par de l'amidon et un traitement par l' $\alpha$ -amylase permettrait d'éviter cet inconvénient (TALMADGE et al., 1973).

L'analyse des différentes fractions séparées sur une résine échangeuse (DEAE-Sephadex) permet de constater que la proportion d'acide galacturonique augmente avec la force ionique de la solution d'élution. Il est ainsi possible de séparer une fraction éluée par le NaCl 1 M, dont le rapport rhamnose / acide galacturonique est voisin de 1. Un tel rapport a été décrit dans les pectines de racines de concombre, extraites par l'hexamétaphosphate de sodium (KONNO et al., 1984). La répétition de telles séquences avec un rhamnose apparemment peu substitué et un acide galacturonique probablement peu méthylé correspond à la chaîne principale du rhamnogalacturonane I (Mc NEIL et al., 1980 ; LAU et al., 1983). Une fois confirmée, cette structure devrait être très intéressante à étudier, notamment du point de vue de son comportement physico-chimique.

Les P.P.A. apparaissent donc comme un moyen d'élucidation de la structure pariétale au même titre que l'ensemble des polymères rejetés dans le milieu de culture (ALBERSHEIM et al., 1984 ; STEVENSON et al., 1986). En effet, les quelques résultats présentés à propos des polymères totaux qui comprennent une majorité de xyloglucanes, du mannose et des traces de fucose renforcent cette idée. La comparaison avec les résultats présentés dans la littérature permet d'assimiler ces polysaccharides à des fractions hémicellulosiques. Tous ces arguments confirment que les polysaccharides extracellulaires sont de bons indices biochimiques et physico-chimiques de la physiologie de la paroi. Leur étude donne une image complémentaire et instantanée de la paroi au moment de leur prélèvement. La répétition des analyses au cours d'un cycle de culture renseigne sur le déroulement des événements intrapariétaux. Elle incite à rechercher les relations entre la présence de polysaccharides extracellulaires dans le milieu et la croissance des cellules.

## 2) Les P.P.A. et la croissance cellulaire :

Si les P.P.A. sont assimilés à des métabolites pariétaux, leur libération dans le milieu dès le début de la culture, le parallélisme avec la croissance cellulaire et la relation inverse avec la consommation du saccharose, considéré comme substrat, permettent de considérer le processus comme du premier ordre, par référence à la classification proposée par GADEN\* (1955). Cette relation directe entre la quantité de substrat disponible et l'émission des polymères pariétaux est vérifiée lorsque la quantité initiale de saccharose introduite dans le milieu de culture est modifiée.

\* dans DURAND et PAREILLEUX (1979)

De la même manière, les facteurs qui stimulent la croissance provoquent corrélativement une augmentation des P.P.A. dans le milieu. L'action du froid est intéressante car elle permet de maintenir la division des cellules sans qu'elles grandissent. Lorsqu'elles sont replacées à la température favorable, les cellules retrouvent en un seul cycle de culture leurs caractéristiques habituelles de croissance. L'émission des P.P.A. est très faible dans le premier cas et elle augmente simultanément et parallèlement à la croissance dès que la température s'élève. Par ailleurs, l'action stimulante des gibberellines et l'effet inverse provoqué par l'AMO<sub>1618</sub> interviennent aussi bien sur les variations de croissance et de teneur en eau des cellules que sur l'émission des P.P.A.. Il semble donc que le lien entre la croissance et la libération des P.P.A. concerne plus particulièrement le grandissement des cellules. L'action de la température sur la croissance et l'excrétion de polymères dans le milieu est variable selon l'espèce considérée : la suspension cellulaire de tabac y est très peu sensible (OLSON et al., 1969). Un certain nombre d'activités enzymatiques sont directement impliquées dans le grandissement cellulaire, notamment les peroxydases (OLSON et al., 1969 ; PARISH, 1975 ; LEGRAND et DUBOIS, 1977), les phosphatases (CRASNIER et al., 1980 ; UEKI, 1982) et les glucanases (NARI et al., 1983). L'action du froid se situe probablement à ce niveau car les basses températures ne sont généralement pas favorables à l'expression des activités enzymatiques. Ces arguments viennent à l'appui de l'idée que la libération des P.P.A. dans le milieu de culture est une conséquence directe des remaniements intervenant dans la paroi au cours du grandissement cellulaire.

La question du comportement des parois pendant l'élongation des cellules a fait l'objet de très nombreux travaux. Certains font état de changements de la composition pariétale (NEVINS et al., 1968 ; REIS, 1976 ; NISHITANI et MASUDA, 1980 ; BLASCHEK et FRANZ, 1983 ; KATSU et KAMISAKA, 1983 ; MASUDA et al., 1984 ; BRUMMELL et HALL, 1985 ; FRY, 1985), du rôle des protons (FISHER et ALBERSHEIM, 1974 ; BAYDOUN et BRETT, 1984), du calcium (WUYTACK et GILLET, 1978 ; TEPFER et TAYLOR, 1981 ; ELLIOT et al., 1983 ; PRAT et al., 1984) et des auxines (CLELAND, 1968 ; RUBERY et NORTHCOTE, 1970 ; LABAVITCH et RAY, 1974 ; BAYLISS, 1977 ; LLOYD et al., 1980). D'autres ont traité des modifications ultrastructurales (ROLAND et VIAN, 1979) et des propriétés mécaniques des parois (RAYLE et CLELAND, 1970 ; SAKURAI et al., 1977 ; TAIZ, 1984).



La comparaison entre la composition chimique des pectines I et celle des P.P.A. permet de constater que la proportion de l'acide galacturonique augmente au cours de la culture. La paroi perd une partie de ses composés pectiques qui sont émis dans le milieu de culture et simultanément elle s'enrichit en nouveaux polymères. Le phénomène dans son ensemble, peut être considéré comme un "turn over" des pectines intrapariétales, analogue à celui des hémicelluloses (FRANZ, 1972 ; MANTE et BOLL, 1975 ; TAKEUCHI et KOMAMINE, 1978 et 1980-a ; NISHITANI et MASUDA, 1983). Les modifications des propriétés physicochimiques des P.P.A., notamment les variations des masses équivalentes et le décalage des courbes de neutralisation après saponification des liaisons esters apportent des arguments en faveur de l'hypothèse d'un renouvellement continu. Il semble que la nature des pectines intégrées dans les parois en fin de culture soit voisine de celle des P.P.A. qui sont excrétés dans le milieu de culture. Les degrés d'estérification tendent à diminuer dans les deux cas. Parallèlement, la molarité des P.P.A. dans le milieu et les C.E.C. intrapariétales augmentent. Les arguments biochimiques et physicochimiques actuellement disponibles tendent à confirmer l'analogie entre les P.P.A. et les pectines les plus solubles de la matrice pariétale.

Les observations en microscopie électronique de l'aspect des parois confortent l'opinion qui vient d'être développée. La formation d'espaces intercellulaires puis de méats est sous la dépendance directe d'hydrolyses enzymatiques des pectines (BAKER et al., 1980 ; KEON, 1985). Tant que les cellules demeurent associées, les polymères forment un réseau dense dans les méats. Lors de la séparation des cellules, les fragments se trouvent entraînés vers l'extérieur et disséminés dans le milieu de culture avec l'aide des frictions mécaniques provoquées par l'agitation. Sans totalement écarter l'hypothèse que les polysaccharides extracellulaires puissent correspondre à des précurseurs pariétaux (OLSON, 1971) qui transitent à travers la paroi sans s'y intégrer, il semble que les arguments cytochimiques et physiologiques attestent davantage d'une libération de fragments ayant fait partie intégralement de la matrice pariétale. Chez le silène, la présence de vésicules dans le périplasme ou même dans la paroi peut troubler le raisonnement précédent dans la mesure où ces vésicules peuvent se trouver libérées dans le milieu de culture. Un examen attentif des micrographies permet de constater que les vésicules étant en voie d'être libérées dans le milieu sont vides de tout contenu contrastable par le PATAg.

Enfin, dans certaines conditions de culture, notamment lorsque les cellules sont privées de calcium, il se produit simultanément un épaissement des parois et une émission plus intense de vésicules dans les méats sans que la quantité de P.P.A. solubles libérés dans le milieu n'augmente.

Les faits expérimentaux, qu'ils soient physiologiques, biochimiques, physicochimiques démontrent l'analogie structurale et fonctionnelle entre les P.P.A. et les pectines hydrosolubles de la paroi. Ils mettent en évidence la dépendance entre le métabolisme des composés pectiques dans la paroi, l'élongation cellulaire et l'émission des P.P.A. dans le milieu de culture. Les arguments cytologiques renforcent le concept qui définit le rejet de ces composés comme une excrétion pariétale.

### 3) Conséquences de la présence des P.P.A. dans le milieu de culture :

Les conséquences de la libération des P.P.A. dans le milieu de culture ont été considérées à deux niveaux : i) les modifications spontanées des paramètres du milieu au cours de la culture ; ii) les changements des mêmes données lorsque les P.P.A. sont réintroduits dans les milieux neufs.

Les P.P.A. étant des molécules chargées, ils sont susceptibles de changer les conditions de la distribution ionique entre le milieu et la paroi. Par voie de conséquence, le pH et le potentiel osmotique du milieu se trouvent légèrement modifiés. L'affinité que présentent en général les composés pectiques à l'égard du calcium (KOHN et FURDA, 1967-a et -b ; REES, 1977 ; RAVANAT, 1979 ; MORVAN et al., 1985) est confirmée par la diminution continue des coefficients d'activité mesurés directement dans le milieu au cours de la culture. Après seulement 3 jours de culture, l'activité du calcium dans le milieu est inférieure de 43 % par rapport à la concentration alors que la concentration molaire des P.P.A. est encore très faible. Une telle disproportion peut avoir pour origine la congélation des échantillons qui a précédé la mesure potentiométrique et qui a pu provoquer un changement de conformation des P.P.A. et une rétention supplémentaire de cations. Les résultats des titrations effectuées sur des P.P.A. de 7 et 14 jours confirment leur forte sélectivité pour le calcium alors qu'ils ne manifestent aucune affinité spécifique pour le potassium.

La conséquence prévisible de cette propriété est que la quantité réelle de calcium dont disposent les cellules au niveau du plasmalemme doit être très faible, d'autant que les polymères intrapariétaux contribuent également à retenir cet élément. D'ailleurs, l'addition de P.P.A. dans les milieux de culture provoque une diminution de la consommation du calcium alors que celle des autres cations augmente, notamment celle du potassium.

La seconde conséquence attendue est une modification du pH du milieu, en raison du caractère acide des P.P.A.. Certes, l'élévation du pH au cours de la culture peut être attribuée à l'alimentation nitrique. En effet, les nitrates sont rapidement consommés (BRASSART et al., 1978 et 1984), l'activité de la nitrate-réductase permettant qu'ils ne soient pas toxiques pour les cellules. Comparativement, l'absorption du potassium est plus faible puisqu'il en reste encore 60 % en fin de culture (FEGHALI, 1985). Cette distorsion entre l'absorption des deux ions majoritaires dans le milieu de culture explique l'élévation de pH observée mais l'amplitude de la variation de pH n'équilibre pas la disparition des nitrates. Il est possible de supposer que la présence des P.P.A. puisse ralentir cette élévation du pH qui n'est pas favorable à la croissance des cellules (DUBOIS, 1980). Lorsque des P.P.A. sont introduits dans des milieux de culture neufs, sous forme brute ou sous forme protonée, ils n'affectent pas le pH initial du milieu. Cependant, l'augmentation du pH se trouve ralentie pendant les 4 premiers jours de culture lorsque les P.P.A. sont introduits sous forme H. Il ne s'agit pas d'un effet direct puisque le pH initial n'a pas été modifié. L'absorption des nitrates pourrait se trouver ralentie en raison de l'abaissement brutal de l'activité du calcium au voisinage du plasmalemme. Le pH comme le potentiel osmotique sont des paramètres dépendants de nombreux facteurs. Ils doivent être considérés avec précaution même s'ils sont parfois invoqués comme facteurs susceptibles de modifier la croissance des cellules (MARETZKI et al., 1972 ; BAYDOUN et BRETT, 1984).

#### 4) Effets des P.P.A. sur la croissance :

L'introduction de P.P.A. excrétés par la suspension cellulaire de silène dans les milieux de culture neufs a permis de montrer qu'ils sont capables de stimuler la croissance des cellules qui les produisent. Cet effet concerne à la fois la multiplication des cellules et l'augmentation des masses fraîches et sèches, lorsque l'approvisionnement en hydrate de carbone n'est pas un facteur limitant. En fin de culture, la teneur en eau des cellules et leurs dimensions sont accrues, montrant que l'action des P.P.A. concerne également le grandissement cellulaire, ce qui se traduit d'ailleurs par une stimulation de l'excrétion. La démonstration des effets activateurs provoqués par les P.P.A bruts et les conditions dans lesquelles ils sont obtenus permettent de poser un certain nombre de questions :

- puisqu'il s'agit d'un mélange de molécules, est-il possible de les séparer, de les identifier au plan biochimique et d'attribuer plus spécifiquement les effets observés ?
- puisque les P.P.A. sont des molécules chargées négativement, existe-t-il un lien entre leur acidité et leurs propriétés biologiques ?
- Les effets attribués aux P.P.A. de silène sont-ils spécifiques ?
- Existe-t-il des relations entre les effets provoqués par les P.P.A. et ceux d'autres facteurs de croissance ?

Les tentatives pour séparer les P.P.A. selon la taille des molécules n'a pas fourni d'excellents résultats. Selon les caractéristiques du gel utilisé, ils sortent tous à l'exclusion de la colonne ou se répartissent en un seul pic difficilement décomposable. Le fractionnement du milieu de culture qui avait mis en évidence l'apparition de nouveaux composés dans le milieu de culture, notamment à l'exclusion de la colonne, a été réutilisé pour montrer que toutes les fractions ne stimulent pas la croissance et que certaines s'avèrent même franchement inhibitrices. Soumis au même tamisage moléculaire les P.P.A. sont séparés en deux fractions dont seule la plus lourde est activatrice.

Par contre, le traitement des polymères sur une résine échangeuse d'anions constitue un moyen efficace pour les séparer. Dans ces conditions, les fractions s'avèrent d'autant plus activatrices qu'elles sont plus chargées. La fraction neutre, séparée du milieu de culture par chromatographie d'échange d'ions, est inhibitrice à la concentration habituelle de  $25 \text{ mg.l}^{-1}$  et devient activatrice lorsque la dose utilisée est diminuée. La mise sous forme H des groupements acides n'améliore pas leur effet d'une manière significative. Un traitement de déestérification effectué sur des P.P.A. bruts et sur la fraction neutre, issue de leur séparation par chromatographie d'échange d'ions, permet d'obtenir une amélioration des effets stimulants. La tentation d'attribuer ce supplément d'activation au démasquage de sites acides est grande, d'autant qu'il s'agit d'une tendance allant dans le même sens que les résultats précédents. Toutefois, le nombre limité d'essais effectués conduit à la prudence. Les analyses par chromatographie en phase gazeuse de la composition en monosaccharides des fractions séparées par chromatographie d'échange ionique confirme la présence d'acide galacturonique dans les fractions chargées et actives. Il ne s'agit pas d'une relation exclusive dans la mesure où la fraction neutre qui ne comprend pas d'acide uronique stimule néanmoins la croissance lorsqu'elle est utilisée à faible dose.

Les effets des P.P.A. sont probablement attribuables pour une grande part à la présence de l'acide galacturonique et au caractère chargé des polymères dans lesquels il est inséré. En effet, la plupart des oligosaccharides dont les effets ont été mis en évidence récemment dans les processus de défense des végétaux contre les insectes (RYAN et al., 1981 ; WALKER-SIMMONS et al., 1983) ou contre les microorganismes (LEE et WEST, 1981 ; MC NEIL et al., 1984) sont des composés pectiques comprenant l'acide galacturonique (BISHOP et al., 1981 ; HAHN et al., 1981 ; DAVIS et al., 1984). Ces observations peuvent également être rapprochées de l'action létale des enzymes pectiques sur les cellules (HISLOP et al., 1979 ; KEON, 1985). L'utilisation thérapeutique d'acides uroniques dans la lutte contre les infections fongiques dont sont victimes les arbres fruitiers vient d'être préconisée (KOEHLER et KOEHLER, 1985).

