

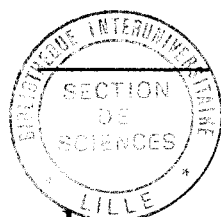
50376  
1963  
93

UNIVERSITE DE LILLE  
**FACULTÉ DES SCIENCES**

---

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du**

DIPLOME D'ÉTUDES SUPÉRIEURES  
DE SCIENCES NATURELLES



Production de substances de croissance

par des souches bactériennes

provenant de tissus végétaux

---

---

**Soutenu à Lille, en Mai 1963**

**par Jean-Claude DENIS**

Un certain nombre de travaux effectués à l'Institut de Botanique de LILLE ont été consacrés, déjà, à l'étude des bactéries hébergées par les tissus végétaux. Parmi eux, quelques uns ont pu permettre d'établir des rapports entre la présence de ces microorganismes en plus ou moins grand nombre et certains phénomènes physiologiques.

C'est ainsi que l'on a pu noter (19) que les produits artificiels qui lèvent l'inhibition de germination des tubercules de pomme de terre, tendent à augmenter le nombre des bactéries dans ces organes. Il a été possible, d'autre part, de constater soit par des observations cytologiques (24) soit par des numérations (9) que le début de la période de germination, caractérisée par la richesse en sucres hydrolysés et en substances de croissance, coïncidait avec un accroissement de la population bactérienne. Sur ces constatations repose l'hypothèse que les bactéries pourraient intervenir par leurs sécrétions, et notamment par celle de substances de croissance. Aussi nous a-t-il été demandé de rechercher si les microorganismes, isolés de tissus végétaux sains, pouvaient effectuer "in vitro" la synthèse de certaines substances de croissance.

A - PRODUCTION DE SUBSTANCES DE CROISSANCE INDOLIQUES

I - MATERIEL

=====

1) - Origine des souches bactériennes

Les bactéries que nous avons étudiées proviennent de collections entretenues au laboratoire. L'origine des souches, ainsi que leur appellation conventionnelle utilisée dans ce mémoire, sont données dans la planche 1 ; nous y avons fait figurer également les noms de celles qui ont été déterminées au cours de travaux précédents (13) et (16).

2) - Milieux de culture

L'entretien des souches en tubes inclinés est effectué stérilement sur le milieu gélosé suivant :

- MC67 (Nutrient Broth n° 2) ..... 25 g
- Glucose ..... 20 g
- Agar ..... 15 g
- Eau distillée ..... 1 litre

Pour étudier la production éventuelle de substances de croissance, chacune des souches est ensemencée par les techniques habituelles et classiques de la bactériologie, dans des flacons d'Erlenmeyer contenant 150 ml. d'un milieu de culture, riche en tryptophane et en pyruvate de sodium, qui a été préalablement stérilisé à l'autoclave pendant vingt minutes à 110° dont la composition est la suivante :

- PO4 K2 H	0,75 g
- PO4 K H2	0,75 g
- SO4 Mg	0,50 g
- SO4(NH4)2	0,50 g
- Chlorhydrate de cystéine	0,02 g
- Tryptophane	0,50 g
- Pyruvate de sodium	5,00 g
- Glucose	2,50 g
- Eau distillée	1.000 ml

On y ajoute 12 gouttes d'une solution minérale complexe (solution oligodynamique de G. Bertrand et Berthelot) renfermant pour 1 litre d'eau distillée :

(6)

- (SO4)3 Fe2	50,00 g
- SO4 Mn, 7H2 O	2,00 g
- SO4 Ca, 2H2 O	0,50 g
- Cl2 Ni, 6H2 O	0,05 g
- Cl2 Co, 6H2 O	0,05 g
- (SO4)2 Ti2	0,20 g
- SO4 Zn, 7H2 O	0,10 g
- SO4 Cu, 5H2 O	0,05 g
- SO4 Gl, 4H2 O	0,10 g
- BO3 H3	0,05 g
- SO4 H2 à 66° Bé	1 ml

Les récipientsensemencés séjournent à l'étuve bactériologique réglée à 30° pendant des temps variables.

## II - METHODES

=====

Afin de ne laisser subsister aucun doute quant à la production d'acide  $\beta$  - indolyl-acétique, ou ABIA, dans les milieux de culture, nous avons employé trois méthodes :

- Recherche colorimétrique
- Séparation par électrophorèse
- Test biologique

1) - Recherche colorimétrique

a - Réactif

Parmi les nombreux réactifs proposés pour la mise en évidence photolorimétrique de l'ABIA, nous avons retenu après plusieurs essais, le réactif de Salkowski amélioré par Pilet (1°) :

- 3 ml. de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  (concentration 1,5M)
- 60 ml de  $H_2SO_4$  (poids spécifique 1,84)
- 100 ml de  $H_2O$  distillée et déionisée.

On le prépare de la façon suivante : on ajoute  $FeCl_3$  50 ml d'eau distillée, puis on verse lentement l'acide sulfurique en agitant constamment ; on laisse refroidir, puis on complète avec les 50 ml d'eau distillée restants.

Ce réactif, mis au réfrigérateur, dans un flacon brun, se conserve longtemps.

b - Mode opératoire du dosage

8 ml du réactif précédent sont versés dans des tubes à essais qui sont ensuite placés à l'obscurité dans une étuve réglée à 40°C. Lorsque le réactif est à la température de l'étuve, on ajoute dans chaque tube :

- 1 ml de milieu de culture filtré sur papier puis sur bougie (afin d'éviter le trouble bactérien qui pourrait modifier la valeur de la lecture colorimétrique)
- 1 ml d'alcool éthylique (celui-ci augmentant la sensibilité du test)

On agite et on conserve de nouveau les tubes 20 minutes, à 40°C dans l'obscurité.

Pendant ce temps, on place le filtre de 530 millimicrons sur le colorimètre dont on allume la lampe au moins 15 minutes avant les mesures.

On règle l'aiguille sur le repère 100 de l'échelle des transmissions en utilisant un tube témoin renfermant :

- 8 ml de réactif
- 1 ml d'alcool éthylique
- et 1 ml de milieu de culture non ensemencé,

et dont le contenu a été placé dans des conditions identiques à celles décrites précédemment.

Une minute avant le temps convenable, on transfère les mélanges dans les tubes colorimétriques spéciaux et on exprime la lecture, par rapport au tube témoin, en pourcentage de transmission.

## 2) - Séparation par électrophorèse

### a - Conduite proprement dite de l'électrophorèse

La séparation par électrophorèse sur papier des dérivés indoliques a été étudiée par plusieurs auteurs ; citons notamment Von Donffer ( 1 ) Fischer et Guern ( 11 ) auxquels nous avons emprunté la méthode suivante :

Le mélange à séparer est déposé au centre (ou à une extrémité qui sera placée à la cathode) de bandes de papier maintenues par un cadre de matière plastique et dont les extrémités baignent dans des chambres contenant une solution tampon, où plongent dans l'une, l'anode, dans l'autre, la cathode. (planche II)

Les bandes de papier, du type Whatmann n° 1, ont pour dimensions 30 cm x 4 cm ; les chambres sont remplies par une solution tampon de Sørensen de pH7 dont la composition est :

- PO4 K H2 (M/15) ..... 4 parties
- PO4 Na2 H (M/15) ..... 6 parties

La tension appliquée aux électrodes est de l'ordre de 110 volts et l'analyse peut durer 8 à 12 heures.

