Zeitschrift: Archives des sciences [1948-1980]
Herausgeber: Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève
Band: 20 (1967)
Heft: 1

Artikel: Recherches sur le développement des tissus végétaux cultivés in vitro dans ses rapports avec l'utilisation du glucose et l'action de la lumière

Autor: Naef, Jaques

Kapitel: II: Matériel et techniques

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-739382

Nutzungsbedingungen
Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation
L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use
The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 16.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

CHAPITRE II — MATÉRIEL ET TECHNIQUES

A) CULTURE DE TISSUS IN VITRO

Tissus utilisés

D'une manière générale nous avons réalisé toutes les expériences avec le même matériel, c'est-à-dire la souche de tissu cambial de Carotte isolée par Gautheret en 1939. Ce qui a dicté le choix de ce tissu, c'est la facilité de son entretien par rapport à d'autres, une certaine régularité dans la prolifération et une bonne homogénéité dans le développement. C'est aussi le fait que ce tissu possède de la chlorophylle en quantité appréciable s'il est placé dans de bonnes conditions d'éclairement. Il en sera question à propos des mesures de photosynthèse.

Les mêmes tissus de Carotte maintenus à l'obscurité peuvent être repiqués. Ils sont alors, après un ou deux passages, exempts de chlorophylle et peuvent rester blancs pendant plusieurs jours si on les replace à la lumière. Cependant ils se repiquent plus difficilement et sont aussi plus délicats car ils se nécrosent rapidement. Nous avons utilisé cette souche étiolée comme témoin dans des mesures de respiration.

Une autre souche de tissu cambial de Carotte nous a fourni des données de comparaison par rapport à la souche chlorophylienne. Il s'agit d'une souche obtenue par Eichenberger par hasard, vraisemblablement à la suite d'une mutation somatique, touchant le mécanisme enzymatique des pigments photosynthétiques. Elle est très caroténogène et nous avons montré avec Turian [53] qu'elle ne possède pas de chlorophylle. Elle se cultive malheureusement beaucoup plus difficilement que la souche verte dont elle provient, ce qui ne permet pas de l'utiliser pour obtenir un échantillon important, régulier et stable.

Nous voulions établir des comparaisons avec la souche verte de Carotte en utilisant des colonies de Crown-gall de Scorsonère, car elles ne verdissent pratiquement pas dans les conditions de nos expériences. Dans ce cas également les premiers résultats se sont montrés trop irréguliers pour que nous puissions continuer à employer cette souche.

Volume et poids des explantats

Afin que les fragments de tissus mis en culture soient aussi semblables que possible, des cubes de même forme sont prélevés dans les colonies servant au repiquage. On applique la méthode du quadrillage, c'est-à-dire que la colonie initiale est mise dans une boîte de Petri stérile sous laquelle est glissée une feuille de papier millimétré portant en son centre un carré de 6 mm de côté ombré au crayon. Les tissus sont découpés en suivant le carré de façon à obtenir des cubes de 6 mm d'arête. Le poids moyen des explantats prélevés ainsi dans les tissus de Carotte était de l'ordre

de 134 à 152 mg. Les explantats de Crown-gall de Scorsonère étaient d'abord de même grandeur mais nous avons ensuite utilisé des cubes de 7 mm d'arête et de 150 mg car leur prolifération était plus régulière dans ces conditions.

Milieux de culture

Les souches tissulaires étaient entretenues sur des milieux solides en suivant les techniques de Gautheret [19].

a) *milieux solides :*

Nous indiquons ici la formule générale des milieux servant à l'entretien des souches. Les quelques variantes se rapportant à chaque type d'expérience sont décrites plus loin.

Les souches de tissu cambial de Carotte chlorophyliennes, ou étiolée et celle de Crown-gall de Scorsonère ont été cultivées sur le milieu de Gautheret. La souche de tissu de Carotte d'Eichenberger (caroténogène) a été cultivée sur le milieu de Heller.

Le milieu de Gautheret comprend:
la solution de Knop diluée de moitié
la solution de micro-éléments de Berthelot modifiée par Gautheret à raison de 0,5 ml par litre
de la gélose (1 %)
de la Vitamine B_1 (10^{-6} g/ml).