La question de la spécificité des effets des P.P.A. selon leur origine a pu être étudiée grâce à l'utilisation simultanée de plusieurs suspensions cellulaires. Les P.P.A. de silène sont actifs sur la croissance des cellules d'érable et stimulent nettement leur excrétion de P.P.A. mais ils sont totalement inefficaces sur la suspension cellulaire de ronce. Par contre, les P.P.A. d'érable et de ronce inhibent aussi sévèrement la croissance des souches qui les produisent que celle de la suspension cellulaire de silène. Il semble donc que les effets des P.P.A. ne soient pas spécifiques, compte tenu des conditions dans lesquelles ils ont été utilisés. Cette observation est confirmée par les essais réalisés sur les lentilles d'eau. Leur développement végétatif est largement stimulé par l'adjonction de P.P.A. de silène dans leur milieu de culture. L'effet est particulièrement sensible au niveau du nombre de frondes qui peut augmenter de 66 % en un mois en présence de la dose optimale de P.P.A..

Les effets régulateurs des facteurs de croissance sont le sujet d'investigations permanentes. La croissance des jeunes plantules est très souvent utilisée pour doser les phytohormones qui sont efficaces à très faible concentration. L'allongement de l'hypocotyle de concombre est sensible à la présence de 2,4-D. A faible dose (0,01 mg.l<sup>-1</sup>), l'auxine présente un effet favorable sur la croissance des plantules. Par contre, l'augmentation de la dose de l'auxine dans l'eau d'imbibition des graines ralentit l'élongation de l'hypocotyle, les variations sont significatives en 48 heures pour des doses de 2,4-D comprises entre 0,1 et 10 mg.l<sup>-1</sup>. L'introduction de P.P.A. dans l'eau d'imbibition stimule légèrement l'allongement des hypocotyles quelle que soit la dose employée. Au contraire, les P.P.A. s'avèrent inhibiteurs en présence de 2,4-D et l'effet produit est d'autant plus net que les doses de 2,4-D et de P.P.A. utilisées sont faibles. Les relations entre les auxines et le métabolisme pariétal sont bien connues notamment à travers la théorie acide de l'élongation (RAYLE et CLELAND, 1972 ; LABAVITCH et RAY, 1974). Le 2,4-D stimule la croissance (LEGUAY et GUERN, 1975) et la synthèse de composés pariétaux (RUBERY et NORTHCOTE, 1970) chez les cellules d'érable. MANTE et BOLL, (1978) précisent que cette stimulation concerne plus particulièrement l'élongation des cellules de haricot. Au contraire, c'est l'absence de l'auxine qui favorise l'élongation et la synthèse de polysaccharides dans la suspension cellulaire de carotte (LLOYD et al., 1980 ; MASUDA et al., 1984).

L'action des auxines dépend donc de la sensibilité du matériel biologique dont la réponse peut être totalement inversée. Ainsi la coopération entre le 2,4-D et les P.P.A. observée sur l'élongation de l'hypocotyle de concombre est inverse de l'antagonisme entre le 2,4-D et un xyloglucane issu du milieu de culture de la suspension cellulaire d'érable, sur l'élongation de l'épicotyle de pois (YORK et al., 1984).

La suspension cellulaire de silène est sensible à l'action des gibbérellines (BRASSART et al., 1982). La stimulation de la croissance s'accompagne d'une augmentation de l'excrétion des P.P.A. dans le milieu de culture (MORVAN, 1982). La chromatographie sur couche mince du milieu de culture et d'une solution de P.P.A. révèle que les cellules de silène excrètent dans le milieu de culture des substances émettant une fluorescence lorsqu'elles sont soumises à des radiations ultra-violettes. L'un de ces composés migre comme l'AG<sub>3</sub>, alors que les autres sont associés à des saccharides. La liaison entre des gibbérellines et des saccharides n'est pas due au procédé de préparation des P.P.A. puisque cette connexion préexiste dans le milieu de culture brut et que le C.T.A.B. n'entraîne pas la radioactivité associée à de l'AG<sub>3</sub> marqué, introduit dans le milieu de culture avant la précipitation des P.P.A.. Les moyens les plus fréquemment utilisés pour mesurer les effets des gibbérellines consistent en des essais biologiques, notamment sur la croissance des plantules de laitue et sur l'activité  $\alpha$ -amylasique dans l'albumen d'orge (COUILLEROT et YI, 1985). Les résultats des essais réalisés par MARIE-ALSABEK (1985), montrent que parmi les substances séparées du milieu de culture par chromatographie sur couche mince, celle qui correspond à l'emplacement caractéristique de l'AG<sub>3</sub> est la plus active. Ces essais s'intègrent dans un faisceau d'arguments plaidant en faveur de la présence de gibbérellines dans le complexe polysaccharidique que constituent les P.P.A.. L'effet des gibbérellines sur le métabolisme pariétal a été étudié dans les graines en germination (TAKAKI et DIETRICH, 1980). Il consiste en une stimulation de la production d'enzymes hydrolytiques, notamment dans la couche à aleurone des caryopses d'orge (TAIZ et HONIGMAN, 1976). Activateur très efficace de la croissance des tissus cultivés "in vitro" (HENGELSON et UPPER, 1970 ; LANCE et al., 1976), l'acide gibbérellique stimule également la sécrétion des pectines et des protéines (FRY, 1980).

5) Conclusion :

Les effets biologiques produits par les P.P.A. sont principalement des stimulations de la croissance. Les résultats enregistrés manquent de précision parce que l'étude n'a pas été prolongée au niveau moléculaire. Le principal renseignement recueilli concerne le rôle déterminant que joue l'acide galacturonique dans les effets stimulants observés. Il s'agit d'un résultat qui concorde avec les effets qui ont été attribués aux oligosaccharides pectiques (ALBERSHEIM et DARVILL, 1985). La confrontation fait apparaître les insuffisances qui subsistent au niveau de la caractérisation structurale des P.P.A. qui constitue la prochaine étape du travail engagé.

La comparaison des effets provoqués par les P.P.A. avec ceux qui sont occasionnés par les auxines et les gibbérellines n'est pas facilement interprétable en raison du nombre restreint de données expérimentales et des éléments contradictoires figurant dans la littérature. Chaque matériel biologique doit d'abord être considéré indépendamment car il possède une sensibilité aux facteurs de croissance qui lui est propre. Ce point de vue s'applique aux cellules de silène, capables de synthétiser des gibbérellines et de les émettre dans leur milieu de culture. Le point remarquable réside dans l'association entre l'acide gibbérellique et une partie des P.P.A. car elle permet de poser un certain nombre d'hypothèses :

- i) Les gibbérellines interviennent "in situ" dans la paroi et leur capacité à y trouver des sites de fixation ne peut que favoriser leur action ;
- ii) En se fixant dans la paroi, les gibbérellines peuvent encombrer le voisinage des polymères acides et modifier ainsi leur propriétés polyélectrolytiques (conformation, affinité et capacité d'échange ioniques) ;

La libération conjointe de gibbérellines et de fragments pectiques confère à ces derniers le rôle de transporteurs de substances de croissance. L'explication la plus immédiate des effets stimulants provoqués par les P.P.A. consiste à les attribuer aux gibbérellines liées. Cette interprétation séduisante est probablement réductrice si les propriétés acides des P.P.A. sont simultanément pris en compte.



## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'étude des polymères pectiques acides excrétés dans son milieu de culture par la suspension cellulaire de silène a été entreprise dans le cadre plus général de préoccupations concernant les relations entre les cellules et le milieu qui les entoure. Le but initial des expérimentations mises en oeuvre était de repérer puis de sélectionner des molécules susceptibles de modifier par leur présence les conditions d'échanges ioniques entre les cellules et le milieu extérieur. La seconde étape a été de caractériser ces composés par leur composition chimique et par quelques propriétés physico-chimiques. Il s'agissait de définir leur origine et de préparer des arguments pour analyser les résultats qui devaient provenir de la phase suivante du travail. Pour atteindre l'objectif défini à l'origine, il était nécessaire de mesurer les conséquences de la présence des P.P.A. dans le milieu de culture. L'idée originale du principe méthodologique choisi a été d'introduire les P.P.A. extraits des milieux de culture dans ceux qui venaient d'être préparés pour y ensemer des cellules et enclancher un nouveau cycle de culture.

Pour faciliter la démarche et compte tenu des travaux qui avaient déjà été effectués sur les suspensions cellulaires en général et sur celle de silène en particulier, les conditions de culture ont été délimitées très précisément. En raison de sa position périphérique, la paroi pectocellulosique est directement concernée par tous les processus d'échanges qu'il s'agisse des entrées de substances destinées à l'alimentation cellulaire ou du rejet des composés devenus inutiles ou encombrants pour le métabolisme.

La littérature faisant état de polysaccharides extracellulaires dans les milieux de culture des suspensions cellulaires et des protoplastes, les présente comme des composés d'origine pariétale. Les analyses de leur structure chimique ont permis la mise au point du modèle d'ALBERSHEIM qui est généralement considéré comme référence par la majorité des auteurs. Pour toutes ces raisons, l'évolution des P.P.A. dans le milieu de culture a constamment été reliée au métabolisme pariétal. Au coeur de la problématique poursuivie se trouve l'élongation, processus fondamental du métabolisme cellulaire dans lequel la paroi occupe à l'évidence une place prépondérante. Par hypothèse, cet aspect de la croissance a été retenu comme cause possible à l'excrétion de polysaccharides dans le milieu de culture. Par voie de conséquence, les effets provoqués par l'introduction des P.P.A. dans les milieux de culture neufs ont été également analysés et interprétés par rapport au grandissement cellulaire.

Le terme générique de polymères pectiques acides pour désigner les polyanions de nature saccharidiques présents dans le milieu de culture peut être utilisé avec la sécurité nécessaire grâce aux arguments biochimiques, physico-chimiques et cytochimiques qui démontrent leur parenté avec les pectines hydrosolubles des parois.

Les P.P.A. sont en fait un complexe multimoléculaire peu homogène en raison de la diversité des résidus monosaccharidiques neutres qui ont été identifiés dans le mélange. La difficulté rencontrée pour séparer différentes catégories de molécules et l'absence de détermination des masses qui s'en suit est un handicap certain pour interpréter les effets que provoque le complexe, à l'état brut, sur les différents systèmes biologiques auxquels il a été soumis.

Toutefois, les essais réalisés à partir de fractions séparées par chromatographie d'échange d'ions, à la suite de traitements de protonation et de saponification des liaisons esterifiées mettent en évidence le rôle prépondérant que joue l'acide polygalacturonique, notamment lorsque ses groupements carboxyliques se trouvent démasqués.

Les concentrations en P.P.A. qui s'avèrent les plus actives sont très faibles par rapport à aux doses de saccharose fournies comme source de carbone aux cellules, ce qui exclut tout rôle nutritif à leur attribuer. Par contre, ces concentrations sont largement supérieures à celles qui sont efficaces lorsqu'il s'agit de facteurs de croissance (2,4-D ou gibbérellines) et à celles qui sont mentionnées dans la littérature à propos des effets des oligosaccharides. La raison apparente est que ces derniers sont des fragments extrêmement purifiés à l'instar des P.P.A. qui le sont encore insuffisamment. Les effets comparés avec ceux du 2,4-D sur les plantules de concombre mettent bien en évidence l'importance de la dose utilisée dans l'intensité des réponses obtenues.

Les effets de type gibberellinique, bien que reposant sur une expérimentation relativement limitée, méritent une attention particulière. Il semble que l'intérêt principal des résultats est qu'ils mettent en évidence une liaison entre les P.P.A. et des gibbérellines dont au moins l'AG<sub>3</sub>. Dans ces conditions, l'action stimulante des P.P.A., analogue à celle de l'AG<sub>3</sub>, sur la croissance des cellules de silène trouve une explication satisfaisante. De plus, les composés pectiques apparaissent comme des points de fixation possibles pour les gibbérellines dans les parois, ce qui permet d'élaborer un certain nombre d'hypothèses à propos de leur mode d'action dans le contrôle de l'élongation : i) encombrement de l'espace au voisinage des sites destinés à la stabilisation des gels pectiques par le calcium ; ii) modification de la conformation des chaînes polygalacturoniques et de leur distribution de charge défavorable à leurs liaisons inter-chaînes ; iii) possibilité d'action directe sur les activités enzymatiques intrapariétales, responsables de la déstabilisation locale des liaisons inter-chaînes, nécessaire pour le glissement des microfibrilles cellulosiques lors de l'élongation.

Ces considérations introduisent directement le second aspect important de la présence des P.P.A. dans les milieux de culture, celui qui concerne le métabolisme pariétal et sa régulation. La parenté biochimique entre les P.P.A. et les pectines hydrosolubles de la matrice pariétale peut être considérée à travers les différences qui apparaissent selon le stade de la culture. A l'évidence, les P.P.A. sont des copies presque conformes des pectines intrapariétales et fournissent une image complémentaire de la composition de la matrice.

Le même raisonnement, appliqué dans l'analyse des propriétés physico-chimiques permet d'interpréter l'excrétion des P.P.A. à travers des changements de conformation des macromolécules dans la paroi. Selon le taux de méthylation des pectines en place dans la matrice pariétale, les liaisons inter-chaines sont plus ou moins résistantes aux contraintes mécaniques que subit la paroi lors de l'élongation. Selon les conditions de pH local, les polymères chargés subissent des transitions qui aboutissent à leur stabilisation ou au contraire à la possibilité d'être solubilisés puis évacués. L'inversion du coefficient de sélectivité entre le calcium et le magnésium, dans la matrice pariétale, dès le quatrième jour de culture, est un élément qui s'intègre dans la même suite de raisonnement : les relations privilégiées des polymères avec le magnésium semblent de nature à faciliter l'exclusion du calcium qui est un stabilisant notoire des gels pectiques. En fin de culture, lorsque le grandissement cellulaire n'a plus de raison d'être, le paramètre tend à s'inverser à nouveau en faveur du calcium. Le fait peut s'expliquer par l'intégration de nouvelles pectines, probablement moins méthylées et/ou substituées différemment, comme l'indique l'augmentation de la capacité d'échange cationique et la variation des masses équivalentes, en fin de culture.

Ces considérations conduisent à un modèle évolutif du métabolisme des pectines pariétales permettant d'y relier l'excrétion des P.P.A. : ceux-ci proviendraient d'un double pool de pectines. Le premier correspond aux composés des lamelles moyennes, ceux qui participent à l'élaboration de la paroi primitive. Ils se trouvent soumis au décapage, à l'érosion mécanique après la dissociation des cellules. Leur libération peut dépendre à la fois d'activités hydrolasiques locales et/ou des conditions d'environnement physico-chimique, favorables à leur dissémination dans le milieu de culture. Le second groupe de pectines sont celles qui constituent la matrice de la paroi primaire, au même titre que les hémicelluloses. Comme les arguments cytochimiques en témoignent, leur intégration dans la paroi est continue tout au long de la culture. Les propriétés physico-chimiques des pectines extraites des parois comme celles des P.P.A. évoluent au cours du temps, en fonction de la phase de croissance considérée (multiplication cellulaire ou élongation). Il est aisé d'imaginer que leur renouvellement constitue l'une des formes de la régulation du métabolisme pariétal.