Les milieux de culture à étudier sont centrifugés pendant 15 minutes à 5.000 tours/mimute, et le liquide surnageant est concentré sous vide à 35°C jusqu'à un volume final de 2 à 3 ml. Quelques gouttes (environ 1/10 ml) de ce mélange à étudier sont déposées, à l'aide d'une pipette, au centre des bandes de papier et séchées immédiatement dans un courant d'air chaud (35°C).

On place alors les bandes ainsi préparées dans la cuve à électrophorèse, on laisse la solution tampon imprégner le papier et on fait passer le courant.

Remarque : les pigments, insolubles dans le tampon pH, ne migrent pas mais restent sur la ligne de départ où parfois ils gênent le début de la migration.

### b - Révélation des électrophorégrammes

Lorsque l'analyse électrophorétique est terminée, on laisse sécher et on révèle les composés séparés en pulvérisant sur les bandes de papier l'un des 3 réactifs chimiques suivants :

- Réactif 1 : Réactif de Salkowski modifié par Gordon et Weber (10)
  - Fe Cl<sub>3</sub>,6H<sub>2</sub> O (0,5M) ..... 2 ml
  - H ClO<sub>4</sub> (35 %) ..... 100 ml
- Réactif 2 : Réactif de Salkowski amélioré selon Pilet (20)
  - Fe Cl<sub>3</sub>,6H<sub>2</sub> O (1,5M) ..... 3 ml
  - H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> (1,84) ..... 60 ml
  - H<sub>2</sub> O distillée et déionisée 100ml
- Réactif 3 : Réactif nitroso-indolique (Linser et Kiermayer - 14)
  - K NO<sub>2</sub> ..... 1 g
  - H NO<sub>3</sub> (concentré) ..... 20 ml
  - Ethanol ..... 80 ml

### 3) - Test biologique

Afin de vérifier les résultats obtenus par la révélation directe des électrophorégrammes, nous avons été conduits à effectuer, à partir des différents milieux de culture, un test biologique.

### a - Extraction des substances indoliques des milieux de culture

Après centrifugation et concentration, les milieux de culture sont ajustés à un pH variant entre 2,8 et 3,0 avec une solution d'acide chlorhydrique (N) et on ajoute 100 ml d'éther dépourvu de toute trace de peroxyde. L'extraction se fait à 4° pendant un temps très court (2 à 3 heures) afin d'éviter toute modification des substances indoliques.

On sépare les 2 phases, puis l'extrait éthéré est concentré jusqu'à épuisement complet de l'éther et des 2 % d'eau fixés par celui-ci.

#### b - Séparation par électrophorèse et découpage des électrophorégrammes

Le résidu de concentration est ensuite repris par très peu d'éther (1 ml en plus) dont 0,2 ml sont soumis à une électrophorèse à pH7 dans les conditions décrites précédemment.

Après séchage, les bandes de papier sont découpées en rectangles de 1 cm de largeur à partir de la tache initiale. Chaque rectangle est placé dans un petit cristalliseur contenant 2 ml d'eau distillée et déionisée.

#### c - Dosage biologique

Il s'agit ici d'un test d'allongement de coléoptiles de blé étiolés. Après avoir consulté de nombreux travaux (A.2.3.4.7.10) concernant la réalisation de ces tests, nous avons adopté la méthode ci-après :

Les grains de blé sont mis à tremper 3 heures dans de l'eau ordinaire puis prétraités par le froid (+ 4°C pendant 8 jours) sur du coton humidifié. Ils sont ensuite repiqués sur du coton humide dans des boîtes de Pétri. Celles-ci sont placées en position inclinée dans une cellule de culture, à la température de 23°C, d'abord en lumière rouge pendant 24 heures, puis à l'obscurité. Lorsque les coléoptiles ont atteint 15 à 20 mm de longueur, ils sont détachés les uns après les autres avec une paire de ciseaux et jetés dans un récipient



rempli d'eau. Ensuite, ils sont pris un à un et on prélève, en éliminant les 3 mm du sommet, une section de 0,5 cm à l'aide d'un instrument fait de deux lames de rasoir parallèles et distantes de 5 mm. A mesure que l'on détache les fragments, on les laisse tomber et séjourner pendant 3 heures dans un flacon contenant une solution de sulfate de manganèse à 1 ‰, ce qui a pour effet d'accroître la réponse à l'ABIA (Nitsch.16). Seuls les tronçons qui flottent, sont employés, Bentley (2) ayant montré que ceux qui tombent au fond s'allongent moins que ceux qui surnagent. Dix sections de coléoptiles sont mises dans chaque cuve dont nous avons parlé ci-dessus, en B, et qui contient un rectangle de papier d'électrophorèse.

Un cristalliseur témoin reçoit :

- Un carré de papier non développé
- 2 cm<sup>3</sup> d'eau distillée et déionisée
- Et 10 sections de coléoptiles.

Les batteries de cuves sont placées dans une **étuve** saturée de vapeur d'eau, à 23°. Après 24 heures, les sections de coléoptiles sont placées sur des lames de verre utilisées en microscopie, et photographiées grandeur nature en macrophotographie, au rapport 1/1. Les mesures d'allongement se font après avoir agrandi 10 fois les photos.

### III - RESULTATS

=====

#### 1) - Dosage colorimétrique

##### a - Courbe de référence en fonction de la concentration

On établit la variation du pourcentage de transmission au colorimètre en fonction de diverses concentrations d'ABIA, la lecture étant toujours faite après le temps optimum de 20 minutes.

La courbe obtenue est une droite (planche III). Elle nous permettra de trouver aisément la concentration en ABIA connaissant l'extinction colorimétrique d'une solution ou d'un milieu de culture.

b - Résultats obtenus avec les milieux de culture

Les mesures ont été faites tous les 10 jours, jusqu'à 50 jours. Des essais préliminaires nous ayant montré qu'après cette période, la quantité d'ABIA n'augmente plus mais reste stationnaire encore 10 à 20 jours, et diminue progressivement (exemple de la souche 0, planche IV).

Les résultats ont été rassemblés dans les tableaux des planches V et VI.

On constate que :

- La plus grande quantité de substances auxiniques apparaît entre 40 et 50 jours ; à ce moment, la croissance est terminée. Ensuite ces substances subissent une destruction oxydative et se dégradent.

- Les souches productrices d'ABIA en fournissent un taux élevé : la courbe de référence indique des concentrations variant entre  $10^{-6}$  et  $10^{-4}$  (hyperauxinie).