Selon le tissu considéré, le milieu comprend encore en dose variable:
du glucose
de l'acide β-indolyl-acétique (ABIA)

Les tissus verts de Carotte sont cultivés en présence de 2 % de glucose et d'ABIA (10^{-8}); les tissus étiolés de Carotte sont cultivés en présence de 3 % de glucose et d'ABIA (10^{-8}); ceux de Crown-gall de Scorsonère en présence de 5 % de glucose et sans auxine.

Le milieu de Heller comprend:
la solution de macro-éléments
la solution de micro-éléments (1 ml par litre)
de la gélose (1 %)
du glucose (5 %)
de la vitamine B_1 (10^{-6} g/ml)
de l'acide β-indolyl-acétique (10^{-8} g/ml).

b) *milieu liquide*

Nous avons réalisé des expériences en milieu liquide pour étudier la consommation de glucose par les tissus. Dans ce cas, nous avons choisi le milieu de Heller qui était mieux adapté à des expériences de courte durée. Nous avons utilisé le système mis au point par Heller [32] pour maintenir les explantats au niveau du liquide, soit un support en papier-filtre sans cendres, embouti et introduit dans les tubes de culture.

Afin d'éviter que des bulles d'air restent emprisonnées sous le papier-filtre, nous percions ce dernier d'un trou de 2 mm en son centre, au moyen d'une aiguille.

Conditionnement des expériences

Tous les tubes de cultures des expériences que nous avons faites ont été disposés dans une pièce à culture ayant environ 9 m^3 et climatisée au moyen d'une installation réalisée spécialement. Nous disposions d'une étagère à rayons de verre sur lesquels étaient placés des tubes lumineux Philips de 120 cm, type « Lumière du jour » TL 40 W, standard 55, 6500° K. L'éclairement reçu à 20 cm était d'environ 2200-2400 lux. La température était réglée à 23° $\pm$ 1° C.

Les cultures qui devaient être réalisées à l'obscurité étaient placées dans des boîtes en bois ou en carton qui se trouvaient dans la même pièce.

La durée d'éclairement était de 14 heures tandis que celle de la période obscure était de 10 heures, le tout étant commandé par une horloge.

Nous avons également utilisé cette chambre climatisée pour entretenir la plupart des souches dont nous avions besoin. Cela permettait d'avoir des colonies semblables et régulières toute l'année. Ces souches étaient ainsi soustraites aux inconvénients que l'on rencontre souvent tels qu'une trop forte chaleur en été ou un manque d'illumination en hiver.

B) Mesures de croissance pondérale

1) *Poids frais*

A la fin de chaque expérience, le poids frais de toutes les colonies qui s'étaient développées était lu à la balance de précision. Les fragments étaient soigneusement essuyés séparément, avec du papier filtre, puis pesés le plus rapidement possible.

2) *Poids sec*

Après la détermination du poids frais, toutes les colonies constituant une condition expérimentale étaient réunies en un seul flacon à culture à large col. Tous les flacons étaient ensuite bouchés par un tampon de coton puis mis au four Pasteur pendant au moins quatre jours à 97° C. Les pesées étaient ensuite faites à la balance Mettler en plaçant ensemble tous les fragments d'un même flacon.

C) Dosage d'azote

Nous avons dosé l'azote total et l'azote protéique selon une méthode mise au point au laboratoire du Professeur Gautheret. Les valeurs obtenues au moyen de ces dosages constituaient un autre critère de croissance.

Après les avoir remis pour quelques heures au four à 95° C, les tissus secs sont broyés dans un mortier recouvert d'une plaque de bois percée d'un trou qui ne laissait passer que le pistil. De cette façon, les fragments de tissus n'étaient pas dispersés et ils pouvaient être broyés convenablement.

Le principe du dosage est fondé sur une réaction obtenue au moyen du réactif de Nessler mesurée au colorimètre.

Prises pour le dosage de l'azote total

Les prises de 30 à 40 mg sont pesées à la balance Mettler, puis transportées directement dans les tubes à minéraliser spéciaux portant des graduations pour 35 ml et 50 ml. On place au fond de chaque tube une pincée de catalyseur de Dumazert et Marcelet au sélénite de Mercure.