En se référant à l'objectif de départ, il convenait de mesurer concrètement les modifications des paramètres du milieu de culture consécutives à l'introduction des P.P.A.. Les résultats obtenus au niveau du potentiel osmotique ou du pH sont relativement décevants. La raison peut en être que les paramètres ont été mal choisis. En effet, le potentiel osmotique comme le pH sont en fait les résultantes de multiples mouvements de solutés et un effet donné peut être contrebalancé par un effet inverse, notamment au niveau des échanges ioniques. Cependant, les résultats concernant la consommation du calcium en présence de P.P.A. supplémentaires confirment que leur action sur la disponibilité réelle de cet élément n'est pas nulle : les variations des coefficients d'activité dans le milieu en témoignent. Ils diminuent régulièrement à mesure que la concentration en P.P.A. augmente. Ainsi s'impose progressivement la notion d'un réseau exo-pariétal, disséminé dans le milieu de culture. La confirmation est obtenue par la visualisation directe de ce réseau en microscopie électronique. La signification physique du concept d'exo-paroi qui est proposé est encore à définir : des mesures de viscosité pourraient étayer une démonstration dans ce sens.

Par contre, la signification physiologique paraît plus immédiatement accessible, même sur le mode spéculatif : il existe des convergences morphologiques suffisantes entre les cellules de silène et les protoplastes en général pour considérer ces cellules comme des entités à peine plus élaborées. Leur paroi, exclusivement primaire, est très fine et l'émission abondante de vésicules chargées de matériel pariétal indiquent qu'une grande partie du métabolisme cellulaire est orienté dans les deux cas vers le renforcement des parois. Les cellules réagiraient ainsi à une situation de stress permanent ou à défaut renouvelé par les repiquages fréquents. L'excrétion de polymères dotés de propriétés polyélectrolytes dans le milieu de culture procéderait d'une réaction de défense des cellules contre les agressions extérieures.

L'ensemble de l'étude des P.P.A. excrétés par la suspension cellulaire de silène peut être résumé à l'extrême sous la forme suivante : un complexe polyanionique d'origine pariétale est émis dans le milieu de culture par des cellules qui trouvent ainsi un moyen de se défendre par l'intermédiaire d'une extension extracellulaire de leur paroi. Les molécules qui le compose proviennent en grande partie de la régulation du métabolisme pariétal au moment de l'élongation cellulaire.

Elles sont en outre capables de stimuler le mécanisme qui est à l'origine de leur libération. Au delà, leur action présente des analogies avec celle qui a été attribuée par ailleurs à des oligosaccharides pariétaux.

Les insuffisances que comporte fatalement le modèle proposé se situent à trois niveaux : i) le fractionnement des P.P.A. en composés davantage purifiés et mieux caractérisés physiquement ; ii) l'identification précise des structures chimiques fines ; iii) la précision des effets provoqués par ces composés sur les systèmes biologiques auxquels ils sont soumis. Cette autocritique constitue le ferment de la poursuite du travail engagé. L'expérience analytique, acquise sur le terrain doit être renforcée grâce à la collaboration avec des laboratoires spécialisés, la détermination des structures détaillées des oligosaccharides constituant un sujet de recherche en tant que tel. Au plan physiologique, le mode d'action, les effets inducteurs ou régulateurs que semblent provoquer les P.P.A. méritent d'être approfondis. La première question est de savoir si ces molécules pénètrent dans les cellules pour intercéder directement au niveau du génome et induire les réponses, lesquelles doivent d'ailleurs être mieux définies au niveau moléculaire. Dans le cas contraire, différentes hypothèses peuvent être proposées : compte tenu de leur origine pariétale, les P.P.A. peuvent trouver dans la matrice de la paroi proprement dite les sites récepteurs susceptibles de constituer des points d'impacts réactionnels. Les enzymes intrapariétales sont des interlocuteurs potentiels. Les P.P.A. peuvent également traverser la paroi et trouver des cibles membranaires. Les candidats comme relais pour prolonger l'information jusqu'au noyau ne sont pas nombreux : le calcium est à placer au premier rang en raison de son affinité avec les P.P.A., à cause de sa localisation membranaire et parce qu'il est de plus en plus considéré comme le second messager cytoplasmique devant les nucléotides monophosphates.

Le programme est ambitieux mais de nombreux travaux sont actuellement en cours sans doute parce que les chercheurs considèrent les succès acquis récemment comme prometteurs. Le travail présenté ici n'est qu'une ébauche, une première étape en direction d'une meilleure appréciation du rôle de la paroi et des oligosaccharides qu'elle recèle.

## BIBLIOGRAPHIE

AKIYAMA Y. and K. KATO, 1981.- An extracellular arabinogalactanprotein from Nicotiana tabacum.

Phytochem., 20 : 2507-2510.

AKIYAMA Y. and K. KATO, 1982.- Methylation analysis of extracellular polysaccharides from suspension cultured cells of Nicotiana tabacum.

Phytochem., 21 : 1325-1329.

AKIYAMA Y., EDA S., MORI M. and K. KATO, 1983.- A galactoglucomannan from extracellular polysaccharides of suspension-cultured cells of Nicotiana tabacum.

Phytochem., 22 : 1177-1180.

ALBERSHEIM P., 1974-a.- The primary cell wall and control of elongation growth.

In : Plant Carbohydrate Biochemistry, J.B. JACOB ed., Acad. Press London,

ALBERSHEIM P., 1974-b.- Structure and growth of walls of cells in culture.

In : Tissue Culture and Plant Science, H.E. STREET ed., Acad. Press,

ALBERSHEIM P., Mc NEIL M. and J.M. LABAVITCH, 1976.- The wall of growing cells.

In : Plant Growth Regulation, P.E. PILET ed., Springer Verlag Berlin, 1-11.

ALBERSHEIM P., DARVILL A.G., DAVIS K.R., LAU J.M., McNEIL M., SHARP J.K. and YORK W.S., 1984.- Why study the structures of biological molecules ? The importance of studying the structures of complex carbohydrates.

In : Structure, Function, and Biosynthesis of Plant Cell Wall, W.M. DUGGER and S. BARTNICKI-GARCIA ed., Proc. 7th Ann. Symp. Bot., 19-51.

ALBERSHEIM P. et A.G. DARVILL, 1985.- Les oligosaccharines.

Pour la Science, 18-26.

ASAMIZU T., NAKAYAMA N. and A. NISHI, 1984.- Pectic polysaccharides in carrot cells growing in suspension culture.

Planta, 160 : 469-473.

ASPINALL G.O. and C.T. GREENWOOD, 1962.- Aspects of the chemistry of cereal polysaccharides.

J. Inst. Brew., 68 : 167-178.

ASPINALL G.O., CRAIG J.W.T. and J.L. WHYTE, 1968.- Lemon peel pectin. I: Fractionation and partial hydrolysis of water-soluble pectin.

Carbohydr. Res., 7 : 442-452.

ASPINALL G.O., MOLLOY J.A. and J.W.T. CRAIG, 1969.- Extracellular polysaccharides from suspension-cultured sycamore cells.

Can. J. Biochem., 47 : 1063-1070.

ASPINALL G.O., 1980.- Chemistry of cell wall polysaccharides.

In : The Biochemistry of Plants, J. PREISS ed., Vol. 3, Acad. Press

AYERS A.R., EBEL J., VALENT B. and P. ALBERSHEIM, 1976-a.- Host pathogen interactions. IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of Phytophthora megasperma var. Sojae.

Plant Physiol., 57 : 751-759.

AYERS A.R., EBEL J., FINELLI F., BERGER N. and P. ALBERSHEIM, 1976-b.- Host-pathogen interactions. X. Fractionation and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of Phytophthora megasperma Var. Sojae.

Plant Physiol., 57 : 760-765.

BAKER C.J., AIST J.R. and D.F. BATEMAN, 1980.- Ultrastructural and biochemical effects of endopectate lyase on cell walls from cell suspension culture of bean and rice.

Can. J. Bot., 58 : 867-880.

BARNOUD F., MOLLARD A. et G.G.S. DUTTON, 1977.- Une xyloglucane 1-4 présente dans le milieu de culture des suspensions cellulaires de Rosa glauca.

Physiol. Vég., 15 : 153-161.



BATES G.W. and P.M. RAY, 1981.- pH dependent interactions between Pea cell wall polymers possibly involved in wall deposition and growth.  
Plant Physiol., 68 : 158-164.

BAUER W.D., TALMADGE K.W., KEEGSTRA K. and P. ALBERSHEIM, 1973.- The structure of plant cell walls. II: The hemicellulose of the walls of suspension cultured sycamore cells.  
Plant Physiol., 51 : 174-187.

BAYDOUN E.A. and C.T. BRETT, 1984.- The effect of pH on the binding of calcium to Pea epicotyl cell walls and its implications for the control of cell extension.  
J. Exp. Bot., 35 : 1820-1831.

BAYLEY J.A., 1982.- In : Phytoalexins, J.A. BAYLEY & J.W. MANSFIELD eds., Halsted Wiley, New York, 289-318, 334 p.

BAYLISS M.W., 1977.- The effect of 2,4-D on growth and mitosis in suspension cultures of Daucus carota.  
Plant Sci. Letters, 8 : 99-103.

BECKER G.E., HUI P.A. and P. ALBERSHEIM, 1964.- Synthesis of extracellular polysaccharide by suspensions of Acer pseudoplatanus cells.  
Plant Physiol., 39 : 913-920.

BENBADIS A., 1965.- Croissance de cellules isolées de ronce sur des milieux nutritifs "conditionnés" per des quantités variables de tissus.  
C. R. Acad. Sc. Paris, 261 : 4829-4832.

BENNET-CLARK T.A., 1956.- Salt accumulation and mode of action of auxin.  
In : The Chemistry and Mode of Action of Plant Growth Substances.

BIGOT J. et P. BINET, 1984.- Etude comparative, par titrage, de quelques caractéristiques électrochimiques de parois isolées des racines de Cochlearia anlica et de Phaseolus vulgaris.  
Physiol. Vég., 22 : 83-92.

BISHOP P.D., MAKUS D.J., PEARCE G. and C.A. RYAN, 1981.- Proteinase inhibitor-inducing factor activity in tomato leaves resides in oligosaccharides enzymically released from cell walls.  
Proc. Natl. Acad. Sci., 78 : 3536-3540.

BISTER-MIEL F., GUIGNARD J.L., BURY M. et C. AGIER, 1985.- Action compensatrice de la glutamine sur la croissance des cellules végétales "in vitro" lors de la carence en phosphore.

Bull. Soc. Bot. Fr., 132 : 5-14.

BITTER T. and H.M. MUIR, 1962.- A modified uronic acid carbazole reaction.

Anal. Biochem., 4 : 330-334.

BLACKELY L.M. and F.C. STEWARD, 1964.- Growth and organized development cells. V. The growth of colonies from free cells on nutrient agar.

Amer. J. Bot., 51 : 780-791.

BLASCHEK W., HAASS D., KOEHLER H. and G. FRANZ, 1981.- Cell wall regeneration by Nicotiana tabacum protoplasts: chemical and biochemical aspects.

Plant Sci. Letters, 22, 47-57.

BLASCHEK W. and G. FRANZ, 1983.- Influence of growth conditions on the composition of cell wall polysaccharides from cultured tobacco cells.

Plant Cell Reports, 2 : 257-260.

BLUMENKRANTZ N. and G. ASBOE-HANSEN, 1973.- New method for quantitative determination of uronic acids.

Anal. Biochem., 54 : 484-489.

BONNETT H.T. and E.H. NEWCOMB, 1966.- Coated vesicles and other cytoplasmic components of growing root hairs of radish.

Protoplasma, 62 : 59-75.

BRASSART C., DUBOIS J. et R. BOURIQUET, 1977.- Nutrition carbonée d'une suspension cellulaire de Silène (Silene alba (Miller) E.H.L. Krause).

C. R. Acad. Sc. Paris, 285 : 759-762.

BRASSART C., DUBOIS J. et R. BOURIQUET, 1978.- Nutrition azotée d'une suspension cellulaire de Silène (Silene alba (Miller) E.H.L. Krause).

C. R. Acad. Sc. Paris, 287 : 1373-1376.

BRASSART C., DUBOIS J. et R. BOURIQUET, 1982.- Effets de l'acide gibberellique sur la croissance des cellules de Silène.

Bull. Soc. Bot. Fr., 129 : 259-269.

BRASSART C., RAMBOUR S. et BOURIQUET R., 1984.- Activités glutamate déshydrogénase et glutamine synthétase d'une suspension cellulaire de Silene alba cultivée en présence de différentes sources d'azote.

Physiol. Vég., 22 : 801-809.

BRILLOUET J.M. and B. CARRE, 1983.- Composition of cell wall from cotyledons of Pisum sativum, Vicia faba and Glycine max.

Phytochem., 22 : 841-847.

BRUCE R.J. and C.A. WEST, 1982.- Elicitation of casbene synthetase activity in castor bean. The role of pectic fragments of plant cell wall in elicitation by a fungal endopolygalacturonase.

Plant Physiol., 69 : 1181-1188.

BRUMMELL D. A. and J. L. HALL, 1985.- The role of cell wall synthesis in sustained auxin-induced growth.

Physiol. Plant., 63 : 406-412.

BRUMMER B. and R.W.PARISH, 1983.- Mechanisms of auxin-induced cell elongation. Hypothesis.

F.E.B.S., 161 : 9-13.

BRUMMER B., FELLE H. and R.W. PARISH, 1984.- Evidence that acid solutions induce plant cell elongation by acidifying the cytosol and stimulating the proton pump.

F.E.B.S., 174 : 223-227.

BURGESS J., WATTS J.W., FLEMING E.N. and J.M. KING, 1973.- Plasmalemma fine structure in isolated tobacco mesophyll protoplasts.

Planta., 110 : 291-301.

BURKE D., KAUFMAN P., Mc NEIL M. and P. ALBERSHEIM, 1974.- The structure of plant cell walls. VI : A survey of the walls of suspension-cultured monocots.

Plant Physiol., 54 : 109-115.

CAMEFORT H., 1970.- Sur l'origine et l'activité des structures de type lomasome observées dans les embryons du Cryptomeria japonica D. Don.

In : Microscopie électronique, Favard ed., 7ème Cong. Int. Micro. Elect., Grenoble, 3 : 449-450.

CARCELLER M., DAVEY M.R., FOWLER M.N. and H.E. STREET, 1971.- The influence of sucrose, 2,4-D and Kinetin on the growth, fine structure and lignin content of cultured Sycamore.

Protoplasma, 73 : 367-385.

CATHALA N., GHORBAL M.H., LAMANT A. et L. SALSAC, 1978.- Obtention de parois cellulosiques à l'aide d'un détergent : étude préliminaire de leur composition minérale.

C. R. Acad. Sc. Paris, 286 : 1025-1027.

CESARO A., CIANA A., DELBEN F., MANZINI G. and S. PAOLETTI, 1982.- Physicochemical properties of pectic acid. I: Thermodynamic evidence of a pH-induced conformational transition in aqueous solution.

Biopolymers, 21 : 431-449.

CHABOUD A. et M. ROUGIER, 1981.- Sécrétions racinaires mucilagineuses et rôle dans le rhizosphère.

Ann. Biol., 4 : 313-326.

CHABOUD A., 1983.- Isolation, purification and chemical composition of maize root cap slime.

Plant Soil, 73 : 395-402.

CHAMBAT G. and J.P. JOSELEAU, 1980.- Isolation and characterization of a homogalacturonan in the primary walls of rosa cells cultures "in vitro".

Carbohydr. Res., 85 : C10-C12.

CHAMBAT G, J.P. JOSELEAU and F. BARNOUD, 1981.-The carbohydrate constituents of the cell wall of suspension cultures.

Phytochem., 20 : 241-246.

CHAMBAT G., 1982.- Isolement, étude moléculaire et interrelations des polysaccharides de la paroi des cellules de Rosa glauca cultivées "in vitro".

Thèse Doct. Sci. Nat., Grenoble, 330 p.

CHAMBAT G., BARNOUD F. and J.P. JOSELEAU, 1984.- Structure of the primary cell walls of suspension-cultured Rosa glauca cells. I : Polysaccharides associated with cellulose.

Plant Physiol., 74 : 687-693.

CHANG S.T. and K. TANAKA, 1970.- The ultrastructure of complex membranes in the germinating spore of Volvariella volvacea.