La méthode colorimétrique est pratique, et permet d'évaluer rapidement la concentration d'un milieu en substance auxinique ; mais elle présente de sérieux inconvénients :

- Le réactif de Salkowski donne, outre une réaction avec l'ABIA, des colorations jaunes, roses ou brunes, avec la plupart des autres corps indoliques, d'où une erreur systématique dans l'estimation des résultats par cette méthode. Il faut d'ailleurs préciser que ces colorations, souvent faibles, influent peu sur la lecture de l'extinction au colorimètre, en comparaison de celle obtenue avec l'ABIA.

- Et surtout cette méthode ne fournit aucune indication quant à la nature chimique et les propriétés biologiques des autres composés formés, d'où l'emploi de 2 méthodes complémentaires à celle-ci :

- Une analyse par électrophorèse

- Et un test biologique.

2) - Résultats obtenus lors de l'analyse par électrophorèse

a - Identification des composés indoliques observés

La révélation chimique des électrophorégrammes fait apparaître plusieurs taches (planche VII) ; elles ont été caractérisées :

- par comparaison avec des témoins (réalisés avec des substances synthétiques)

- par leur distance de migration.

Par convention, les distances sont exprimées à partir de la ligne de dépôt ; elles sont précédées du signe + si la substance migre vers l'anode, du signe - si elle se dirige vers la cathode.

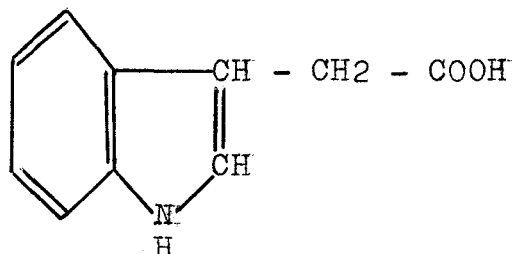
Les valeurs obtenues sont appelées grandeurs ionographiques. Dans le tableau de la planche VIII, nous indiquons les différentes valeurs données par Pilet (24) ; les nôtres, compte tenu des conditions de température, d'éclairage, et de temps, sont sensiblement identiques.

- par la couleur obtenue après pulvérisation avec les trois réactifs dont les compositions ont été définies précédemment, et qui donnent, pour chacune des substances indoliques, les couleurs indiquées dans le tableau de la planche IX

b - Souches productrices d'acide  $\beta$ -indolyl-acétique

L'ABIA migre vers l'anode (+ 12,5) ; Guern en (11) donne l'explication suivante :

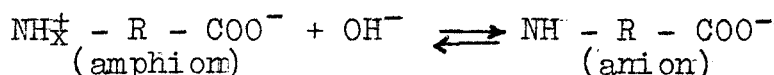
Cet acide a pour formule :



Sachant que le - NH du noyau pyrrole est une fonction faiblement basique et le - COOH de la chaîne est une

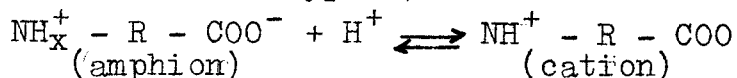
fonction acide, sa dissociation, en solution, est :

- En milieu alcalin (type 1)



Constante Ka  + HOH

- En milieu acide (type 2)



Constante Kb

Le point isoélectrique a pour formule :

$$\text{pHi} = 7 + \frac{\text{pKa} - \text{pKb}}{2}$$

A pH7, le pHi de l'ABIA est, selon Bonner (25), de 4,75 ; c'est donc la dissociation de type (1) qui prédomine, et l'anion  $\text{NH} - \text{R} - \text{COO}^-$  se déplace vers l'anode.

Pour chacune des 37 souches bactériennes, nous avons réalisé deux analyses électrophorétiques :

- La première après 15 jours de culture
- La seconde après 30 jours.

Les résultats après la seconde analyse sont groupés dans les tableaux de la planche X.

Il montre que :

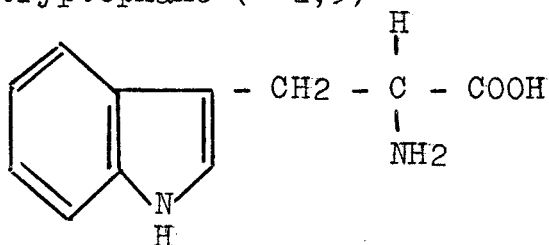
- 6 souches sont très productrices d'ABIA,
- 11 en produisent nettement,
- 8 ne donnent que des traces,
- 9 sont incapables, dans les conditions expérimentales, de synthétiser cette substance de croissance,
- 2 enfin, produisent de l'indole, et n'ont pas été étudiées (souches 8 et 16).

c - Mise en évidence de composés indoliques autres que l'ABIA

Outre l'ABIA, les souches 3, 6, 10, 18 et D, nous ont permis d'observer sur les électrophorogrammes quatre taches supplémentaires ; deux ont été facilement identifiées, elles

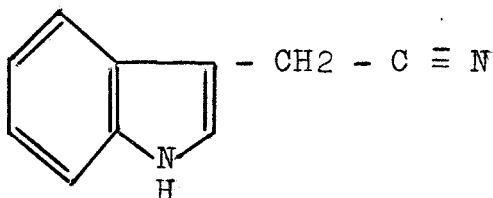
correspondent (planche VII):

- Au tryptophane (- 2,5)



Il possède deux fonctions basiques - NH<sub>2</sub> et - NH et une fonction acide - COOH ; son pHi étant de 6,8, il présente une faible prédominance de la dissociation acide à pH7, d'où un petit déplacement vers la cathode.

- A l'indolacétonitrile (+ 2,5)



Bien que cette substance soit considérée comme une auxine neutre, elle migre légèrement vers l'anode, et se comporte donc comme un acide très faible : ce fait est dû à ce que le groupement - C ≡ N induit des propriétés acides sur le groupement - CH<sub>2</sub> voisin.

La nature des corps formant les autres taches n'a pas pu être déterminée directement ; ces taches se situent :

- L'une au point de départ.

Notons qu'elle est difficile à voir nettement à cause des pigments bactériens qui ne migrent pas et restent au niveau de la tache initiale.

- L'autre s'étale à proximité de l'ABIA à la distance de migration de + 10.

Nous avons pensé qu'il s'agissait d'un mélange de plusieurs substances que nous avons essayé de séparer et d'identifier par une chromatographie ascendante.

Deux solvants différents ont été utilisés :

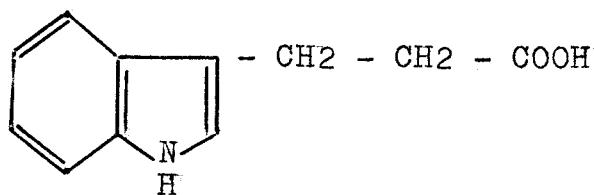
- l'eau
- et l'éthanol à 96°

Le développement des chromatogrammes est arrêté lorsque le front du solvant s'est déplacé de 25 cm.