Prises pour le dosage de l'azote protéique

Chaque prise de 60 à 100 mg est déposée sur la plaque poreuse d'un tube d'Allihn No. 4. Chacun d'eux est ensuite disposé au-dessus d'une éprouvette.

Elimination de l'azote soluble

Les tubes d'Allihn sont alors remplis d'une solution normale d'acide trichloracétique [16,5 %]. Lorsque la filtration est terminée, on entraîne les particules restées sur les parois des tubes, on les remplit à nouveau et on laisse filtrer. On répète l'opération une troisième fois et si besoin est une quatrième fois, c'est-à-dire jusqu'à ce que le filtrat soit incolore. Ces opérations se déroulent à la chambre froide.

Minéralisation de l'azote total

Cette méthode permet de traiter 24 échantillons simultanément.

La minéralisation s'opère en plaçant les tubes dans un portoir en laiton. On a eu soin d'introduire dans chaque tube 3 ml d'acide sulfurique pur. La plaque de base du portoir est creusée de petites hémisphères dans lesquelles s'adaptent le fond des tubes. Le portoir est placé sur un réchaud et on commence la minéralisation à la veilleuse pendant une heure, puis on augmente la flamme pendant 2 à 3 heures jusqu'à ce que le contenu des tubes soit limpide. On laisse refroidir puis on introduit délicatement dans chaque tube 0,25 à 1 ml d'eau oxygénée. On remet à chauffer pendant une heure.

Minéralisation de l'azote protéique

On entraîne le résidu resté sur le filtre d'un jet de pissette et on le recueille dans un tube à minéralisation où l'on dépose également une pointe de spatule de catalyseur. On ajoute 3 ml d'acide sulfurique pur puis on évapore l'eau à l'étuve à 160° C. Après quoi on pratique la minéralisation comme pour l'azote total.

Tubes témoins et courbe étalon

Au cours des opérations précédentes on a également préparé deux tubes témoins qui contiennent:

du sélénite de Mercure (Catalyseur de Dumazert et Marcelet)

du sulfate d'Ammonium.

On a préparé au préalable une solution de sulfate d'Ammonium à 1000 gamma d'azote par ml. soit 4,716 g de $SO_4(NH_4)_2$ desséché à l'étuve dans un litre d'eau distillée.

On effectue ensuite des prises de manière à avoir des dilutions donnant: 20, 40, 60, 80, 90, 100, 120 et 150 gamma d'azote. On complète le volume au premier trait de chaque tube soit 35 ml puis on ajoute à chacun 15 ml de réactif de Nessler. Les mesures permettent de représenter le graphique étalon.

Lecture et détermination des quantités d'azote

Les tubes à minéralisation sont repris après refroidissement et leur contenu est dilué avec de l'eau distillée jusqu'au trait de 50 ml avec les mêmes précautions que pour les témoins. Il reste à prélever à la pipette de précision les prises d'essai que l'on porte dans un tube à minéralisation. On complète avec de l'eau jusqu'au premier trait (35 ml) puis avec 15 ml de réactif de Nessler (2me trait). Les prises d'essai doivent être telles que la coloration mesurée au colorimètre soit comprise entre les deux valeurs extrêmes des tubes témoins. Les lectures sont faites avec le même tube du colorimètre pour chaque prise d'essai et les quantités d'azote sont obtenues par comparaison avec le graphique étalon. On calcule ensuite le nombre de gamma d'azote contenu dans 50 ml puis par mg de poids sec.

D) Dosage des sucres

Le dosage du glucose dans le milieu de culture était fait selon la méthode de Bertrand [6]. Le dosage des sucres intratissulaires qui est beaucoup plus long et délicat a été réalisé selon la méthode dite des trois sucres (glucose, fructose, saccharose) telle qu'elle a été appliquée par Goris avec une formule qui permet de trouver rapidement les quantités recherchées.