In : Microscopie électronique, Favard ed., 7ème Cong. Int. Micro. Elect., Grenoble, 3 : 437-438.

CLARKE A.E., ANDERSON R.L. and B.A. STONE, 1979.- Form and function of arabinogalactans and arabinogalacton-proteins.

Phytochemistry, 18 : 521-540.

CLELAND R., 1968.- Hydroxyproline formation and its relation to auxin-induced cell elongation in the Avena coleoptile.

Plant Physiol., 43 : 1625-1630.

CLELAND R.E. and D.L. RAYLE, 1977.- Reevaluation of the effect of calcium ions on auxin -induced elongation.

Plant Physiol., 60 : 709-712.

CLELAND R.E., 1983.- The capacity for acid-induced wall loosening as a factor in the control of Avena coleoptile cell elongation.

J. Exp. Bot., 34 : 676-680.

COHEN J.D. and K.D. NADLER, 1976.- Calcium requirement for I.A.A. induced acidification by Avena sativa coleoptiles.

Plant Physiol., 57 : 347-350.

COUILLEROT J.P. et Y.B. YI, 1985.- Exsudation racinaire de gignérellines lors de la culture hydroponique de Lycopersicon esculentum Mill.

C. R. Acad. Sc. Paris, 301 : 99-102.

CRASNIER M., NOAT G. and J. RICARD, 1980.- Purification and molecular properties of acid phosphatase from sycamore cell walls.

Plant Cell Environment, 3 : 217-224.

DARVILL A.G., Mc NEIL M. and P. ALBERSHEIM, 1978.- Structure of plant cell walls. VIII : A new pectic polysaccharide.

Plant Physiol., 62 : 418-422.

DARVILL J.E., Mc NEIL M., DARVILL A.G. and P. ALBERSHEIM, 1980-a.- Structure of plant cell walls. XI: Glucuronoarabinoxylan, a second hemicellulose in the primary cell walls of suspension-cultured sycamore cells.

Plant Physiol., 66 : 1135-1139.

DARVILL A.G., Mc NEIL M., ALBERSHEIM P. and D.P. DELMER, 1980-b.-  
The primary cell walls of flowering plants.

In : The Biochemistry of Plants, N.E. TOLBERT ed., Vol. 1, Acad. Press

DARVILL A.G., ALBERSHEIM P., McNEIL M., LAU J.M., YORK W.S.,  
STEVENSON T.T., THOMAS J., DOARES S., GOLLIN D.J., CHELF P. and K.  
DAVIS, 1985. Structure and function of plant cell wall polysaccharides.  
J. Cell. Sci. Suppl. 2 : 203-217.

DAVIS K.R., LYON G.D., DARVILL A.G. and P. ALBERSHEIM, 1982.- A  
polygalacturonic acid lyase isolated from Erwinia carotovora is an elicitor  
of phytoalexins in soybeans.

Plant Physiol., 69 (suppl.) : N° 787.

DAVIS K.R., DARVILL A.G. and P. ALBERSHEIM, 1984.- Identification of  
oligogalacturonide-elicitors of phytoalexin accumulation released from  
sodium polypectate by an endopolygalacturonic acid lyase.

In: Structure, Function, and Biosynthesis of Plant Cell Wall, W.M. DUGGER  
& S. BARTNICKI-GARCIA eds., Proc. 7th Ann. Symp. Bot., 409-412.

DE JONG D.W., OLSON A.C., HAWKER K.M. and E.F. LANSEN, 1968.- Effect  
of cultivation temperature on peroxydase isoenzymes of plant cells grown  
in suspension.

Plant Physiol., 43 : 841-844.

DE VRIES J.A., ROMBOUTS F.M., VORAGEN A.G.J. and W. PILNIK, 1982.-  
Enzymic degradation of apple pectins.

Carbohydrate Polymers, 2 : 25-33.

DEA I.C.M. and A. MORRISON, 1975.- Chemistry and interactions of seed  
galactomannans.

In : Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 31.

DEMARLY Y., 1978.- Organisation du polymorphisme.

Le Sélectionneur français, 26 : 3-81.

DEMARTY M., MORVAN C., and M. THELLIER, 1984.- Calcium and the cell  
wall.

Plant Cell Env., 7 : 441-448.

DISCHE Z., 1947.- A new specific reaction of hexuronic acids.

J. Biol. Chem., 167 : 189-198.

DOUGALL D.K., 1980.- Nutrition and metabolism.

In : Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals, E.J. STABA ed.,  
C.R.C. Press, 21-58.

DUBOIS J. et R. BOURIQUET, 1973/1974.- Culture in vitro de tissus et de  
suspensions cellulaires du Silene alba (Miller) E.H.L. Krause.

Bull. Soc. Bot. N. Fr., 26-27, 43-54.

DUBOIS J., RAMBOUR S. et J. VASSEUR, 1976.- Croissance d'une  
suspension cellulaire du Silene (Silene alba (Miller) E.H.L. Krause) et  
évolution des acides nucléiques.

Actes 101ème Cong. Nat. Soc. Sav., 1 : 441-454.

DUBOIS J. et H. MORVAN., 1978.- Effets de la température et de la  
lumière sur la croissance des suspensions cellulaires de Silene et  
d'Erable.

Bull. Soc. Bot. Fr., 125 : 407-420.

DUBOIS J., 1980.- Composés sulfhydriles 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. Nat., Lille, 335 p.

DURAND G. et A. PAREILLEUX, 1979.- Quelques aspects technologiques  
des cultures de cellules végétales.

In : Production de substances naturelles par culture "in vitro" de tissus et  
de cellules de végétaux, Journées d'études D.G.R.S.T., Apria, 131-144.

EDA S. and K. KATO, 1978.- An arabinoxyloglucan isolated from the midrib  
of the leaves of Nicotiana tabacum.

Agric. Biol. Chem., 42 : 2253-2257.

EDA S. and K. KATO, 1980.- A pectin isolated from the midrib of leaves of  
Nicotiana tabacum.

Agric. Biol. Chem., 44 : 2793-2801.

EDA S., AKIYAMA Y., KATO K., ISHIZU A. and J. NAKANO, 1983.-  
Methylation analysis of cell wall polysaccharides from  
suspension-cultured cells of Nicotiana tabacum.

Agric. Biol. Chem., 47 : 1783-1789.

EL HINNAWY E., 1974.- Chelating compounds as cell wall loosening agents in suspension culture of Melilotus alba.

Z.Pflanzenphysiol.Bd., 71 : 207-219.

ELLIOTT D.C., BATCHELOR S.M., CASSAR R.A and N.G. MARINOS, 1983.- Calmodulin -binding drugs affect responses to cytokinin, auxin and gibberellic acid.

Plant Physiol., 72 : 219-224.

EPSTEIN L. and D.T.A. LAMPORT, 1984.- An intramolecular linkage involving isodityrosine in extension.

Phytochem., 23 : 1241-1246.

ESQUERRE-TUGAYE M.T. et D. MAZAU, 1981.- Les glycoprotéines à hydroxyproline de la paroi végétale.

Physiol. Vég., 19 : 415-426.

FEGHALI R., 1985.- Contribution à la nutrition minérale de la suspension cellulaire de silène (Silene alba (Miller) E.H.L. Krause). Effets du calcium sur l'excrétion des polysaccharides pariétaux.

D.E.A., Lille, 48 p.

FINCHER G.B., STONE B.A. and A.E. CLARKE, 1983.- Arabinogalactane-proteins : structure, biosynthesis and function.

Ann. Rev. Plant Physiol., 34 : 47-70.

FISHER M.L. and P. ALBERSHEIM, 1974.- Characterization of a H<sup>+</sup> efflux from suspension-cultured plant cells.

Plant Physiol., 53 : 464-468.

FRANZ G., 1972.- Polysaccharidmetabolismus in den Zellwänden wachsender Keimlinge von Phaseolus aureus.

Planta, 102 : 334-347.

FREY-WISSLING A., 1969.- The ultrastructure and biogenesis of native cellulose.

Fortschr. Chem. Organ. Naturist., 27 : 1-30.

FRY S.C., 1979.- Phenolic components of the primary cell wall and their possible rôle in the hormonal regulation of growth.

Planta, 146 : 343-351.



FRY S.C., 1980.- Gibberellin-controlled pectinic acid and protein secretion in growing cells.

Phytochem., 19 : 735-740.

FRY S.B., 1982-a.- Phenolics components of the primary cell wall.

Biochem. J., 203 : 493-504.

FRY S.C., 1982-b.- Isotyrosine, a new cross-linking acid from plant cell-wall glycoprotein.

Biochem. J., 204 : 449-455.

FRY S.C., 1983.- Feruloylated pectins from the primary cell walls : their structure and possible function.

Planta, 157 : 111-123.

FRY S.C., 1984.- Isodityrosine - its detection, estimation and chemical synthesis.

Methods in Enzymology, 107 : 388-397.

FRY S.C., 1985.- Primary cell wall metabolism.

Oxford Surveys of Plant Mol. and Cell Biol., 2 : 1-42.

FRY S.C. and H.E. STREET, 1980.- Gibberellin-sensitive suspension cultures.

Plant Physiol., 65 : 472-477.

GADEN E.L., 1955.-

Chem. Ind., 154-168.

GALAMBOS J.T., 1967.- The reaction of carbazole with carbohydrates. I. Effect of borate and sulfamate on the carbazole color of sugars.

Anal. Biochem., 19 : 119-132.

GAMBORG O.L. and D.E. EVELEIGH, 1968.- Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley.

Can. J. Biochem., 46 : 417-421.

GAMBORG O.L., MILLER R.A. and K. OJIMA, 1968.- Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells.

Exp. Cell Res., 50 : 151-158.

GAMBORG O.L., 1970.- The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture.

Plant Physiol., 45 : 372-375.

GINZBURG B.Z., 1961.- Evidence for a protein gel structure cross-linked by metals cations in the intercellular cement of plant tissue.

J. Exp. Bot., 12 : 85-107.

GLEBA Y.Y., 1978.- Microplet culture of tobacco plants from single mesophyl protoplast.

Naturwiss., 65 : 158-159.

GOLDBERG R., 1977.- On possible connections between auxin induced growth and cell wall glucanase activities.

Plant Cell Letters, 8 : 143-147.

GOLDBERG R. and R. PRAT, 1982.- Involvement of cell wall characteristics in growth processes along the mung bean hypocotyl.

Plant & Cell Physiol., 23 : 1145-1154.

GOLBERG R., MORVAN C. and J.C. ROLAND, 1986.- Composition, properties and localization of pectins in young and mature cells of the mung bean hypocotyl.

Plant & Cell Physiol., 27 : 417-429.

GOLLIN D.J., DARVILL A.G. and ALBERSHEIM P, 1984.- Plant cell wall fragments inhibit flowering and promote vegetative growth in Lemna gibba G3.

Biol. Cell., 51 : 275-280.

GRANT G.T., MORRIS E.R., REES D.A., SMITH P.J.S. and D. THOM, 1973.- Biological interactions between polysaccharides and divalents cations : the egg-box model.

F.E.B.S. Letters, 32 : 195-198.

GRIGNON C., 1968.- Absorption du potassium par des suspensions cellulaires d'érable (Acer pseudoplatanus L.).

Thèse 3e cycle, Paris, 121 p.

GRIGNON C., 1969.- Etude de l'incorporation du <sup>42</sup>K par les suspensions cellulaires d'Erable.

Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég., 15 : 193-211.

GRIGNON C., 1974.- Etude des flux et de la distribution endocellulaire du potassium chez les cellules libres d'Acer pseudoplatanus.

Thèse Doct. Sci. Nat., Paris, 300 p.

GUDIN S., 1984.- Contribution à l'étude du passage de la mixotrophie à la photoautotrophie dans des suspensions cellulaires de Myrtillocactus geometrizans et Euphorbia characias.

DEA, Nice, 32 p.

GUERN J., 1979.- Les cellules de plantes 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, Journées d'études D.G.R.S.T., Apria, 91-108.

HAGEGE R. et J. HAGEGE, 1980.- La pratique du microscope électronique conventionnel. Coll. Techn. Lab., Masson ed., Paris, ISBN 2.225.66814.0, 123 p.

HAHN M.G., DARVILL A.G. and P. ALBERSHEIM, 1981. Host-Pathogen interactions. XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans.

Plant. Physiol., 68 : 1161-1169.



HALL D., MOLLENHAUER H.H. and D.J. MORRE, 1966.- Evidence for secretion of cell dispersing enzymes from maize root cap and epidermis.

Amer. J. Bot., 75 : 65-69.

HANSON J.B. and A.J. TREWAVAS, 1982.- Regulation of plant cell growth : the changing perspective.

New Phytol., 90 : 1-18.

HARRIS P.J. and D.H. NORTHCOTE, 1970.- Patterns of polysaccharide biosynthesis in differentiating cells of maize root tips.

Biochem. J., 120 : 479-491.

HAYASHI T., KATO K. and K. MATSUDA, 1980.- Xyloglucan from suspension-cultured soybean cells.

Plant & Cell Physiol., 21 : 1405-1418.

HEINZE U. and F. AMELUNXEN, 1984.- Zur Schleimbildung in Linum-Samen Elektronenmikroskopische und chemische Analysen.

Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd., 97 : 451-464.

HELLER R., 1953.- Recherche sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés "in vitro".

Ann. Sc. Nut. Bot. Biol. Vég., 14 : 1-223.

- HENGELSON J.P. and C.D. UPPER, 1970.- Modification of logarithmic growth rates of tobacco callus by gibberellic acid.  
Plant Physiol., 46 : 113-117.
- HENSHAW G.G., JHA K.A., METHA A.R., SHAKESHAFT D.J. and H.E. STREET, 1966.- Studies on the growth in culture of plant cells. I : Growth patterns in batch propagated suspension cultures.  
J. Exp. Bot., 17 : 362-377.
- HISLOP E.C., KEON J.P.R. and A.H. FIELDING, 1979.- Effects of pectin lyase from Monilia fructigena on viability, ultrastructure and localization of acid phosphatase of cultured apple cells.  
Physiol. Plant Pathol., 14 : 371-381.
- HORI H. and S. SATO, 1977.- Extracellular hydroxyproline-rich glycoprotein of suspension-cultured tobacco cells.  
Phytochem., 16 : 1485-1487.
- HUBERMAN M., GOREN R. and E. ZAMSKI, 1983.- Anatomical aspects of hormonal regulation of abscission in citrus. The shoot-peduncle abscission zone in the non-abscising stage.  
Physiol. Plant., 59 : 445-454.
- ISHII S., 1981.- Isolation and characterization of cell-wall pectic substances from potato tuber.  
Phytochem., 20 : 2329-2333.
- ISHII S., 1982.- Enzymic extraction and linkage analysis of pectic polysaccharides from onion.  
Phytochem., 21 : 778-780.
- JACQUES F., 1984.- Contribution à l'étude biochimique des polysaccharides acides excrétés dans le milieu des suspensions cellulaires de Silène (Silene alba (Miller) E.H.L. Krause) cultivées en tube.  
D.E.A., Lille, 76 p.
- JARVIS M.C., HALL M.A., THRELFALL D.R. and J. FRIEND, 1981-a.- The polysaccharide structure of potato cell walls : chemical fractionation.  
Planta, 152 : 93-100.
- JARVIS M.C., THRELFALL D.R. and J. FRIEND, 1981-b.- Potato cell wall polysaccharides : degradation with enzymes from Phytophthora infestans.  
J. Exp. Bot., 32 : 1309-1319.

JARVIS M.C., 1984.- Structure and properties of pectin gels in plant cell walls.

Plant Cell Env., 7 : 153-164.

JASPERS E.M.J. and H. VELDSTRA, 1965.- An  $\alpha$ -amylase tobacco grown from gall tissue cultures. II. Measurement of the activity in media and tissues.

Physiol. Plant., 18 : 626-634.

JONES D.D. and D.J. MORRE, 1973.- Golgi apparatus mediated polysaccharide secretion by outer root cap cells of Zea mays. III. Control by exogenous sugars.