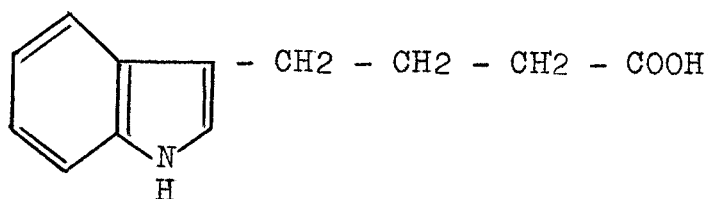
La révélation est conduite avec les mêmes réactifs que pour les électrophorégrammes.

C'est ainsi que nous avons pu caractériser quatre corps (planche XI) :

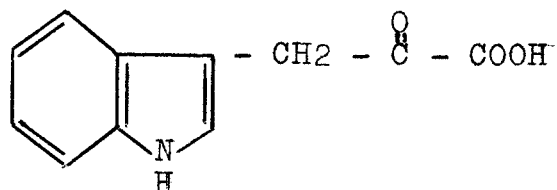
- l'acide  $\beta$ -indolyl-propionique (IPA)



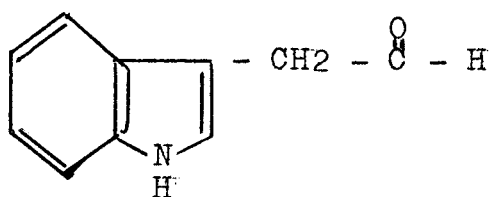
- l'acide  $\beta$ -indolyl-butyrique (IBA)



- l'acide  $\beta$ -indolyl-pyruvique (IPyA)



- la  $\beta$ -indolyl-acétaldéhyde (IAAla)



Si nous comparons les valeurs chromatographiques et ionographiques (planche XII) pour ces quatre composés, nous constatons que les migrations de l'IPA de l'IBA et de l'IA Ald sont identiques et qu'il est impossible de les séparer par électrophorèse, d'où la nécessité d'utiliser la chromatographie.

Ces résultats qui prouvent l'existence de composés indoliques posent évidemment le problème de savoir s'ils constituent les étapes d'une synthèse ou les produits d'une dégradation.

### 3) - Test biologique

Le test biologique a été réalisé pour les milieux correspondant aux souches 3, 6, 10, 18, D et K.

Quatre bandes, après avoir reçu 0,2 ml d'extrait étheré, sont soumises à l'électrophorèse. La première est révélée normalement avec le réactif de Salkowski pour donner la situation des différentes substances ; les trois autres servent au test biologique décrit au paragraphe précédent.

Le pourcentage de stimulation de la croissance des fragments de coléoptiles est calculé ainsi :

- Variation d'allongement du lot témoin (moyenne pour 30 sections)

$$T = tr - to$$

- Variation d'allongement des lots traités (idem)

$$L = lr - lo$$

- Pourcentage d'activation :

$$P \% = \frac{L - T}{T} \times 100$$

Les résultats sont pratiquement identiques pour toutes les souches étudiées. Nous donnons, à titre d'exemple, ceux obtenus avec la souche 18 (planche XIII).

L'examen du graphique montre l'existence de cinq substances promotrices de croissance :

- 1. substance neutre : l'indole-acétaldéhyde

- 4 substances acides :
  - . l'indole-acétonitrile
  - . un mélange correspondant à :
    - l'acide indolyl-butirique
    - l'acide indolyl-propionique
    - l'acide <sup>indolyl-</sup>pyruvique
  - . l'acide indolyl-acétique
  - . et enfin une substance qui correspond à une tache jaune verdâtre que nous avons d'abord confondue avec l'indole-acétonitrile.

#### 4) - Conclusions

Si nous considérons l'ensemble des résultats obtenus par ces trois méthodes, nous constatons que :

- 25 souches sur 36 sont capables de synthétiser de l'acide  $\beta$ -indolyl-acétique à partir du tryptophane et du pyruvate de sodium.
- Ces souches, tout au moins les plus productrices, peuvent produire l'ABIA selon trois voies de transformations (planche 14) les étapes intermédiaires étant constituées par :
  - l'acide  $\beta$ -indolyl-propionique et le  $\beta$ -indolyl-acétonitrile
  - les acides  $\beta$ -indolyl-propionique et  $\beta$ -indolyl-pyruvique
  - les acides  $\beta$ -indolyl-propionique et pyruvique, et la  $\beta$ -indolyl-acétaldéhyde

Par ailleurs, si l'on considère l'origine des souches examinées, tout végétal sollicité produit au moins une souche bactérienne apte à donner de l'ABIA.



## B) - PRODUCTION DE SUBSTANCES DE CROISSANCE NON INDOLIQUES

On sait que l'addition de gibberellines (Pilet 11.) réduit fortement la destruction "in vitro" de l'ABIA. Par ailleurs, l'application de gibberellines aux cultures de tissus de topinambour (Nitsch 17.) a pour conséquence une importante augmentation de la teneur en auxines (hyperauxinie).

Compte tenu de ces travaux et des résultats obtenus dans les nôtres, nous avons été amenés à penser que les bactéries étudiées précédemment, pouvaient également sécréter des substances gibberelliques dans les milieux de culture.

A cet effet, comme pour les substances indoliques, nous avons, là encore, mis en oeuvre trois méthodes de recherche, à savoir :

- Séparation par chromatographie
- Séparation par électrophorèse
- Essai biologique.

Les souches sont cultivées dans le même milieu que celui ayant servi à étudier la production des substances indoliques (milieu riche en tryptophane et en pyruvate de sodium). Après 20 ou 30 jours de culture, les bouillons sont soumis aux mêmes opérations de concentration et d'extraction que celles déjà décrites dans le premier chapitre de ce mémoire.

### I - SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

=====

#### 1) - Chromatographie proprement dite :

0,2 ml de l'extrait étheré sont déposés sur des bandes de papier Whatmann n° 1 (29 cm x 3 cm), à trois centimètres de l'un des bords.

Les bandes séchées sont soumises à la chromatographie ascendante dans des tubes de gros diamètre (planche XV). Une bande de papier filtre, servant à saturer l'atmosphère, adhère à la paroi des tubes et plonge dans les 20 cm<sup>3</sup> de solvant qui en occupent le fond. Les bouchons, qui les ferment

hermétiquement, laissent passer un mince fil de fer terminé en crochet où l'on suspend les chromatogrammes, la tache initiale dirigée vers le bas. Ces chromatogrammes sont mis à "équilibrer" pendant 24 heures : on assure de cette manière la saturation de l'atmosphère du récipient, ce qui est essentiel pour éviter toute évaporation du solvant qui monte par capillarité dans les bandes de papier.

Ce laps de temps écoulé, on abaisse le fil de fer de façon à faire plonger la base du papier de quelques millimètres dans le solvant, et la séparation chromatographique commence. Lorsque le front du solvant s'est élevée de 25 centimètres à partir de la ligne de départ, ce qui demande 5 à 10 heures selon les conditions de température et la nature du solvant, on arrête la chromatographie.