Extraction

Les tissus, après avoir été pesés et coupés en fragments d'environ 100 mg sont tout d'abord stabilisés par de l'alcool à 95 bouillant dans un volume correspondant à 5 fois le poids de matière fraîche. L'ébullition modérée est maintenue pendant 20 à 30 minutes. Ils sont broyés au moment du dosage sur une plaque de verre puis soumis à un épuisement par l'éthanol 90. utilisé à raison de 5 fois le poids du tissu. Cette opération se fait à chaud pendant 1 à 2 heures dans un ballon plongé dans l'eau d'un bain-marie. Le contenu est versé bouillant sur un filtre de Büchner disposé sur une fiole à vide. On essore le résidu et on recommence deux fois l'opération. On termine par une extraction à l'alcool 60. et une à l'eau. Toutes les solutions sont distillées au bain-marie à une température voisine de 50°C, en s'aidant du vide. Nous avons utilisé un appareil rotatif type Büchi. On évapore jusqu'à ce que l'on obtienne une liqueur sirupeuse épaisse.

Préparation d'une solution convenable pour le dosage

Le résidu est repris par de petites quantités d'eau de façon à obtenir finalement 20 à 50 ml. Cette solution est déféquée par de l'acétate de Plomb basique qui est intro-

duit goutte à goutte en agitant fortement le récipient. Nous avons utilisé le plus souvent un tube à centrifuger de manière à éviter un transvasage superflu. On centrifuge pendant 15 minutes à 2500 t/min. Après quoi on vérifie si la précipitation a été complète par adjonction de quelques gouttes d'acétate de Plomb. Si ce n'est pas le cas, on répète l'opération. Nous utilisons en général environ 1,2 ml de solution déféquante pour une masse tissulaire d'environ 10 g. Le précipité est remis en suspension dans un peu d'eau afin de le laver puis on le soumet à une nouvelle centrifugation de quelques minutes. Si l'on ne poursuit pas les opérations immédiatement, pour une bonne conservation, il faut prendre soin d'acidifier faiblement la solution sucrée jusqu'à un pH de 5 par quelques gouttes d'acide acétique en suivant avec un papier indicateur. Avant de faire les dosages proprement dit, il faut encore éliminer les sels de Plomb. On y parvient en ajoutant à la solution du sulfate de Sodium anhydre jusqu'à fin de précipitation, à raison d'environ 0,25 g pour 1 ml d'acétate de Plomb, un excès de ce sel ne gênant pas les opérations ultérieures.

On agite bien la solution puis on centrifuge jusqu'à ce que le liquide soit tout à fait limpide. Dans ce cas aussi, il est nécessaire de vérifier si la précipitation a été totale avant de poursuivre les opérations et il faut laver le précipité, le remettre en solution, centrifuger et ajouter le surnageant à la solution. Cette dernière est alors réduite à un volume déterminé par concentration sous vide à l'appareil à distiller rotatif, en dessous de 60°C. Les quantités de sucre étant faibles, nous amenions le volume à 21 ml.

Dosage

Le principe du dosage consiste à faire trois déterminations. Une lecture polarimétrique et deux mesures du pouvoir réducteur, l'une avant, l'autre après dédoublement du saccharose.

La solution sucrée obtenue comme nous l'avons indiqué est versée dans le tube de 20 cm d'un polarimètre dont on mesure la déviation soit α. Nous avons utilisé un appareil Kern. Ensuite sur une partie aliquote (10 ml) on détermine la quantité de sucres réducteurs par la méthode de Bertrand, soit p ce résultat exprimé en sucre interverti. Le reste de la solution est soumis à l'hydrolyse enzymatique au moyen d'une solution d'Invertase Analytical Difco. Nous ajoutions en pratique 1 à 2 ml d'une solution de 10 ml. ($k = 0,1$) puis nous laissions la fiole soigneusement bouchée pendant une nuit à l'étuve à 37°C. Puis un nouveau dosage donne la somme des sucres réducteurs initiaux et du saccharose inverti soit p'.

Connaissant le poids π de tissu frais et le volume v de la solution sucrée, on peut calculer la déviation polarimétrique d'une solution contenant dans 100 ml les glucides solubles de 100 g de tissu frais analysé soit A.

$$A = \frac{\alpha \cdot v}{\pi}$$

D'autre part on peut déterminer P, la quantité de sucres réducteurs contenus dans 100 g de tissu frais:

$$P = \frac{p \,.\, 100}{\pi}$$

et P', la somme des sucres réducteurs initiaux et du saccharose inverti correspondant à 100 g de tissu frais:

$$P' = \frac{p' \,.\, 100}{\pi}$$

Pour obtenir facilement le pourcentage de chacun des trois sucres, Goris a établi une formule simple en fonction des trois valeurs précédentes et des pouvoirs rotatoires spécifiques qui lui permettait d'obtenir la concentration en glucose des tissus. Quant au fructose, il est déduit par différence entre la quantité des sucres réducteurs P et celle du glucose. Le saccharose résulte de la différence des valeurs P' — P multipliée par le coefficient 0,95 qui est le rapport du poids moléculaire du saccharose et du sucre interverti.