Physiol. Plant., 29 : 68-75.

JONES L.E., HILDEBRANDT A.C., RIKER A.J. and J.H. WU, 1960.- Growth of somatic tobacco cells in microculture.

Amer. J. Bot., 47 : 468-475.

JONES T.M. and P. ALBERSHEIM, 1972.- A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic constituents of plant cell wall polysaccharides.

Plant Physiol., 49 : 926-936.

JOSELEAU J.P. et G. CHAMBAT, 1981.- Variation des activités de type cellulase et polygalacturonase dans les cellules de Rosa glauca cultivées en milieu liquide.

Physiol. Vég., 18 : 443-451.

JOSELEAU J.P. and G. CHAMBAT, 1984.- Structure of the primary cell walls of suspension-cultured Rosa glauca cells. II: Multiple forms of xyloglucans.

Plant Physiol., 74 : 694-700.

KAO K.N. and M.R. MICHAYLUK, 1975.- Nutritional requirements for growth of Vicia hajostana cells and protoplasts at very low population density in liquid media.

Planta, 126 : 105-110.

KARACSONYI S., V. KOVACIK, J. ALFOLDI and M. KUBACKOVA, 1984.- Chemical and  $^{13}\text{C}$ -N.M.R. studies of an arabinogalactan from Larix sibirica L.

Carbohydr. Res., 134 : 265-274.

KATO A , FUKASAWA A., SHIMIZU Y., SOH Y. and S. NAGAI, 1977.- Requirements of PO<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub>, SO<sub>4</sub>, K, and Ca for the growth of tobacco cells in suspension culture.

J. Ferm. Techn., 55 : 207-212.

KATO K. and M. NOGUCHI, 1976.- Sugar composition of cell wall polysaccharides of suspension-cultured tobacco cells.

Agric. Biol. Chem., 40 : 1923-1928.

KATO K., WATANABE F. and S. EDA, 1977.- An arabinogalactan from extracellular polysaccharides of suspension-cultured tobacco cells.

Agric. Biol. Chem., 41 : 533-538.

KATO K. and K. MATSUDA, 1980-a.- Structure of oligosaccharides obtained by controlled degradation of mung bean xyloglucan with acid and Aspergillus oryzae.

Agric. Biol. Chem., 44 : 1751-1758.

KATO K. and K. MATSUDA, 1980-b.- Structure of oligosaccharides obtained by hydrolysis of mung bean xyloglucan with Trichoderma viride cellulase.

Agric. Biol. Chem., 44 : 1759-1766.

KATO Y. and K. MATSUDA, 1985-a.- Acidic arabinoxylan as an extracellular polysaccharide of suspension-cultured soybean cells.

Plant Cell Physiol., 26(2): 287-294.

KATO Y. and K. MATSUDA, 1985-b.- Xyloglucan in the cell walls of suspension-cultured rice cells.

Plant & Cell Physiol., 26 : 437-445.

KATZU N. and S. KAMISAKA, 1983.- Quantitative and qualitative 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.W., BAUER W.D. and P. ALBERSHEIM, 1973.- The structure of plant cell wall. III. A model of the walls of suspension-cultured sycamore cells based on the interconnections of the macromolecular components.

Plant Physiol., 51 : 188-196.

KELLY G.J., 1984.- Calcium, calmodulin, and the action of plant hormones.

T.I.B.S., 9 : 4-5.

KEON J.P.R., 1985.- Cytological damage and cell wall modification in cultured apple cells following exposure to pectin lyase from Monilinia fructigena.

Physiol. Plant Pathol., 26 : 11-29.

KING P.J. and H.E. STREET, 1973.- Growth pattern in cell cultures.

In : Plant Tissue and Cell Culture, H.E. STREET ed., Blackwell Sci. Pub.

KING P.J., 1976.- Studies on the growth in culture of plant cells. XX-Utilization of 2,4-D dichlorophenoxyacetic acid by steady state cell cultures of Acer pseudoplatanus.

J. Exp. Bot., 27 : 1053-1072.

KNEE M., FIELDING A.H., ARCHER S.A. and F. LABORDA, 1975.- Enzymic analysis of cell wall structure in apple fruit cortical tissue.

Phytochem., 14 : 2213-2222.

KOEHLER V. and J. KOEHLER, 1985.- Use of uronic acids and/or their derivatives.

Ger. Offen. DE, 3 : 338-689 (Cl.AO1N25/32) App 25 Oct. 1983, 9 pp.

KOHN R. and I.FURDA, 1967-a.- Calcium ion activity in solutions of calcium pectinate.

Coll. Czech. Chem. Comm., 32 : 1925-1937.

KOHN R. and I.FURDA, 1967-b.- Interaction of calcium and potassium ions with carboxyl groups of pectin.

Coll. Czech. Chem. Comm., 32 : 4470-4484.

KONNO H., YAMASAKI Y. and K. KATOH, 1983.- Exopolygalacturonase from suspension cultures of Marchantia polymorpha. Its presence and involvement in pectic polysaccharide degradation.

Plant Physiol., 73 : 216-222.

KONNO H., YAMAYA T., YAMASAKI Y. and H. MATSUMOTO, 1984.- Pectic polysaccharide breakdown of cell walls in cucumber roots grown with calcium starvation.

Plant Physiol., 76 : 633-637.

KOYAMA T., HAYASHI T, KATO Y. and K. MATSUDA, 1983.- Degradation of xyloglucan by wallbound enzymes from soybean tissue. II. Degradation of the fragment heptasaccharide from xyloglucan and the characteristic action pattern of the -D-xylosidase in the enzyme system.

Plant & Cell Physiol., 24 : 155-162.

KUTSCHERA U. and P.SCHOPFER, 1985.- Evidence for the acid -growth theory of fusicoocin action.

Planta, 163 : 494-499.

LABAVITCH J.M. and P.M. RAY, 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 wall.

In : Advances in Botanical Research, Acad. Press London, New York.

LAMPORT D.T.A., 1970.- Cell wall metabolism.

Ann. Rev. Plant Physiol., 21 : 235-270.

LAMPORT D.T.A., 1978.- Cell wall carbohydrates in relation to structure and function.

In: Frontiers of Plant Tissue Culture. T.A. THORPE ed. Proc. 4th Int. Cong. Plant Tissue and Cell Cult., Calgary, 235-244.

LANCE B., REID D.M. and T. A. THORPE, 1976. Endogenous gibberellins and growth of tobacco callus cultures.

Physiol. Plant., 36 : 287-292.

LANVERS M., 1982.- Fractionnement et étude structurale des polysaccharides des parois primaires des racines de féverole.

Thèse 3e cycle, Grenoble, 144 p.

LAU J.M., Mc NEIL M., DARVILL A.G. and P. ALBERSHEIM, 1983.- Structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan I.

Plant Physiol., 72 : S 60.

LEE S.C. and C.A. WEST, 1981-a.- Polygalacturonase from Rhizopus stolonifer, an elicitor of casbene synthetase activity in castor bean (Ricinus communis L.) seedlings.

Plant Physiol., 67 : 633-639.



LEE S.C. and C.A. WEST, 1981-b.- Properties of Rhizopus stolonifer polygalacturonase, an elicitor of casbene synthetase activity in castor bean (Ricinus communis L.) seedlings.

Plant Physiol., 67 : 640-645.

LEGRAND B. et J. DUBOIS, 1977.- Evolution des peroxydases et auxines-oxydases au cours de la croissance d'une suspension cellulaire de Silène (Silene alba (Miller) E. H. L. Kr.

C. R. Acad. Sc. Paris, 285 : 661-664.

LEGUAY J.J. and J. GUERN, 1975.- Quantitative effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on growth of suspension-cultured Acer pseudoplatanus cells.

Plant Physiol., 56 : 356-359.

LEOPOLD A.C., 1977.- Modification of growth regulatory action in the inorganic solutes.

In : Plant Growth Regulators : Chemical Activity, Plant Responses,

LEPPART G.G., 1974.- Rhizopant fibrils in wheat : demonstration and derivation.

Science, 185 : 1066-1067.

LESCURE A.M., 1966.- Etude quantitative de la croissance d'une culture d'Acer pseudoplatanus L.

Physiol. Vég., 4 : 367-378.

LIFSON S. and A. KATCHALSKY, 1954.- The electrostatic free energy of polyelectrolyte solutions.

J. Polymer Sci., 13 : 43-55.

LLOYD C.W., LOWE S.B. and G.W. PEACE, 1980.- The mode of action of 2,4-D in counteracting the elongation of Carrot cells grown in culture.

J. Cell Sci., 45 : 257-268.

MANTE S. and W.G. BOLL, 1975.- Comparison of growth and extracellular polysaccharide of cotyledon cell suspension cultures of bush bean (Phaseolus vulgaris cv Contender) grown in coconut milk and synthetic medium.

Can. J. Bot., 53 : 1542-1548.

MANTE S. and W.G. BOLL, 1976.- Changes in the amount and composition of fractions from extracellular polysaccharide during the culture cycle of cotyledon cell suspension culture of bush bean (Phaseolus vulgaris cv Contender).

Can. J. Bot., 54 : 198-201.

MANTE S. and W.G. BOLL, 1978.- Effect of either 2,4-dichlorophenoxyacetic acid or Kinetin on production and composition of various fractions from extracellular polysaccharides produced by cotyledon cell suspension cultures of bush bean (Phaseolus vulgaris cv. Contender).

Can. J. Bot., 56 : 1816-1822.

MARETZKI A., THOM M. and L.G. NICKELL, 1972.- Influence of osmotic potentials on the growth and chemical composition of sugarcane cell cultures.

Hawai Plant Rec., 58 : 183-199.

MARIE-ALSABEK F., 1985.- Contribution à l'étude des propriétés biologiques des polysaccharides pectiques acides excrétés par les suspensions cellulaires.

Thèse Doct. Ing., Lille, 127 p.

MARIE-ALSABEK F., MORVAN H., DUBOIS J. et R. BOURIQUET, 1984.- Effets des polymères pectiques acides libérés au cours de la culture de cellules végétales sur la croissance de suspensions cellulaires de *Silene*.

C. R. Acad. Sc. Paris, 298 : 301-304.

MARME D., 1984.- Role of  $Ca^{2+}$  and calmodulin in plants.

In : Calcium and all Function, W.Y. CHEUNG ed., Vol. IV, Acad. Press,

MARME D., 1982.- The role of  $Ca^{2+}$  and calmodulin in plants.

What's New Plant physiol., 13 : 37-40.

MARTIN S.M. and D. ROSE, 1976.- Growth of plant cell (Ipomea) suspension cultures at controlled pH levels.

Can. J. Bot., 54 : 1264-1270.

MARTIN S.M., ROSE D. and V. HUI, 1977.- Growth of plant cell suspension with ammonium as the sole source of nitrogen.

Can. J. Bot., 55 : 2838-2843.

MASUDA H., OZEKI Y., AMINO S.-I. and A. KOMAMINE, 1984.- Changes in cell wall polysaccharides during elongation in a 2,4-D free medium in a carrot suspension culture.

Physiol. Plant., 62 : 65-72.

MASUDA H. and SATOMURA, 1970.-

MATHIEU J. et R. PANICO, 1972.- Mécanismes réactionnels en chimie organique.

Hermann ed., Paris

MATULEWICZ C.M., PERCIVAL E.E. and H. WEIGEL, 1984.- Water soluble polysaccharides of antarctic and cultured Phormidium species of the cyanophyceae.

Phytochem., 23 : 103-105.

Mc CLEARLY B.V., AMADO R., WAIBEL R. and H. NEUKOM, 1981.- Effect of galactose content on the solution and interaction properties of guar and carob galactomannans.

Carbohydr. Res., 92 : 269-285.

Mc NEIL M., ALBERSHEIM P., TAIZ L. and R.L. JONES, 1975.- The structure of plant cell walls. VII. Barley aleurone cells.

Plant Physiol., 55 : 64-68.

Mc NEIL M., DARVILL A.G. and P. ALBERSHEIM, 1979.- The structural polymers of the primary cell walls of dicots.

In : Progress in the chemistry of organic natural products, W. HERZ ed.,

Mc NEIL M., DARVILL A.G. and P. ALBERSHEIM, 1980.- Structure of plant cell walls. X: Rhamnogalacturonan I, a structurally complex pectic polysaccharide in the walls of suspension-cultured sycamore cells.

Plant Physiol., 66 : 1128-1134.

Mc NEIL M., DARVILL A.G. and P. ALBERSHEIM, 1982.- Structure of plant cell walls. XII. Identification of seven differently linked glycosyl residues attached to O-4 of the 2,4-linked L-rhamnosyl residues of rhamnogalacturonan I.

Plant Physiol., 70 : 1586-1591.

Mc NEIL M., DARVILL A., FRY S. and P. ALBERSHEIM, 1984.- Structure and function of the primary cell wall of the plants.

Ann. Rev. Plant Biochem., 53 : 625-663.

MIKI N.K., CLARKE K.J. and E.M. Mc CULLY, 1980.- A histological and histochemical comparison of the mucilages on the root tips of several grasses.

Can. J. Bot., 58 : 2581-2593.

MISAWA M., 1980.- Industrial and government research.

In : Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals, E.J. STABA ed., C.R.C. Press, 167-190.

MOLLARD A. et D. ROBERT, 1984.- Etude de la lignine pariétale et extracellulaire des suspensions cellulaires de Rosa glauca.

Physiol. Vég., 22 : 3-17.

MONRO J.A., PENNY D. and R.W. BAILEY, 1976.- The organization of primary cell walls of lupin hypocotyl.

Phytochem., 15 : 1193-1198.

MONTREUIL J., SPIK G., FOURNET B. et M.T. TOLLIER, 1981.- Glucides.

In : Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries alimentaires,

MOORE T.S., 1973.- An extracellular macromolecular complex from the surface of Soybean suspension cultures.

Plant Physiol., 51 : 529-536.

MORI M. and K. KATO, 1981.- An arabinoglucuronomannan from suspension-cultured cells of Nicotiana tabacum.

Carbohydr. Res., 91 : 49-58.

MORRE D.J., JONES D.D. and H.H. MOLLENHAUER, 1967.- Golgi apparatus mediated polysaccharide secretion by outer root cap cells of Zea mays. I. Kinetics and secretory pathway.

Planta, 74 : 286-301.

MORRIS E.R., POWELL D.A., GIDLEY M.J. and D.A. REES, 1982.- Conformations and interactions of pectins. I: Polymorphism between gel and solid states of calcium polygalacturonate.

J. Mol. Biol., 155 : 507-516.

MORRIS M.R. and D.H. NORTHCOTE, 1977.- Influence of cations at the plasma membrane in controlling polysaccharide secretion from sycamore suspension cells.

Biochem. J., 166 : 603-618.

MORVAN C., 1983.- Etude de quelques propriétés physicochimiques de parois végétales. Influence de la structure de leurs polysaccharides acides.

Thèse Doct. Sci. Nat., Rouen, 167 p.

MORVAN C., MORVAN H., DEMARTY M. et M. THELLIER, 1983.- Réponses électriques des lentilles d'eau à différentes conditions expérimentales.

C. R. Soc. Biol., 177 : 679-688.

MORVAN C., DEMARTY M. et M. THELLIER, 1985.- Propriétés physicochimiques des parois de *Lemna minor*: échange entre les ions calcium et lithium. *Physiol. vég.*, 23 : 333-344.

MORVAN H., 1973.- Mesure du potentiel intracellulaire des suspensions cellulaires d'Erable (*Acer pseudoplatanus* L.).

Thèse 3ème cycle, Lille, 98 p.

MORVAN H., 1974.- Evolution du pH du milieu au cours de la culture des suspensions cellulaires d'érable (*Acer pseudoplatanus* L.). Essai d'interprétation par la méthode électrophysiologique.

C. R. Acad. Sci. Paris, 278 : 3207-3210.

MORVAN H., 1981.- Effets de composés polysaccharidiques acides isolés à partir d'excrétats cellulaires sur la croissance de cellules en suspension.