Nous avons essayé trois mélanges différents comme solvants ( 23 ) :

- Acétate de butyle saturé d'eau (phase supérieure)
- Benzène/pyridine/ammoniaque (3-6-1)
- Butanol/acide acétique/eau (19-1-6)

## 2) - Révélation

Pour la mise en évidence des deux acides (acide B-indolyl-acétique et acide gibbérellique ou AGB) et des autres substances indoliques sur les chromatogrammes, nous avons employé deux réactifs :

- (11-11)  
- Le méthanol sulfurique à 3 % additionné de 0,05 % de perchlorure de fer. La pulvérisation est suivie d'un chauffage à 60°C pendant 5 minutes. L'ABIA donne une coloration violette, l'AGB présente une très faible coloration jaune légèrement brun-verdâtre.

Par ailleurs, nous avons utilisé également, après ce traitement, la recherche de l'acide

gibberellique en fluorescence ultra violette : les chromatogrammes sont examinés à 25 cm de la source d'UV et dans un plan perpendiculaire au faisceau lumineux. Dans ces conditions d'irradiation, on distingue nettement des zones bien limitées correspondant à des substances plus ou moins fluorescentes.

- Une solution de permanganate de potassium à 0,5% à laquelle on ajoute 1% de carbonate de sodium. L'ABIA et l'AGB donnent tous les deux une tache jaune ; il faut en marquer l' emplacement sitôt après la pulvérisation, car elles perdent rapidement leur netteté.

### 3) - Résultats

Avec le premier solvant, la distance qui sépare l'acide gibbèrellique de l'acide indolyl-acétique est très grande : le premier produit reste pour ainsi dire sur la ligne de départ ( $R_f = 0,1$ ) tandis que le second migre à l'autre extrémité ( $R_f = 0,8$ ). Mais ce mélange a l'inconvénient de laisser des trainées importantes derrière les taches des deux acides.

Avec le second mélange butanol/acide acétique/eau les  $R_f$  des deux acides sont pratiquement identiques (0,85).

Le solvant qui nous a donné les meilleurs résultats est le mélange : benzène/pyridine/ammoniaque ; les  $R_f$  sont proches, (AGB,  $R_f : 0,15$  - ABIA  $R_f : 0,25$ ) mais la séparation est très nette.

Nous n'avons effectué cette recherche, purement qualitative, que pour quatre souches :

La souche 2 a été retenue en raison de sa fréquence chez de nombreux végétaux, les souches 3,18 et D ont été analysées compte tenu de leur production très importante d'ABIA.

Nous avons pris pour témoin des bandes qui ont été réalisées en ajoutant à l'extrait éthéré à analyser, de l'AGB et de l'ABIA synthétiques. Nous sommes ainsi dans les meilleures conditions possibles pour apprécier les distances de migration expérimentale de ces deux substances.

Nous avons pu ainsi constater après développement des chromatogrammes dans le mélange benzène/pyridine/ammoniaque que les bandes correspondant aux souches 3 et D présentent notamment une tache fluorescente en lumière U.V. dont l'emplacement correspond à celui de l'AGB sur les bandes témoins.

## II - SEPARATION PAR ELECTROPHORESE

=====  
Nous avons tenté une séparation électrophorétique des deux acides. Elle est relativement facile sur des bandes témoins ; l'acide gibbérellique se présente comme un acide plus faible que l'ABIA et migre plus lentement vers l'anode (+ 2,5 à + 3). Nous voyons par conséquent que l'AGB migre dans une région très voisine de celle occupée par l'indole-acétonitrile et qu'il est difficile de les distinguer l'un de l'autre.

Or l'on sait que l'AGB est une substance qui induit aussi la **croissance** des coléoptiles ; ceci nous expliquerait le **raison** de la forte stimulation de croissance des coléoptiles de blé, observée pour cette zone de migration.

## III - ESSAI BIOLOGIQUE

=====  
Nous avons réalisé l'essai suivant :

Des pois nains de la variété "Annonay" sont plantés à raison de dix par pot sur du sable humide, après avoir trempé 12 heures dans de l'eau. Après 12 jours de culture, les pots dont les plantes montrent une croissance uniforme sont choisis pour le traitement.

On applique sur le sommet des jeunes plantules ou sur les premières vraies feuilles, deux gouttes :

- Soit d'extrait éthéré provenant du milieu de culture concentré

- Soit d'extrait alcoolique (l'extrait éthéré est évaporé totalement et le résidu est ensuite repris par un peu d'alcool).

huit jours après le traitement on mesure la hauteur totale des plantes.

Cet essai, réalisé avec la souche 18, a donné les résultats suivants : (Photo - p. xv)

- Témoin ..... : 9,8 cm
- Extrait éthéré ..... : 13,2 cm
- Extrait alcoolique ... : 14,4 cm

(Les valeurs données ici correspondent à une moyenne de la hauteur totale des dix plantules).

Ce test est donné par Phinney et West (19) comme spécifique des gibberellines, l'ABIA et les autres corps indoliques n'ayant pas d'action sur les plantes naines.

Il semble donc que la stimulation de l'allongement des plantes naines soit due à une ou plusieurs gibbérellines et nous pouvons penser raisonnablement que de telles substances peuvent être synthétisées "in vitro" par des souches bactériennes isolées de tissus végétaux.

### C) - CONCLUSIONS GENERALES

De ces différents résultats, nous pouvons conclure que la plupart des souches étudiées sont capables de synthétiser "in vitro" des substances de croissance et notamment :

- a) de l'acide B-indolyl-acétique  
que nous avons caractérisé par trois méthodes différentes.
- b) des corps voisins de l'acide indolyl-acétique qui sont considérés comme des étapes de la synthèse de cette substance de croissance.
- c) des produits se rattachant aux gibbérellines.  
Ce point mériterait d'être plus amplement approfondi et étudié au point de vue des étapes qui y conduisent.

Ces résultats obtenus "in vitro", nous le soulignons, montrent <sup>le rôle</sup> que les bactéries peuvent tenir, par leurs sécrétions, dans le métabolisme végétal. En effet le tryptophane et le pyruvate sont des substances courantes chez les végétaux supérieurs, et il n'est pas impossible que les microorganismes puissent effectuer "in vivo" les mêmes synthèses que celles dont nous rendons compte "in vitro".

Il semble donc que l'hypothèse rappelée dans l'introduction de la participation des bactéries au métabolisme des plantes hôtes, puisse encore être envisagée comme vraisemblable.