On obtient le poids de sucre dans 100 g de tissu frais:

Glucose. $x = \frac{1}{144{,}05} (50\ A + 154{,}51\ P - 63{,}21\ P')$

Fructose. $y = P - x$

Saccharose. $z = (P' - P)\ 0{,}95$

Les lectures polarimétriques sont difficiles à obtenir avec une grande exactitude. Le pouvoir réducteur, par contre, est déterminé avec précision.

E) Dosage des chlorophylles

La méthode de Comar et Zscheile [10] permet par un simple calcul d'obtenir les quantités de chlorophylle a et b en partant d'une seule solution. Cette méthode appliquée au dosage des chlorophylles d'algues unicellulaires peut s'adapter au dosage de ces pigments extraits des tissus cultivés in vitro.

Préparation de l'extrait

Nous utilisions 5 à 8 g de tissus frais qui étaient déposés dans un mortier immédiatement après la pesée. Après avoir ajouté une pointe de spatule de carbonate de Calcium pour neutraliser l'excès éventuel d'acides organiques pouvant hydrolyser la chlorophylle, on recouvre les tissus de sable de quartz que l'on humecte ensuite au moyen d'un peu d'acétone. On commence à broyer les tissus et l'on veille à ce que le sable soit toujours humide en ajoutant de temps en temps de l'acétone. Il ne doit cependant pas y avoir un excès de solvant surnageant au-dessus du sable. Après le

broyage, il faut rincer le pistil à l'acétone et transporter tout le contenu du mortier dans un tube à essai à travers un entonnoir à large col. On rince ensuite complètement le mortier et l'entonnoir avec de petites quantités d'acétone et on abandonne le mélange pendant au moins deux heures à la chambre froide.

Dans un cylindre à vide on dispose un tube à essai surmonté d'un petit entonnoir. On pose le couvercle sur le cylindre et on y adapte un entonnoir de Büchner muni d'un papier-filtre. On humecte le filtre au moyen de quelques gouttes d'acétone puis on transvase tout le contenu du tube maintenu au froid: sable et solution acétonique. Il faut prendre garde de bien étaler le sable sur toute la surface du filtre au moyen d'une baguette de verre et de le laver plusieurs fois à l'acétone jusqu'à ce qu'il retrouve sa couleur rose.

Le filtrat n'est pas toujours limpide: il peut contenir du sable et des protéïnes qui ont floculé. On le filtre à nouveau (Papier Schleicher et Schüll no. 575). Cette opération se fait alors au-dessus d'une ampoule à décanter de 200 ml. Avant de continuer, il est nécessaire de laver le papier-filtre trois fois à l'acétone pour entraîner la chlorophylle qui a été adsorbée.

On peut alors ajouter dans l'ampoule à décanter 10 à 20 ml d'éther de pétrole pur ou d'hexane. Cette quantité doit être au moins la moitié du volume d'acétone. Puis on lave six fois à l'eau distillée en évitant d'émulsionner la solution, afin d'éliminer l'acétone.

On recueille ensuite la solution de chlorophylle qui a passé dans l'éther de pétrole ou l'hexane dans un tube à essai dans lequel on a déposé une pointe de spatule de sulfate de Sodium. Puis on rince l'ampoule à décanter deux fois avec 1 à 2 ml de solvant pur. La solution doit reposer 1 à 2 heures à température ambiante jusqu'à ce qu'elle soit parfaitement limpide. La solution est alors complétée à un volume déterminé de façon à obtenir une densité optique comprise entre 0,2 et 0,8 à la on gueur d'onde de 660 millimu.

l*Dosage*

La détermination quantitative est réalisée au moyen des formules de Comar après lecture au spectrophotomètre. Nous avons utilisé l'appareil Beckmann modèle DU. On remplit les cuves de 1 cm du spectrophotomètre avec les solutions à doser en ayant rempli l'une d'elles avec du solvant pur qui sert de témoin à blanc. Puis on procède aux lectures qui sont faites aux longueurs d'onde suivantes:

6400, 6425, 6450, 6475, 6625 Angström

Les manipulations sont faites rapidement en raison de l'évaporation du solvant.