Poster, colloque I.A.P.T.C., Toulouse.

MORVAN H., 1982.- Libération de polymères pectiques acides au cours de la croissance de suspensions cellulaires de *Silene*.

*Physiol. Vég.*, 20 : 671-678.

MUIR W.H., HILDEBRANDT A.C. and A.J. RICKER, 1958.- The preparation, isolation and growth, in culture of single cells from higher plants.

*Amer. J. Bot.*, 45 : 589-597.

MURASHIGE T. and F. SKOOG, 1962.- A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.

*Physiol. Plant.*, 15 : 473-497.

NARI J., NOAT G., RICARD J., FRANCHINI E. and A.M. MOUSTACAS, 1983.- Catalytic properties and tentative function of a cell wall glucosyltransferase from soybean cells cultured in vitro.

*Plant Sci. Letters*, 28 : 313-320.

NELSON N.J., 1944.- A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose.

J. Biol. Chem., 153 : 375-380.

NEUMAN K.H. and F.C. STEWARD, 1968.- Investigations on the growth and metabolism of cultured explants of Daucus carota. I. Effect of iron, molybdenum and manganese on growth.

Planta, 81 : 333-350.

NEVINS D.J., ENGLISH P.D. and P. ALBERSHEIM, 1968.- Changes in cell wall polysaccharides associated with growth.

Plant Physiol., 43 : 914-922.

NICKELL L.G., 1956.- The continuous submerged cultivation of plant tissues as single cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 42 : 848-850.

NICKELL L.G., 1980.- Products.

In : Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals, E.J. STABA ed., C.R.C. Press, 235-270.

NISHITANI K. and Y. MASUDA, 1980.- Modifications of cell wall polysaccharides during auxin-induced growth in azuki bean epicotyl segments.

Plant & Cell Physiol., 21 : 169-181.

NISHITANI K. and Y. MASUDA, 1983.- Auxin-induced changes in the cell wall xyloglucans: Effects of auxin on the two different subfractions of xyloglucans in the epicotyl cell wall of Vigna angularis.

Plant & Cell Physiol., 24 : 345-355.

NORTHCOTE D.H., 1963.- The biology, and chemistry of the cell walls of higher plants, Algae and Fungi.

Int. Rev. Cyt., 14 : 223-265.

NORTHCOTE D.H., 1972.- Chemistry of plant cell wall.

Ann. Rev. Plant Physiol., 23 : 113-132.

NOTHNAGEL E.A., Mc NEIL M., ALBERSHEIM P. and A. DELL, 1983.- Host-pathogen interactions. XXII. A galacturonic acid oligosaccharide from plant cell walls elicits phytoalexins.

Plant Physiol., 71 : 916-926.

NOUGAREDE A., GUERN J. et C. GRIGNON, 1968-a.- Premières observations sur l'infrastructure des suspensions cellulaires provenant de tissus de cambium d'Acer pseudoplatanus L.

C. R. Acad. Sc. Paris, 266 : 207-210.

NOUGAREDE A., GUERN J. et C. GRIGNON, 1968-b.- Quelques particularités concernant l'édification des cloisons nouvelles dans les suspensions cellulaires obtenues à partir des cals du cambium d'Acer pseudoplatanus L.

C. R. Acad. Sc. Paris., 266 : 337-340.

OHIRA K., OJIMA K. and A. FUJIWARA, 1973.- Studies on the nutrition of rice cell culture. I. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture.

Plant & Cell Physiol., 14 : 1113-1121.

OHIRA K., OJIMA K., SAIGUSA M. and A. FUJIWARA, 1975.- Studies on the nutrition of rice cell culture. II. Microelement requirement and the effects of deficiency.

Plant & Cell Physiol., 16 : 73-81.

OLSON A.C., EVANS J.J., FREDERICK D.P. and E.F. JANSEN, 1969.- Plant suspension culture media macromolecules-pectic substances, protein and peroxydase.

Plant Physiol., 44 : 1594-1600.

OLSON A.C., 1971.- Secreted polysaccharides and proteins from Nicotiana tabacum suspension cultures.

Coll. Int. CNRS, Les cultures de tissus de plantes, 193 : 411-413.

PARISH R.W., 1975.- The lysosome-concept in plants. I. Peroxidases associated with subcellular and wall fractions of maize root tips : implications for vacuole development.

Planta, 123 : 1-13.

PARISH R.W., 1975.- The lysosome-concept in plants. II. Location of acid hydrolases in maize root tips.

Planta, 123 : 15-31.

PENNARUM A.M., 1980.- Mécanisme de la distribution endocellulaire des ions sodium dans les cellules libres d'Acer pseudoplatanus.

Thèse Doct. Sci. Nat., Paris, 334 p.

PETIARD V., 1979.- Production de métabolites par les cellules végétales cultivées "in vitro" : exemple de filière méthodologique.

In : Production de substances naturelles par culture "in vitro" de tissus et de cellules de végétaux, Journées d'études D.G.R.S.T., Apria, 5-44.

PILNIK W., 1981.- Pectic substances.

Proc. Eur. Symp. Fib. Hum. Nat., 91-125.

POPE D.G. and D.T.A. LAMPORT, 1974.- Hydroxyproline-rich material secreted by cultured Acer pseudoplatanus cells : evidence for polysaccharide attached directly to hydroxyproline.

Plant Physiol., 53 : 5-81.

POPE D.G., 1977.- Relationships between hydroxyproline-containing proteins secreted into the cell wall and medium by suspension-cultured Acer pseudoplatanus cells.

Plant Physiol., 59 : 894-900.

POWELL D.A., MORRIS E.R., GIDLEY M.J. and D.A. REES, 1982.- Conformations and interactions of pectines. II : Influence of residue sequence on chain association in calcium pectate gels.

J. Mol. Biol., 155 : 517-531.

PRAT R., 1973.- Contribution à l'étude des protoplastes végétaux. II. Ultrastructure du protoplaste isolé et régénération de sa paroi.

J. Microsc., 18 : 65-86.

PRAT R., GUEISSAZ M.B. and GOLDBERG R., 1984.- Effects of  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  on elongation and  $H^+$  secretion of Vigna radiata hypocotyl sections.

Plant & Cell Physiol., 25 : 1459-1467.

PRESTON R.D., 1974.- The physical biology of plant cell walls.

Chapman & Hall, London, 491 p.

PRESTON R.D., 1979.- Polysaccharide conformation and cell wall function.

Ann. Rev. Plant Physiol., 30 : 55-78.

RAJ B. and J.M. HERR, 1971.- Isolation of protoplasts from the placenta cells of Lycopersicon pimpinellifolium mill.

Exp. Cell Res., 64: 479-480.

RAVANAT G., 1979.- Propriétés en solution des acides pectiques et de quelques oligomères. Interactions avec les ions calcium.

Thèse 3e cycle, Grenoble, 82 p.



RAVANAT G. et RINAUDO, 1980.-

RAYLE D.L. and R. CLELAND, 1970.- Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions.

Plant Physiol., 46: 250-253.

RAYLE D.L. and R. CLELAND, 1972.- The in-vitro acid-growth response: relation to in-vivo growth responses and auxin action.

Planta, 104: 282-296.

REES D.A., 1977.- Polysaccharide shapes.

Chapman & Hall, London.

REIS D., 1976.- Evolution qualitative et quantitative des polysaccharides des parois pendant la croissance des cellules de l'hypocotyle du Phaseolus aureus Roxb.

Bull. Soc. Bot. Fr., Coll. Secrét. Végét., 123: 47-72.

REYNOLDS E.S., 1963.- The use of lead citrat at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy.

J. Cell. Biol., 17: 208-212.

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.

ROELOFSON P.A., 1965.- Ultrastructure of the wall in growing cells and its relation to the direction of the growth.

Adv. Bot. Res., 2: 69-149.

ROLAND J.C., VIAN B. and D. REIS, 1977.- Further observations on cell wall morphogenesis and polysaccharide arrangement during plant growth.

Protoplasma, 91: 125-141.

ROLAND J.C. and B. VIAN, 1979.- The wall of the growing plant cell: its three-dimensional organization.

Int. Rev. Cyt., 61: 129-166.

ROLAND J.C., 1981.- Où en est la caractérisation microscopique des polysaccharides végétaux ?

Bull. Soc. Bot. Fr., 128: 61-63.

RONA J.P., 1982.- Etude des caractéristiques électriques des cellules libres d'Acer pseudoplatanus.

Thèse Doct. Sci. Nat., Paris, 233 p.

ROSE D. and S.M. MARTIN, 1974.- Parameters for growth measurement in suspension cultures of plant cells.

Can. J. Bot., 52: 903-912.

ROUGIER M., 1981.- Secretary activity of the root cap.

In : Plant carbohydrates II., W. TANNER & F.A. LOEWUS eds., Encycl. Plant Physiol., vol. 13 B, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 542-574.

RUBERY P.H. and D.H. NORTHCOTE, 1970.- The effect of auxin (2,4-D) on the synthesis of cell wall polysaccharide in cultured sycamore cells .

Biochem. Biophys. Acta., 222: 95-108.

RYAN C.A., 1978.- Proteinase inhibitors in plant leaves : a biochemical model for pest-induced natural plant protection.

Trends Biochem. Sci., 7: 148-150.

RYAN C.A., BISHOP P.D., PEARCE G., DARVILL A.G., Mc NEIL M. and P. ALBERSHEIM, 1981.- A sycamore cell wall polysaccharide and a chemically related tomato leaf oligosaccharide possess similar proteinase inhibitor inducing activities.

Plant Physiol., 68: 616-618.

SAKURAI N., NEVINS D.J. and Y. MASUDA, 1977.- Auxin-and hydrogen ion-induced cell wall loosening and cell extension in Avena coleoptile segments.

Plant & Cell Physiol., 18: 371-380.

SASAKI T. and K. KAINUMA, 1984.- Control of starch and exocellular polysaccharides biosynthesis by gibberelic acid with cells of sweet potato cultured in vitro.

Plant Cell Reports., 3: 23-26.

SCHENK R.U. and A.C HILDEBRANDT, 1972.- Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures.

Can. J. Bot., 50: 199-204.

SCOTT J.E., 1965.- Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts.

In : *Methods of Carbohydrate Chemistry*, vol. 5, R.L. WHISTLER ed., Acad. Press, New York, 38-44.

SCOTT R.W., 1979.- Colorimetric determination of hexuronic acids in plant materials.

*Anal. Chem.*, 51: 936-941.

SELVENDRAN R.R., 1983.- The chemistry of plant cell walls.

In : *Dietary Fibre*, G.G. BIRCH and K.J. PARKER eds, Applied Science

SELVENDRAN R.R., 1985.- Developments in the chemistry and biochemistry of pectic and hemicellulosic polymers.

*J. Cell Sci. Suppl.*, 2: 51-88.

SENTENAC H. and C. GRIGNON, 1981.- A model for predicting ionic equilibrium concentration in cell wall.

*Plant Physiol.*, 68: 415-419.

SHARP J.K., VALENT B. and P. ALBENICHEIM, 1983.- Purification and partial characterization of a  $\alpha$ -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean.

*J. Biol. Chem.* .

SHIBUYA N. and T. IWASAKI, 1978.- Polysaccharides and glycoproteins in the rice endosperm cell wall.

*Agric. Biol. Chem.*, 42: 2259-2266.

SHIBUYA N. and A. MISAKI, 1978.- Structure of hemicellulose isolated from rice endosperm cell wall : mode of linkages and sequences in xyloglucan and arabinoxylan.

*Agric. Biol. Chem.*, 42: 2267-2274.

SIDDIQUI I.R. and P.J. WOOD, 1976.- Structural investigation of oxalate soluble rapeseed (*Brassica campestris*). IV : Pectic polysaccharides.

*Carbohydr. Res.*, 50: 97-107.

SIDORENKO P.G., 1970.- Electron microscopic characteristics of plant cells in culture "in vitro".

In : *Microscopie électronique*, Favard ed., 7ème Cong. Int. Micro. Elect., Grenoble, 3 : 415-416.

SIMPKINS I. and H.E. STREET, 1970.- Studies on the growth in culture of plant cells. VII : Effects of Kinetin on the carbohydrate and nitrogen metabolism of Acer pseudoplatanus L. cells grown in suspension culture. *J. Exp. Bot.*, 21: 170-185.

SMITH J.J., MULDOON E.P. and D.T.A. LAMPORT, 1984.- Isolation of extensin precursors by direct elution of intact tomato cell suspension cultures. *Phytochem.*, 23: 1233-1239.

SOUTY M., THIBAUT J.F., NAVARRO-GARCIA G., LOPEZ-ROCA J.M. and L. BREUILS, 1981.- Les substances pectiques de l'abricot (Prunus armeniaca L.) var. rouge du Roussillon. Caractéristiques globales et étude par chromatographie d'échange d'ions. *Sciences des Aliments*, 1: 67-80.

SPELLMAN M.W., Mc NEIL M., DARVILL A.G., ALBERSHEIM P. and A. DELL, 1983.- Characterization of a structurally complex heptasaccharide isolated from the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. *Carbohydr. Res.*, 122: 131-153.

SPURR A.R., 1969.- A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruc. Res.*, 26: 31-43.

STABA E.J., 1980.- Secondary metabolism and biotransformation. In : *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals*, E.J. STABA ed., C.R.C. Press, 59-98.

STEVENS B.J.H. and R.R. SELVENDRAN, 1980.- Structural investigation of an arabinan from cabbage (Brassica oleracea Var. Capitata). *Phytochem.*, 19: 559-561.

STEVENSON T.T., Mc NEIL M., DARVILL A.G. and P. ALBERSHEIM, 1986.- Structure of plant cell walls. XVIII. An analysis of the extracellular polysaccharides of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiol.*, 80: 1012-1019.

STEWART F.C., MAPES M.O. and J. SMITH, 1958.- Growth and organised development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. *Amer. J. Bot.*, 45: 693-703.

STODDART R.W. and D.H. NORTHCOTE, 1967.- Metabolic relationships of the isolated fractions of the pectin substances of actively growing sycamore cells.

Biochem. J., 105: 45-49.

STREET H.E., 1966.- The nutrition and metabolism of plant tissue and organ cultures.

In : Cells and Tissues in Culture, E.N. WILLMER ed., vol. 3, Acad. Press, New York, 533-629.

STREET H.E., KING P.J. and K.J. MANSFIELD, 1970.- Growth control in plant cell suspension cultures.

In : Colloques Internationaux du C.N.R.S., 15-40.

STUART R. and H.E. STREET, 1969.- Studies on the growth in culture of plant cells. IV: The initiation of division in suspensions of stationary-phase cells of Acer pseudoplatanus L.

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

STUART R. and H.E. STREET, 1971.- Studies on the growth in culture of plant cells. X : Further studies on the conditioning of culture media by suspensions of Acer pseudoplatanus L.

J. Exp. Bot., 22: 96-106.

TAIZ L. and W.A. HONIGMAN, 1976.- Production of cell wall hydrolyzing enzymes by barley aleurone layers in response to gibberellic acid.

Plant Physiol., 58: 380-386.

TAIZ L., 1984.- Plant cell expansion:regulation of cell wall mechanical properties.

Ann. Rev. Plant Physiol., 35: 585-657.

TAKAKI M. and S.M.C. DIETRICH, 1980.- Effect of GA-3 and light on polysaccharide levels and metabolism in germinating coffee seeds.

J. Exp. Bot., 31: 1643-1649.

TAKEUCHI Y. and A. KOMAMINE, 1978.- Changes in the composition of cell wall polysaccharides of suspension-cultured Vinca rosea cells during culture.

Physiol. Plant., 42: 21-28.

TAKEUCHI Y. and A. KOMAMINE, 1980-a.- Turnover of cell wall polysaccharides of a Vinca rosea suspension culture. I. Synthesis and degradation of cell wall components.

Physiol. Plant., 48: 271-277.