## BIBLIOGRAPHIE.

1. ARNAL et GEBHARDT.  
Croissance de segments de coléoptiles de blé dans l'eau et dans l'acide indole-acétique.  
Rev. gen. de bot. 1955. t62. p597.
2. BENTLEY.  
An examination of a method of auxin essay using the growth of isolated sections of avena coleoptiles in test solutions  
Journ. exp. of bot. 1950. t1. p201.
3. BENTLEY et HOUSLEY.  
Growth of avena coleoptile sections in solutions of 3-indolylacetic acid and 3-indolyl-acetonitrile.  
Phys. Plant. 1954. t. p4.
4. BENTLEY et HOUSLEY.  
Bio-essay of plant growth hormones.  
Phys. Plant. 1954. t7. p405.
5. BERTHELOT et AMOUREUX.  
Sur la formation d'acide indole-3-acétique dans l'action de bacterium tumefaciens sur le tryptophane.  
C.R. Acad. Sc. 1938. t206. p537.
6. BERTHELOT.  
Bull. soc. chim. biol. 1934 -t16. p1553.
7. BITANCOURT.  
Recherches physiologiques sur les auxines.  
Rev. gen. de Bot. 1955. t62. p498.
8. DENFFER (Von), BEHRENS et FISCHER.  
Papier electrophoretische Trennung von Indolderivaten aus Pflanzen Extrakten.  
Naturwiss. 1952- t39. p258.
9. DUBOIS  
Activité, répartition et évolution des bactéries présentes dans les tubercules sains de pomme de terre.  
DES. Fev 1962. Lille.
10. GORDON et WEBER.  
Colorimetric estimation of indoleacetic acid.  
Plant. physiol. 1951. t26. p192.
- II. GUERN.  
Observations sur les méthodes de séparation et d'extraction des substances de croissance, à l'occasion de l'étude de la baie de Gui.  
Rev. gen. de bot. 1959. t66. p489.
12. KALLISTRATOS, PADVAL et PFAU.  
Über chemische Reaktionen der Gibberellensäure-Eigenschaften und wirkungen der Gibberelline.  
Springer Verlag. Berlin. 1962.

13. LAPERE.  
Isolément, caractère et détermination des bactéries vivant dans des organes végétaux  
D.E.S. Février 1963. Lille.
14. LINSER et KIERMAYER.  
Methoden zur Bestimmung Pflanzlicher Wuchsstoffe.  
Springer Verlag. 1957. p24.
15. NITSCH and NITSCH.  
The separation of natural plant growth substances by paper chromatography.  
Beitr. Biol. Pfl. 1955. t31. p387
16. NITSCH and NITSCH.  
Studies on the growth of coleoptile and first internode sections.  
Plant. physiol 1956. t94. p.111.
17. NITSCH.  
Travaux cités par Pilet: " Phytohormones de croissance."  
Masson.1961.
18. PESIN .  
Développement des bactéries dans les tissus des tubercules de pomme de terre après différents traitements levant la dormance.  
D.E.S. Février 1962. Lille
19. PHINNEY et WEST.  
Gibberellins and plant growth. Handbuch der Pflanzenphysiologie-Ruhland  
Springer Verlag. Berlin. 1961.
20. PILET.  
Dosage photolorimétrique de l'acide indolylacétique. Application à l'étude des auxines-oxydases.  
Rev. gen. de bot. 1957. t64. p406.
21. PILET.  
Les phytohormones de croissance.  
Masson. Paris 1961.
22. RAPPAPORT et SMITH.  
Gibberellins in the rest period of the potato tuber.  
Symposium 1962. Springer Verlag.
23. VANCURA.  
Detection of gibberellic acid in Azotobacter cultures.  
Nature. 1961. t192. p88.
24. YOUNG. (Mlle).  
Localisation et evolution des bacteries presentes dans les tissus de la pomme de terre, à différents stades de son développement.  
D.E.S. Mai 1962. Lille.
25. BONNER.  
The relation of hydrogen ions to the growth rate of the avena coleoptiles  
Protoplasma. 1934. t21 p406.
26. BLONDEAU.  
Contribution à l'étude des bactéries présentes dans la pomme de terre



# Souches bactériennes

Pl. 1

S	NOMS	ORIGINE
1	Bacillus cereus	Betterave - radis noir - navet - chicorée - Topinambour - céleri - carotte - blé - maïs - haricot.
2	Bacillus licheniformis	Betterave - radis noir - navet - chicorée - Topinambour - céleri - carotte - blé - maïs - haricot
3	Flavobacterium (sp)	Navet - Topinambour - chicorée - céleri - carotte
4	Protéus rettgeri	Betterave - radis noir - navet - chicorée.
5	non déterminée	Chicorée - céleri - carotte - haricot
6	Pseudomonas non pigmentée (sp)	Betterave - navet - carotte
7	Paracoli aeregenoides	Topinambour - carotte - maïs
8	Aerobacter cloaca	Radis noir - chicorée - céleri
9	non déterminée	Radis noir - maïs - haricot
10	Bacillus megatherium	navet - carotte
11	non déterminée	Céleri - carotte
12	non déterminée	Betterave - navet
13	Bacillus coagulans	Blé - haricot
14	Pseudomonas pigmentée (sp)	navet
15	non déterminée	carotte
16	Klebsiella aerogenes	chicorée
18	Pseudomonas non pigmentée (sp)	navet - maïs
19	non déterminée	maïs
20	non déterminée	Radis noir
21	non déterminée	Radis noir
22	non déterminée	navet

Souches bactériennes

Pl. 1 bis

S	NOMS	ORIGINE
A	<i>Achromobacter</i> (s.p.)	Pomme de terre
B	<i>Bacillus pumilus</i>	" " "
C	<i>Bacillus cereus</i>	" " "
D	<i>Sarcina</i> (s.p.)	" " "
E	<i>Bacillus</i> (s.p.)	" " "
F	<i>Bacillus</i> (s.p.)	" " "
G	<i>Bacillus polymyxa</i>	" " "
H	<i>Bacillus coagulans</i>	" " "
I	<i>Achromobacter</i> (s.p.)	" " "
J	<i>Bacillus</i> (s.p.)	" " "
K	<i>Bacillus licheniformis</i>	" " "
L	<i>Bacillus subtilis</i>	" " "
M	<i>Bacillus sphaericus</i>	" " "
N	<i>Bacillus cereus</i> variété <i>mycoides</i> (1)	" " "
O	<i>Bacillus cereus</i> variété <i>mycoides</i> (2)	" " "