Soient D 6600 et D 6425 les densités optiques aux longueurs d'onde respectives de 6600 et 6425 Angström.

Les concentrations de chlorophyile a et b se calculent à partir des données au moyen des formules suivantes:

Chlorophylle a: 9,93. D 6600 — 0,777. D 6425 mg/litre d'éther de pétrole.

Chlorophylle b: 17,7. D 6425 — 2,81. D 6600 mg/litre d'éther de pétrole.
Il ne reste plus qu'à rapporter ces valeurs au poids de tissu frais.

F) Mesure des échanges gazeux

La mesure des échanges gazeux a été réalisée à l'aide de la méthode manométrique de Warburg. En utilisant cette méthode et l'appareillage qui lui est propre, nous avons essayé de déterminer la photosynthèse des tissus chlorophylliens comme on le fait pour des cultures d'algues par exemple. Par la suite, nous avons encore utilisé cette méthode afin de mesurer les échanges gazeux respiratoires à titre de comparaison. Cela nous permettait de mesurer des actes physiologiques différents dans des conditions assez semblables. A la méthode manométrique s'oppose la méthode eudiométrique qui paraît beaucoup plus fine ainsi que Lioret [48] l'a précisé encore récemment. Les erreurs attachées à la première méthode proviennent surtout d'une diffusion gazeuse incomplète. Nous avons eu cependant la possibilité d'effectuer de nombreuses mesures avec l'appareil de Warburg qui nous ont donné des résultats satisfaisants. Les premiers essais ont été réalisés avec l'appareil de Braun modèle SL rectangulaire. Par la suite, nous avons utilisé l'appareil Braun modèle W circulaire équipé d'un dispositif spécial pour la photosynthèse comportant une cuve en plexiglas et un cadre portant huit tubes fluorescents Philips TL 20 à réflecteur incorporé. Nous obtenions de cette façon un éclairement de 4760 lux à 20 cm.*) L'appareil étant placé dans une chambre noire, il était possible de passer inmédiatement d'une période éclairée à une période obscure ou vice versa. Les fioles ont été faites spécialement pour cet usage.

Mesure de la respiration

Choix d'une solution où s'effectuent les mesures

Les poids de tissus utilisés étant particulièrement grands et afin que le volume gazeux soit suffisant, il était nécessaire d'employer des fioles spéciales. Le volume de ces fioles est d'environ 35 cm^3.

La solution de mesure comprenait 1 partie de mélange tampon et 9 parties de solution de Heller.

Mélange tampon adapté de Sörensen: KH_2PO_4 M 8 parties, Na_2HPO_4 M 2 parties } pH 6,2 — 6,3

Opérations

Les tissus étaient choisis après 3 semaines de culture environ ou un temps convenable éventuellement plus long. Après avoir été pesées, les colonies étaient immédiatement introduites dans les fioles.

* Amplitude d'agitation 5 cm; fréquence: 80 oscillations/min.

Trois fioles étaient préparées contenant l'une 15 ml. et les autres 10 ml. de solution de mesure. La première sert de thermobaromètre. On introduit 0,3 ml. de KOH 20 % dans le tube excentrique de la deuxième fiole. On y place également un morceau de papier filtre de 2 × 2 cm. plissé en éventail pour étaler la potasse sur une plus grande surface. On dépose sur le fond de la fiole les tissus et on complète le volume à 15 ml. avec du milieu de mesure en admettant que le poids spécifique des tissus est de 1.

Dans la troisième fiole on ne met pas de potasse mais on introduit seulement les tissus et on complète le volume à 15 ml. avec du milieu de mesure.

Nous disposions généralement deux séries de trois fioles sur les supports de l'appareil. Les couvercles doivent être enduits de graisse à joints ou de silicone et adaptés aux fioles respectives. Puis ces dernières doivent enfin être fixées aux manomètres correspondants. La température du bain thermostatique était de 25°C.