TAKEUCHI Y. and A. KOMAMINE, 1980-b.- Turnover of cell wall polysaccharides of a Vinca rosea suspension culture. III : Turnover of arabinogalactan.

Physiol. Plant., 50: 113-118.

TALMADGE K.W., KEEGSTRA K., BAUER W.D. and P. ALBERSHEIM, 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.

TAYLOR R.L. and H.E. CONRAD, 1972.- Stoichiometric depolymerization of polysaccharides and glycoaminoglycuronanes to monosaccharides following reduction of their carbodiimide activated carboxyl groups.

Biochemistry, 11: 1383-1388.

TEPFER M. and I.E.P. TAYLOR, 1981.- The interaction of divalent cations with pectic substances and their influence on acid-induced cell wall loosening.

Can. J. Bot., 59: 1522-1525.

TERRY M.E. and R.L. JONES, 1981.- Effect of salt on auxin-induced acidification and growth by pea internode sections.

Plant Physiol., 68: 59-64.

TERRY M.E., JONES R.L. and B.A. BONNER, 1981.- Soluble cell wall polysaccharides released from pea stems by centrifugation. I : Effect of auxin.

Plant Physiol., 68: 531-537.

THIBAUT J.F., 1983.- Studies on pectic substances of cherry fruits by enzymatic degradation and -elimination.

Phytochem., 22: 1567-1571.

THIERY J.P., 1967.- Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique.

J. Microsc., 6: 987-1018.

THOIRON B., 1984.- Restauration d'activités de perméation après le "choc de dégazage" chez les suspensions cellulaires d'Acer pseudoplatanus L.  
Thèse Doct. Sci. Nat., Rouen, 118 p.

THOMAS R.J., BEHRINGER F.H., LOMBARD C.S. and J.J. SPARKOWSKI, 1984.- Effects of auxin on wall polysaccharide composition and enzyme activity during extension-growth of Pellia (Bryophyta).  
Physiol. Plant., 60: 502-506.

TILLMANS J. and K. PHILIPPI, 1929.- The carbohydrate content of the important proteins of foodstuff and a colorimetric procedure on the determination of nitrogen free sugar in protein.  
Biochemistry, 215: 36-40.

TIMMEL T.E., 1961.- Isolation of galactoglucomannans from the wood of gymnosperms.  
T.A.P.P.I., 44: 88-96.

TORREY J.G. and J. REINERT, 1961.- Suspension cultures of higher plant cells in synthetic media.  
Plant Physiol., 36: 483-491.

TRAN THANH VAN K., TOUBART P., COUSSON A., DARVILL A.G., GOLLIN D.J., CHELF P. and P. ALBERSHEIM, 1985.- Manipulation of the morphogenetic pathways of tobacco explants by oligosaccharins.  
Nature, 314: 615-617.

UEKI K., 1982.- Effects of divalent cations on phosphatase secretion in cultured tobacco cells.  
Phytochem., 21: 547-550.

UEKI K. and K. KATO, 1971.- Effect of inorganic phosphate on the extracellular acid phosphatase activity of tobacco cells cultured "in vitro".  
Physiol. Plant., 24: 506-511.

VELIKY I.A. and D. ROSE, 1973.- Nitrate and ammonium as nitrogen nutrients for plant cell cultures.  
Can. J. Bot., 51: 1837-1844.

VERMA D.C. and D.K. DOUGALL, 1979.- Biosynthesis of myo-inositol and its role as a precursor of cell-wall polysaccharides in suspension cultures of wild-carrot cells.  
Planta, 146: 55-62.

VIAN B. and J.C. ROLAND, 1974.- Cytochemical and ultrastructural observations on polysaccharides during secretion and exocytosis. *Portugaliae acta biologica*, XIV: 475-482.

WALKER-SIMMONS M., HADWIGER and A. RYAN, 1983.- Chitosans and pectic polysaccharides both induce the accumulation of the antifungal phytoalexin pisatin in pea pods and antinutrient proteinase inhibitors in tomato leaves.

*Biophys. Res. Comm.*, 110: 194-199.

WALLNER S.J. and P.J. NEVINS, 1973.- Formation and dissociation of cell aggregates in suspension cultures of Paul's scarlet rose.

*Amer. J. Bot.*, 60: 255-261.

WALLNER S.J. and P.J. NEVINS, 1974.- Changes in cell wall associated with cell separation in suspension of Paul's scarlet rose.

*J. Exp. Bot.*, 25: 1020-1029.

WHISTLER R.L. and E.L. RICHARDS, 1970.- Hemicelluloses.

In : *The carbohydrates II A*, W. PIGMAN & D. MORTON eds., Acad. Press, New York, 37 : 452-469.

WILDER M.M. and P. ALBERSHEIM, 1973.- The structure of the plant cell wall. VII - A structural comparison of the cell wall hemicellulose of cell suspension cultured of sycamore and of red kidney bean.

*Plant Physiol.*, 51: 889-893.

WILKIE K.C.B., 1979.- The hemicelluloses of grasses and cereals.

*Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 36: 215-264.

WILSON K., 1964.- The growth of plant cell wall.

*Int. Rev. Cyt.*, 17: 1-49.

WITHERS L. A., 1976.- Studies on the growth in culture of plant cells. XXI: Fine structural features of *Acer pseudoplatanus* L. cells responding to 2,4-dichlorophenoxyacetic with drawal in turbidostat culture.

*J. Exp. Bot.*, 27: 1073-1084.

WRIGHT K. and D.H. NORTHCOTE, 1975.- An acidic oligosaccharide from maize slime.

*Phytochem.*, 14: 1793-1798.



WRIGHT K. and D.H. NORTHCOTE, 1974.- The relationship of root-cap slime to pectins.

Biochem. J., 139: 525-534.

WUYTACK R. et C. GILLET, 1978.- Nature des liaisons de l'ion calcium dans la paroi de *Nitella flexilis*.

Can. J. Bot., 56: 1439-1443.

YAMAOKA T. and S. SATO, 1977.- Analysis of extracellular macromolecules of cultured tobacco cells in comparison with cell-wall macromolecules.

Bot. Mag., 90: 153-163.

YAMAYA T., TANIGAWA M., KONNO H. and H. MATSUMOTO, 1982.- Increase in cell wall-associated phosphatase activity in cucumber roots during calcium starvation: Binding nature and properties of the phosphatase and cell wall analysis.

Plant & Cell Physiol., 23: 1175-1184.

YAMAZAKI N., FRY S.C., DARVILL A.G. and P. ALBERSHEIM, 1983.- Host-pathogen Interactions. XXIV. Fragments isolated from suspension-cultured sycamore cell walls inhibit the ability of the cells to incorporate (<sup>14</sup>C)leucine into proteins.

Plant Physiol., 72: 864-869.

YORK W.S., DARVILL A.G. and P. ALBERSHEIM, 1984-a.- Inhibition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-stimulated elongation of pea stem segments by a xyloglucan oligosaccharide.

Plant. Physiol., 75: 295-297.

YORK W.S., McNEIL M., DARVILL A.G. and P. ALBERSHEIM, 1984-b.- KDO (3-deoxy-manno-octulosonic acid), a glycosyl residue thought to occur only in enterobacterial polysaccharides, is also a component of the cell wall of higher plants.

Proc. 7th Ann. Symp. Bot., 498-500.

FICHE TECHNIQUE N° 1

EVALUATION DE LA CROISSANCE

1) Mesure du volume cellulaire total (V.C.T.)

- Agiter chaque flacon de culture puis verser son contenu dans une éprouvette.
- Laisser décanter 30 min très exactement et noter le volume des cellules sédimentées.

2) Mesure de la masse fraîche (M.F.)

- Verser le contenu de chaque flacon de culture dans un entonnoir de Büchner garni d'un papier filtre et laisser la filtration se dérouler sous vide, jusqu'à écoulement total du milieu.
- Recueillir les cellules à la spatule et les peser immédiatement (précision  $10^{-3}$  g)

3) Mesure de la masse sèche (M.S.)

- Prélever environ 2 g (M.F.) de cellules et les transférer dans un pilulier préalablement pesé (précision  $10^{-5}$  g).
- Peser le pilulier contenant les cellules (précision  $10^{-5}$  g) et exprimer la M.F. de cellules utilisées.
- Congeler rapidement les cellules par immersion dans l'azote liquide puis recouvrir d'un carré de gaze en coton maintenu par un bracelet en caoutchouc.
- Placer les piluliers dans la cuve du lyophilisateur et laisser sous vide pendant 48 h.
- A la sortie du lyophilisateur, placer les échantillons dans un dessiccateur et les peser le plus rapidement possible (précision  $10^{-5}$  g). Exprimer la M.S. des cellules par différence avec la masse du pilulier vide. Le rapport entre la M.S. et la M.F. de cellules utilisées sert ensuite à calculer la M.S. des cellules contenues dans chaque flacon.

**4) Dénombrement des cellules (N.C.)**

- Peser (précision  $10^{-5}$  g) une demi-spatule de cellules et les placer dans 5 ml de la solution d'acide chromique 10 %, à 4°C pendant 24 h.
- Aspirer plusieurs fois la suspension à travers l'aiguille hypodermique montée sur la seringue de manière à dissocier parfaitement les cellules.
- Déposer une aliquote de la suspension dissociée dans la cellule de Nageotte et effectuer le dénombrement des cellules par unité de volume. Recommencer 3 fois l'opération. Le nombre moyen de cellules est exprimé par ml de milieu de culture.

**Références :**

MORVAN H., 1982.- *Physiol. Vég.*, 20 : 671-678.

MARIE-ALSABEK F. et al., 1984.- *C. R. Acad. Sci. Paris*, 298 : 301-304.

## FICHE TECHNIQUE N° 2

### CYTOCHIMIE

#### 1) Fixation des échantillons

- Placer environ 100 mg de cellules dans un mélange (1/1) de glutaraldéhyde 3 % et de tampon cacodylate 0,2 M, pH 7,2 pendant 2 h à 20°C.
- Rincer 2 fois 15 min, laisser séjourner pendant 1 nuit puis rincer 3 fois 5 min dans le tampon cacodylate.
- Post-fixer les échantillons dans OsO<sub>4</sub> 1 % pendant 1 h à 0°C.
- Rincer 2 fois 10 min dans le tampon cacodylate puis 3 fois 10 min dans l'eau bidistillée.

#### 2) Deshydratation des échantillons

Toutes les opérations sont effectuées sur un lit de glace.

- Transférer les échantillons dans des solutions d'acétone à 10, 30, 50, 70 et 90 % en les laissant séjourner 10 min dans chacun des bains.
- Traiter les échantillons 3 fois par de l'acétone pure.

#### 3) Inclusion et polymérisation

La résine de SPURR est composée du mélange suivant : ERL (10 g) + DER (6 g) + NSA (26 g) + S<sub>1</sub> (0,8 g).

- Placer les échantillons dans le premier bain composé de 50 % de résine et 50 % d'acétone, pendant 4 h à 0°C, dans un deuxième bain de résine pure pendant 4 h à 0°C puis dans un troisième bain de résine pure pendant 1 nuit à 0°C.
- Inclure les échantillons en gélules et laisser polymériser pendant 24 h à 60°C.

#### 4) Coloration des échantillons sur grilles

(Acétate d'uranyle - citrate de plomb)

- Préparer la solution d'acétate d'uranyle par dissolution à saturation d'une pointe de scalpel d'acétate d'uranyle dans l'éthanol à 50°. Agiter vigoureusement, laisser reposer puis centrifuger.

- Faire flotter les grilles sur un film de solution d'acétate d'uranyle, dans des boites de pétri, à l'obscurité pendant 15 min.
- Rincer abondamment à l'eau bidistillée et recueillir les grilles sur un papier filtre.
- La solution de citrate de plomb se conservant mal, il convient de la préparer immédiatement avant l'emploi. mélanger 15 ml de solution de citrate de Na 0,4 M et 15 ml d'une solution de nitrate de plomb 0,25 M, agiter vivement, laisser reposer 30 min puis ajouter 8 ml de NaOH 1 N et compléter à 50 ml avec de l'eau distillée.
- Diluer la solution au 1/5 avec NaOH 0,01 N puis centrifuger.
- Faire flotter les grilles sur quelques gouttes de la solution de citrate de plomb, pendant 5 min.

#### 5) Coloration des échantillons

(acide périodique - thiocarbohydrazide - protéinate d'argent)

- Placer les échantillons dans une solution d'acide périodique à 1 % dans l'acétone à 50 % pendant 30 min. Laver plusieurs fois 30 min à l'eau bidistillée.
- Transférer les échantillons dans une solution de thiocarbohydrazide à 0,2 % dans l'acide acétique à 20 % pendant 4 h minimum (ou une nuit). Laver 3 fois rapidement puis 2 fois 10 min dans l'acide acétique à 10 %. Laver plusieurs fois en diminuant progressivement la concentration de l'acide acétique puis rincer 3 fois 10 min à l'eau bidistillée.
- Placer les échantillons dans une solution aqueuse de protéinate d'argent à 1 %, pendant 30 min à l'obscurité. Laver 3 fois rapidement puis 3 fois 10 min dans l'eau bidistillée.

#### Références :

- REYNOLDS E.S., 1963.- J. Cell Biol., 17 : 208-212.  
SPURR A.R., 1969.- J. Ultrastr. Res., 26 : 31-42.  
THIERY J.P., 1967.- J. Microsc., 6 : 987-1018.

## FICHE TECHNIQUE N° 3

### PREPARATION DES PAROIS

#### 1) Isolement des parois

Lorsque les cellules ont été préalablement lyophilisées, elles sont réhydratées pendant 2 fois 30 min dans l'eau bidistillée.

##### A - 1ère méthode (adaptée de MORVAN, 1983)

- Placer les cellules pendant 30 min dans une solution de saccharose 1 M.
- Broyer 3 fois 1 min au Virtis dans un bol reposant sur un lit de glace puis affiner le broyage manuellement au potter.
- Filtrer, rincer à l'eau bidistillée puis placer dans une solution de Triton X 100 à 1 %, pendant 2 h.
- Laver abondamment à l'eau bidistillée (l'addition de méthanol évite la formation de mousse).
- Rincer dans un mélange de chloroforme et de méthanol (2/1, v/v) puis soumettre à une sonication pendant 3 fois 1 min.
- Laver abondamment à l'eau bidistillée puis rincer à l'acétone.
- Sécher pendant 2 h à l'étuve (50°C).

##### B - 2ème méthode (adaptée de CATHALA et al., 1978)

Une macération de longue durée dans un détergent permet de décaper complètement les membranes et évite les rinçages par des solvants organiques.

- Plasmolyser les cellules dans une solution de mannitol 1 M, pendant 1 h.
- Broyer 3 fois 5 min au Virtis, filtrer et rincer abondamment à l'eau bidistillée.
- Placer les parois dans une solution de Triton X 100 à 1 %, pendant 3 fois 48 h, en agitation permanente. Entre chaque opération, les parois sont rincées à l'eau bidistillée, reprises dans du mannitol 1 M et soumises à un nouveau broyage au Virtis.
- Rincer finalement à l'eau bidistillée, congeler puis lyophiliser.

## 2) Extraction des pectines

- Extraire les parois isolées dans l'eau bidistillée bouillante pendant 3 fois 2 h. Filtrer et mélanger les filtrats puis ultrafiltrer sur membrane millipore 1000. Le contenu polysaccharidique du rétentat constitue les pectines I.
- Recommencer l'opération avec une solution bouillante d'E.D.T.A. ou d'oxalate d'ammonium à 0,5 %, pendant 3 fois 2 h. Après l'ultrafiltration, le contenu des rétentats correspond aux pectines II.

### Références :

- CATHALA N. et al., 1978.- C. R. Acad. Sci. Paris, 286 : 1025-1027.  
MORVAN C., 1983.- Thèse Doct. Sci. Nat., Rouen, 167 p.

FICHE TECHNIQUE N° 4

MESURE DES C.E.C.

1) Prétraitement des parois - état de référence

- Placer les parois dans HCl 0,03 N pH 1,5 pendant 2 fois 30 min.