Pl. 2

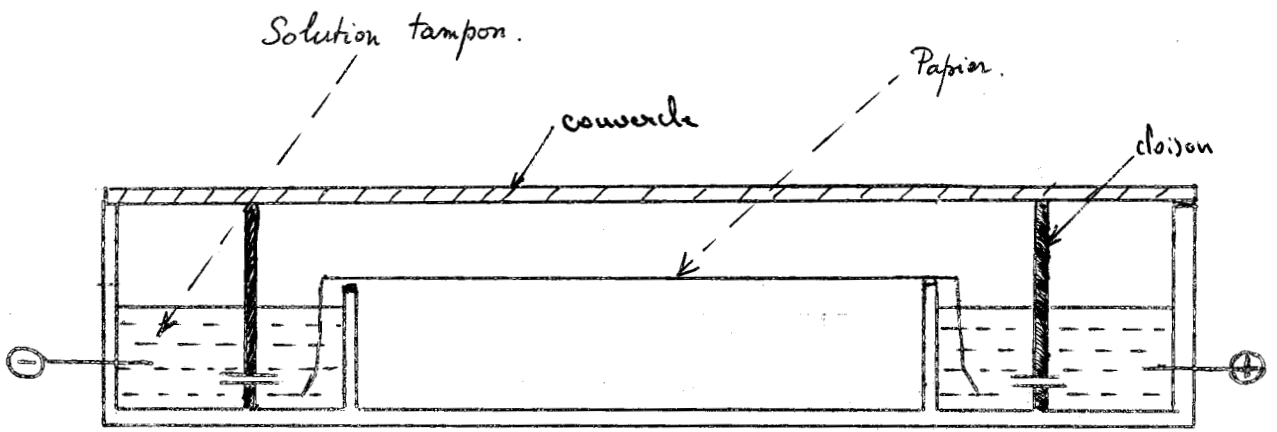
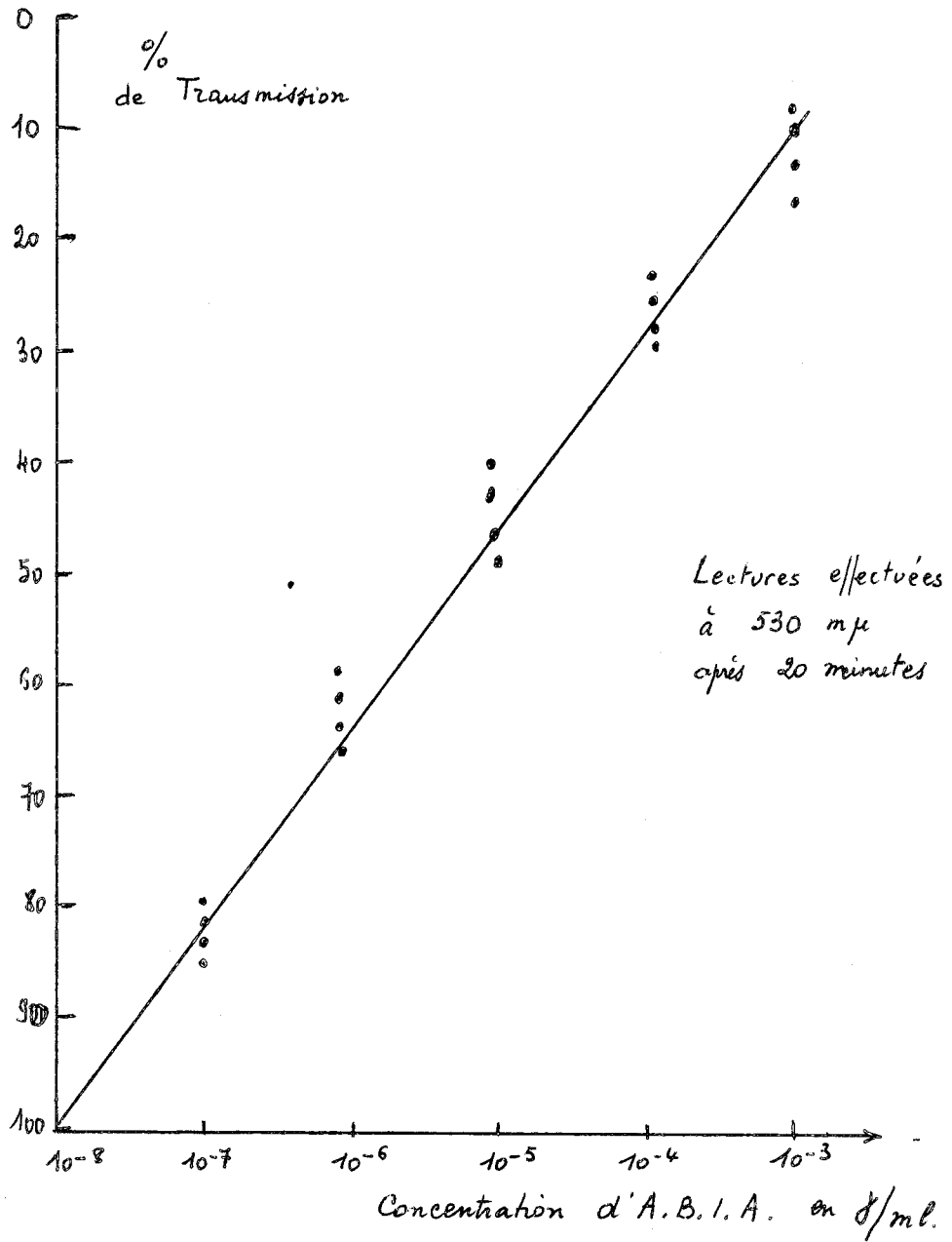