Les manomètres étaient ensuite mis en mouvement et les robinets étaient maintenus ouverts. Ceci constitue la période de stabilisation qui durait 20 minutes. Après quoi les robinets étaient fermés et les lectures étaient faites toutes les 10 minutes pendant une heure.

Mesure de la photosynthèse

Choix d'une solution où s'effectuent les mesures

Les cellules sont mises en contact avec une solution de carbonate et de bicarbonate. Ce mélange tampon permet d'obtenir une pression partielle de CO_2 constante dans l'espace occupé par les gaz à l'intérieur de la fiole de Warburg. Dans cette fiole la pression partielle de CO_2 est constante de même que le volume de ce gaz. Les variations manométriques enregistrées sont donc celles de la consommation d'oxygène auxquelles peuvent s'ajouter à la lumière les valeurs positives du dégagement d'oxygène produit par la photosynthèse.

Le mélange tampon a un pH beaucoup plus élevé que celui du milieu de culture. C'est pourquoi nous avons réalisé une expérience en vue de vérifier si un milieu alcalin n'exerçait pas d'action inhibitrice sur les tissus [voir p. 34].

Ceci nous a amené à faire l'essai de plusieurs mélanges tampons et plus particulièrement à comparer leur pH [voir p. 34 et tableau 1]. Finalement, après plusieurs essais, nous avons adopté le mélange d'Emerson-Chalmers dans les proportions suivantes:

K_2CO_3	O,1 M	15 parties
$NaHCO_3$	O,1 M	85 parties

le pH est de 8,75.

Opérations

Au cours des premiers essais, les tissus étaient découpés en tranches de 1/2 mm. d'épaisseur. Après la pesée, les tranches étaient soit introduites directement dans les

fioles de Warburg, soit lavées à l'eau pour limiter l'oxydation superficielle inhérente au découpage. Par la suite nous introduisions dans les fioles des colonies intactes, âgées si possible de trois semaines pour les raisons énoncées plus loin (p. 53). Dans ce cas également, nous mettions au préalable 10 ml. de milieu de mesure dans les fioles. Nous complétions ensuite le volume à 15 ml. en admettant que le poids spécifique des tissus est de 1. Après quoi les couvercles de fioles étaient soigneusement adaptés et celles-ci fixées aux manomètres correspondants. Le thermobaromètre était préparé de manière identique. Après un temps d'équilibre de 20-30 minutes dans le bain thermostatique à 25°C, les robinets étaient fermés et les mesures des variations de volume gazeux étaient notées toutes les 10 minutes ou dans certains cas toutes les 15 minutes.

Calcul de l'oxygène libéré

Nous avons suivi la méthode générale dont nous donnons le sommaire. Les expériences comprennent en général 3 phases d'égale durée. C'est ce procédé que nous avons adopté. Il s'agit d'une phase éclairée précédée et suivie d'une phase obscure. En admettant que l'intensité respiratoire est constante, on mesure au cours de la période éclairée la valeur négative de la consommation d'oxygène à laquelle s'ajoute la valeur positive du dégagement d'oxygène produit par la photosynthèse. Afin de diminuer l'erreur de mesure de l'intensité respiratoire, on calcule cette dernière en faisant la moyenne entre deux lectures faites l'une avant et l'autre après la période éclairée. Pour obtenir la valeur réelle de la photosynthèse, on ajoute à la moyenne de l'intensité respiratoire la valeur de la photosynthèse mesurée. Pour simplifier le calcul on peut utiliser la formule proposée par Stauffer [64] qui permet de tenir compte du sens négatif ou positif des valeurs des échanges gazeux à la lumière.

CHAPITRE III. — INTRODUCTION AUX EXPÉRIENCES

1. RÔLE DE QUELQUES FACTEURS EXTERNES SUR LA CROISSANCE.

Questions posées:

Effet du glucose offert

Cette question concerne un domaine qui a été étudié dans les débuts des recherches sur la nutrition des tissus cultivés in vitro et en particulier dans les travaux de Gautheret [15, 19]. Ces derniers ont été effectués en cultivant les tissus sur des milieux dont la source glucidique était le saccharose, alors que nous avons utilisé le glucose dont la valeur nutritive est un peu plus faible mais qui a l'avantage d'être un ose simple.