2) Echanges cationiques

- Mettre les parois à équilibrer dans une solution de CaCl<sub>2</sub> 100 mM et renouveler la solution jusqu'à la stabilisation du pH entre 5,5 et 7.
- Eliminer le film de diffusion sur papier filtre.
- Peser les parois pour déterminer leur M.F.
- Traiter les parois dans HCl 0,03 N pH 1,5 pendant 30 min pour déplacer les cations en équilibre avec les acides uroniques.
- Sécher les parois à l'étuve à 50°C pendant 2 h et les peser pour déterminer leur M.S.
- Doser les cations libérés dans la solution d'HCl par spectrophotométrie (émission ou absorption atomique)

3) Expression des résultats

La C.E.C. est exprimée en milliéquivalent-grammes de calcium par g de paroi sèche.

Le taux de gonflement des parois est calculé par la relation :

$$= (M.F. - M.S.) / M.S.$$

Références :

MORVAN C. et al., 1985.- *Physiol. Vég.*, 23 : 333-344.



## FICHE TECHNIQUE N° 5

### DOSAGES IONIQUES

#### 1) Photométrie de flamme (Photomètre ELECTROSYNTHESE, $\text{PHF}_{80}$ )

Selon le cation et la gamme de concentration dans laquelle il se trouve dans l'échantillon, la méthode utilisée est différente de manière à résoudre les 2 difficultés principales, la sensibilité des détecteurs et les risques d'interférences.

##### A - Cas du potassium :

Dans le milieu de culture, le potassium est le cation principal et sa concentration est toujours supérieure d'au moins 10 fois à celle des autres cations. Il n'y a donc aucun risque d'interférence. Selon la sensibilité des appareils utilisés, une dilution est nécessaire ou non. Cependant, le principe de la mesure reste le même.

- Réaliser la gamme d'étalonnage adéquate ( entre 10 et 100 mM, si le milieu n'est pas dilué et entre 0,1 et 1 mM s'il est dilué au 1/100).
- Mesurer l'émission à travers le filtre interférentiel prévu pour le  $\text{K}^+$ , après avoir réglé le 0 sur un blanc ( $\text{H}_2\text{O}$ ) et la pleine échelle sur la concentration étalon la plus élevée. Construire la courbe de référence.
- Effectuer les mêmes mesures avec chacun des échantillons puis déduire les concentrations par rapport à la gamme de référence.
- Vérifier que l'émission des solutions les plus concentrées en  $\text{CaCl}_2$  et en  $\text{NaCl}$  est négligeable (inférieure à 1 %).

##### B - Cas du sodium :

Cet élément est difficile à doser car sa concentration est toujours faible (0,54 mM dans le milieu de culture neuf). De plus, l'interférence provoquée par le potassium est réelle, elle doit être mesurée et soustraite.

- Pratiquer comme dans le cas précédent, en changeant de filtre interférentiel.
- Pour déduire la part du potassium, préparer un échantillon de  $\text{KCl}$  de concentration identique à celle (mesurée précédemment) de l'échantillon à corriger, mesurer son émission puis la retrancher.

C - Cas du calcium :

Le calcium est difficile à doser par photométrie de flamme en raison des interférences. La méthode de soustraction utilisée pour le sodium permet de réduire la part des autres cations. Toutefois, les résultats sont systématiquement contrôlés par des mesures en absorption atomique.

- Pratiquer comme dans le cas du potassium, en changeant de filtre interférentiel.

2) Absorption atomique (Photomètre PERKIN-ELMER 107)

Il existe également des limites à l'utilisation de l'absorption atomique : les gammes de sensibilité de l'appareil sont précises et réduites, il existe des interférences entre ions divalents et la présence des ions  $\text{PO}_4^{3-}$  est également gênante. L'addition de  $\text{LaCl}_3$  permet de résoudre ces difficultés.

A - Cas du calcium :

La gamme de linéarité s'étend jusqu'à 0,2 mM. Des dilutions au 1/10 ème sont donc nécessaires pour les mesures à effectuer dans le milieu de culture. L'addition de  $\text{LaCl}_3$  ne peut se faire qu'à faible concentration (0,2 %) car au delà les  $\text{PO}_4^{3-}$  précipitent.

- Préparer la gamme étalon de  $\text{CaCl}_2$  (0,01 à 0,2 mM) en présence des 0,2 % de  $\text{LaCl}_3$  communs à tous les échantillons.

- Préparer la dilution des échantillons à mesurer de la même manière.

- Effectuer la lecture à 422,7 nm.

B - Cas du magnésium :

La sensibilité de l'appareil étant plus élevée, la gamme de linéarité ne dépasse pas 0,02 mM de telle sorte que des dilutions comprises entre 1/50 et 1/100 ème sont nécessaires pour effectuer les mesures dans le milieu de culture. Du  $\text{LaCl}_3$  est également ajouté dans tous les échantillons.

- Préparer la gamme étalon et les échantillons comme pour le calcium.

- Effectuer la lecture à 285,2 nm.

Références :

FEGHALI R., 1985.- DEA, Lille, 48 p.

FICHE TECHNIQUE N° 6

PREPARATION DES P.P.A.

- Séparer les cellules du milieu de culture par filtration.
- Prélever 20 ml de milieu et y ajouter 20 ml de C.T.A.B à 3 % porté préalablement à 40°C et maintenir le mélange à 40°C, au bain marie, pendant 30 min.
- Placer le mélange à 4°C pendant une nuit.
- Réchauffer au bain marie à 40°C puis centrifuger à 2000 g pendant 1 h.
- Redissoudre complètement le culot dans 5 ml de NaCl 0,2 M puis reprécipiter les polymères par 30 ml d'éthanol absolu.
- Laisser une nuit à 4°C.
- Centrifuger à 2000 g pendant 1 h et éliminer l'éthanol. Le culot peut être repris dans quelques ml d'éthanol absolu et être conservé ainsi à -18°C. Il peut être également dissous dans 10 ml d'eau distillée, la solution servant alors aux différents dosages.

Une modification a été proposée (voir figure III-2) pour préparer des P.P.A. en quantité suffisante pour effectuer les essais biologiques.

Références :

MORVAN H., 1982.- *Physiol. Vég.*, 20 : 671-678.

MARIE-ALSABEK F. et al., 1984.- *C. R. Acad. Sci. Paris*, 298 : 301-304.

FICHE TECHNIQUE N° 7

HYDROLYSES DES POLYSACCHARIDES

1) Hydrolyses chimiques

Deux techniques sont utilisées pour hydrolyser les polysaccharides : par l'A.T.F.A. et par  $H_2SO_4$ .

A - Hydrolyse par A.T.F.A. :

- Introduire 1 ml d'échantillon à hydrolyser contenant au maximum 1 mg de saccharides (neutres + acides), dans un tube à hydrolyse, y ajouter 1 ml d'A.T.F.A. 4 N ou 8 N pour obtenir une concentration finale 2 N ou 4 N.
- Fermer hermétiquement les tubes et les placer dans l'étuve à 105°C, pendant 2 h (A.T.F.A. 2 N) ou 4 h (A.T.F.A. 4 N).
- Eliminer l'A.T.F.A. par plusieurs codistillation avec de l'éthanol.

B - Hydrolyse par  $H_2SO_4$  :

- Dissoudre 5 mg de polysaccharides à hydrolyser dans 2 ml d' $H_2SO_4$  72 % et diluer avant la formation de furfurals pour obtenir finalement une solution d' $H_2SO_4$  1 N.
- Introduire 5 ml de la solution dans un tube à hydrolyse, boucher hermétiquement et placer dans l'étuve pendant 1 h.
- Précipiter les  $SO_4^{2-}$  par un léger excès de solution saturée de  $Ba(OH)_2$ . Laisser 1 h à l'air libre pour que l'excès de  $Ba(OH)_2$  précipite avec le  $CO_2$  atmosphérique puis centrifuger pour éliminer l'ensemble du précipité.

## 2) Hydrolyse enzymatique

L'enzyme utilisée est une pectinase (Rapidase C 80 P) gracieusement fournie par l'établissement.

### A - Purification de l'enzyme :

- Effectuer toutes les opérations à 4°C.
- Dissoudre 500 mg de poudre dans 5 ml de tampon acétate 0,1 N pH 4,5.
- Séparer l'enzyme de son excipient par tamisage moléculaire sur une colonne (12 x 500 mm) de Sephadex G 25, élué par le tampon acétate.
- Repérer la fraction protéique sortant à l'exclusion par la variation d'absorbance à 280 nm.
- Recueillir l'ensemble de la fraction correspondant au 1er pic et vérifier sur une couche mince, l'absence de composés saccharidiques entraînés par le solvant Ethanol / butanol / acide acétique / eau / pyridine (100/10/3/30/10).

### B - Hydrolyse des P.P.A. :

L'efficacité de l'hydrolyse est maximale lorsque les échantillons ont été soumis préalablement à une hydrolyse acide par l'A.T.F.A. 2N, pendant 2 h.

- Reprendre le résidu sec par 2 ml de la solution enzymatique et vérifier que le pH demeure constant (pH 4,5).
- Placer les échantillons dans des tubes à hydrolyse, pendant 72 h à 30°C.
- Traiter simultanément un échantillon d'enzyme seule pour contrôler le degré de sa stabilité.

### Références :

JONES T.M. et P.ALBERSHEIM, 1972.- Plant Physiol., 49 : 926-936.

## FICHE TECHNIQUE N°8

### DOSAGE DES MONOSACCHARIDES PAR C.P.G.

Avant toute autre opération, introduire dans chaque échantillon, à titre de témoin interne, une quantité déterminée de méso-inositol. Dans le cas des P.P.A., prendre 10 % de la masse soumise à l'hydrolyse.

#### 1) Réduction des monosaccharides neutres

- Alcaliniser légèrement l'échantillon et le laisser 30 min à la température ambiante afin de délactoniser les acides uroniques.
- Ajouter 10 mg de  $\text{NaBH}_4$  et laisser la réduction se poursuivre pendant 4 h à la température ambiante.
- Arrêter la réaction en ajoutant une pointe de scalpel de résine Dowex 50 x 8 (forme  $\text{H}^+$ ) et filtrer sur laine de verre dès que le pH est égal à 5.
- Evaporer l'acide borique en excès, en présence de méthanol contenant 1 % d'acide acétique (formation du triméthyl ester qui est volatil).
- Reprendre le résidu sec par 2 ml d'eau bidistillée et partager en deux lots : le premier est destiné à l'acétylation directe et le second doit être lactonisé au préalable.

#### 2) Lactonisation des acides aldoniques

Au cours de la réduction des monosaccharides neutres enalditols, les acides uroniques ont été transformés en acides aldoniques (voir figure II-7).

- Ajouter un volume égal d' $\text{HCl}$  1 N et laisser 1 h à la température ambiante.
- Evaporer à sec par un courant d'air chaud ( $40^\circ\text{C}$ ).
- Laisser séjourner pendant 18 heures dans un excicateur, en présence de  $\text{NaOH}$ .

### 3) Réduction des aldonolactones

- Reprendre le résidu sec par 1 ml d'une solution de tétraborate de sodium, y ajouter 10 mg de  $\text{NaBD}_4$  et laisser la réduction se poursuivre pendant 4 h à la température ambiante.
- Arrêter la réduction et éliminer l'excès de borate comme précédemment.

### 4) Acétylation des alditols

- Congeler puis lyophiliser les échantillons réduits.
- Reprendre les échantillons par 200  $\mu\text{l}$  de pyridine et 200  $\mu\text{l}$  d'anhydride acétique et laisser à température ambiante pendant une nuit.
- Evaporer le mélange réactionnel sous un flux d'azote, à la température ambiante.

### 5) Analyse par C.P.G.

- Reprendre le résidu sec d'acétates d'alditols par du dichlorométhane à 1 % d'anhydride acétique.
- Injecter 1 ou 2  $\mu\text{l}$  dans la colonne du chromatographe (GIRDEL 300).
- Colonne utilisée : capillaire (diamètre intérieur 0,3 mm), Silicones OV 101.
- régler la température de l'injecteur et du détecteur à 240°C. Le débit du gaz vecteur est de 0,6 bars.
- utiliser la programmation suivante : de 130°C à 240°C, 2°C / min ; 10 min à 240°C.

### Références :

JONES T.M. et P.ALBERSHEIM, 1972.- Plant Physiol., 49 : 926-936.

## FICHE TECHNIQUE N°9

### METHODE DE TITRAGE POTENTIOMETRIQUE

#### 1) Titrage direct des P.P.A. sous forme $H^+$

- Dissoudre un échantillon de P.P.A. (20 mg) dans 10 ml d'eau bidistillée et le laisser une nuit sous agitation à 4°C.
- Passer l'échantillon sur une résine échangeuse de  $H^+$  (Amberlite 120), ajuster le volume à titrer à 20 ml et noter le pH de départ de la solution.
- Placer l'échantillon dans la cellule de titrage, maintenue à la température constante de 25°C et sous flux d'azote.
- Injecter automatiquement la solution de base choisie : NaOH et KOH 0,01 N,  $Ca(OH)_2$  0,05 N, à raison de 50 à 200  $\mu$ l à la fois. Noter le pH dès qu'il se stabilise sous agitation, arrêter l'agitation et noter le pH après 30 sec de repos. C'est cette seconde valeur qui est utilisée pour construire les courbes de titrage.

#### 2) Déméthylation des acides uroniques

- Prendre un échantillon mis sous forme  $H^+$ , noter son pH, ajouter 1 ml de NaOH 1 N et laisser la déméthylation s'effectuer pendant 4 heures à 4°C.
- Ajouter 1 ml d'HCl 1 N, repasser l'échantillon sous forme  $H^+$  et mesurer le nouveau pH de la solution.
- Titrer à nouveau comme précédemment ; le supplément d' $OH^-$  nécessaire pour obtenir le ou les virages représente le nombre de sites acides déméthylés.

#### Références :

MORVAN C., 1983.- Thèse Doct. Sci. Nat., Rouen, 167 p.



## FICHE TECHNIQUE N°10

### REPERAGE DES GIBBERELLINES

#### 1) Extraction des gibbérellines

- Séparer les cellules du milieu de culture par filtration.
- Evaporer à sec la moitié du milieu correspondant à 1 flacon de culture.
- Extraire les gibbérellines par 30 ml de méthanol à 80 %, 3 fois pendant 4 h à 4°C.
- Refaire l'opération de façon identique avec 3 fois 30 ml d'acétate d'éthyle.
- Evaporer à sec l'extrait total.
- Précipiter les P.P.A. contenus dans la seconde moitié du milieu en additionnant un volume égal de C.T.A.B. à 3 % puis procéder comme mentionné dans la fiche technique N°6.
- Dissoudre les P.P.A. dans le méthanol 80 % puis l'acétate d'éthyle en procédant exactement comme pour le milieu de culture brut.

#### 2) Chromatographie sur couche mince

- Dissoudre les résidus secs dans 400 ul de méthanol à 80 %, les déposer sur une plaque de gel de silice (Merck, F 254) puis reprendre les parties insolubles par 400 ul d'acétate d'éthyle qui sont à leur tour superposés aux dépôts précédents.
- Chromatographier toutes les plaques en même temps, dans le solvant isopropanol-ammoniaque-eau (80 / 0,05 / 1,95 v/v), à 20°C et à l'obscurité.
- Laisser migrer le solvant sur 18 cm de hauteur.
- Laisser les chromatogrammes sécher à l'air libre, les soumettre à une nébulisation par une solution d'orcinol à 20 % dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 10 % et passer 5 min à l'étuve à 105°C.
- Repérer d'une part les taches pourpres de saccharides révélées par l'orcinol et d'autre part les auréoles fluorescentes à 254 nm.

#### Références :

- COUILLEROT J.P. et Y. YI, 1985.- C. R. Acad. Sci. Paris, 301 : 99-102.  
MARIE-ALSABEK F., 1985.- Thèse Doct. Ing., Lille, 127 p.