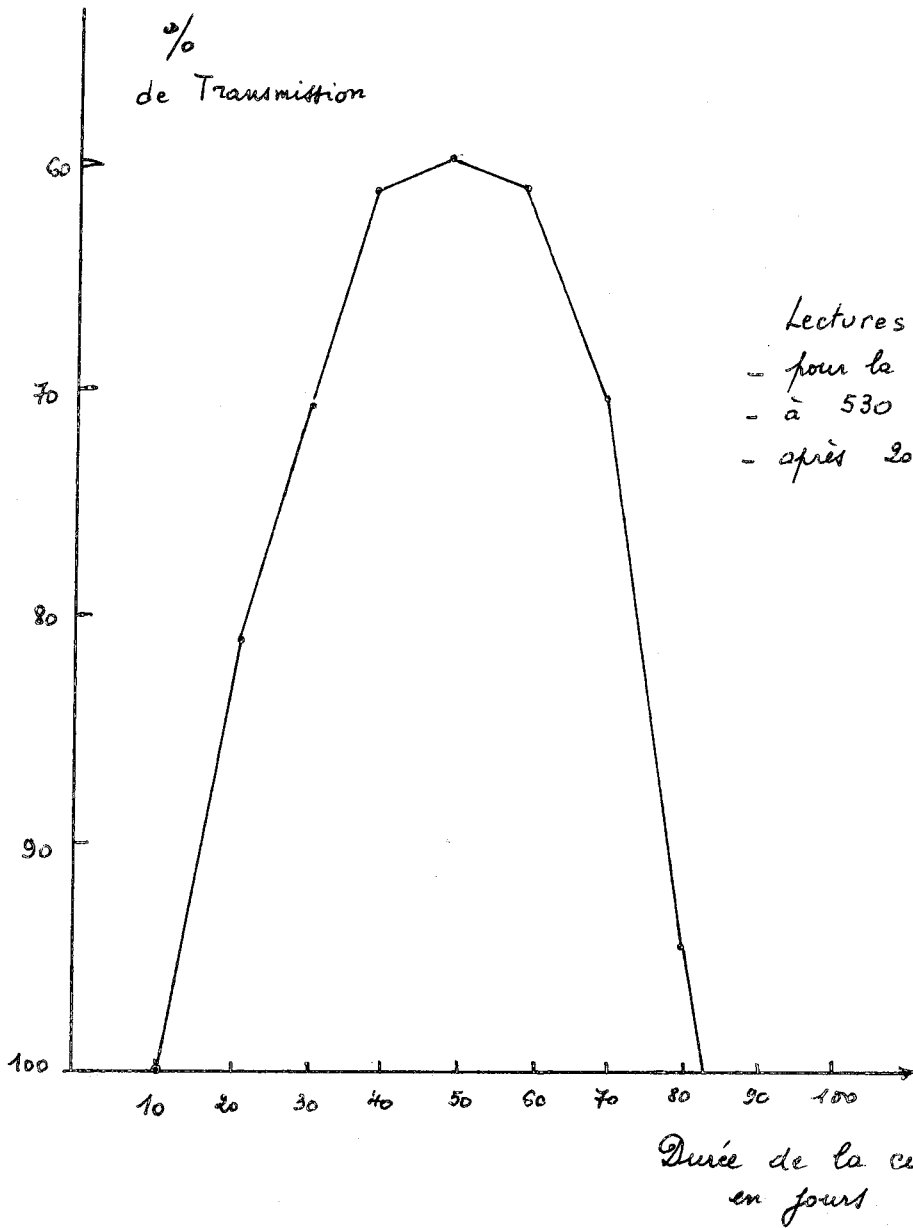
Schéma de la cuve  
à électrophorèse

PI 3



Courbe de référence colorimétrique





Evolution de la production d'A.B.I.A. en fonction de la prolongation de la culture



# Recherche colorimétrique de l'A.B.I.A. Pl. 5

Souches Bactériennes.	Exp/acidité Erabonississjan				
	105	205	305	405	505
1	100	98	94	92	90
2	100	84	78	74	70
3	60	50	44	40	34
4	86	80	70	64	60
5	98	94	88	84	80
6	100	80	64	60	56
7	94	80	76	70	64
8	68	60	48	40	36
9	100	84	78	70	64
10	100	60	32	30	24
11	96	72	70	60	50
12	100	84	80	76	74
13	100	96	90	80	76
14	50	50	96	90	80
15	70	66	60	56	50
16	70	60	44	38	34
18	70	40	36	32	28
19	100	84	68	62	56
20	96	80	70	64	58
21	92	84	70	60	56
22	100	80	64	52	50

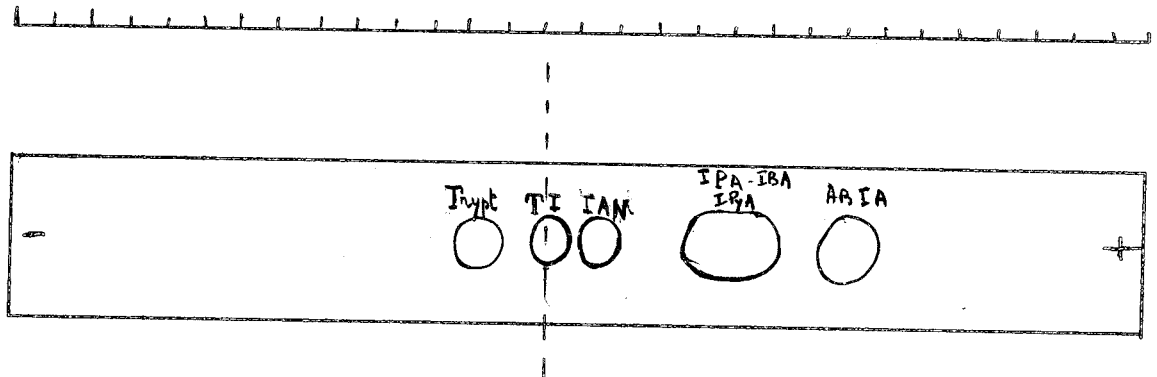


Recherche colorimétrique de l'A.B.I.A.

Pl. 6

Souches Bactériennes	% de transmission				
	10 J	20 J	30 J	40 J	50 J
A	100	98	90	88	86
B	84	76	72	70	68
C	88	68	62	58	54
D	90	72	54	52	50
E	100	94	90	88	84
F	96	78	70	70	68
G	98	76	68	68	66
H	100	80	76	72	68
I	100	92	84	80	78
J	100	98	90	84	80
K	88	76	60	44	40
L	96	80	64	50	44
M	100	96	76	56	40
N	100	90	82	72	66
O	100	82	72	64	60



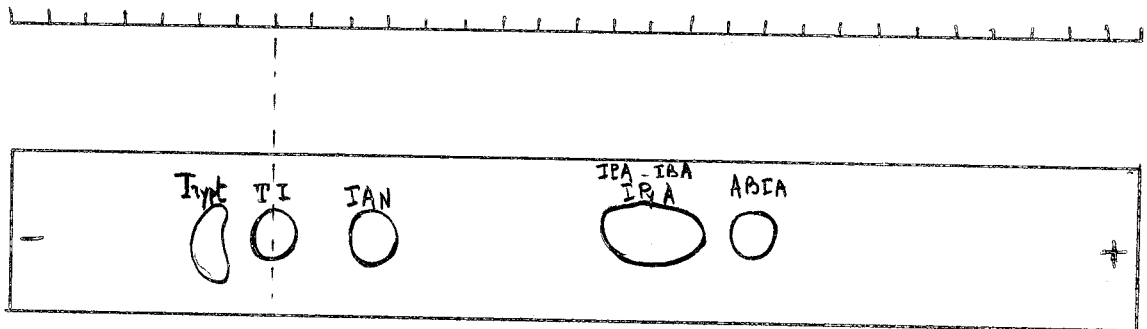


Tache initiale au centre

Conditions de l'électrophorèse :

8" - 110 Volts - 20° -

Echelle  $\frac{1}{2}$



Tache initiale à la cathode

Séparation des substances indoliques

par électrophorèse





Composés	Distance de migration à Ph 7.
Acide $\beta$ indolyle acétique A.B.I.A	+ 12,7
Tryptophane	- 2,5
Acide $\beta$ indolyle acétylène I.A.N.	+ 2,5
Acide $\beta$ indolyle propionique	+ 10,2
Acide $\beta$ indolyle butyrique	+ 10,2
Acide $\beta$ indolyle pyruvique	+ 10,2.

Tableau des valeurs ionographiques.

Électrophorèse 110 V. 8 H.



Composés	Réactif 1 Gordon et Weber	Réactif 2 Pilet.	Réactif 3 Linsen et Kiermayer
A.B.I.A	lie de vin	rose violet	rouge
Tryptophane	jaune	jaune-brun	jaune
$\beta$ Indolyl acétnitile	Bleu-vert	jaune vert	bleu
$\beta$ Indolyl acétaldéhyde	brun	brun	brun rouge
Acide $\beta$ Indolyl-propionique	roux-brun	roux-brun	jaune-orange
Acide $\beta$ Indolyl-butrique	brun	jaune-brun	jaune
Acide $\beta$ Indolyl-pyruvique	brun	brun	brun

Réactions colorées  
 de  
quelques composés indoliques



# PI 10

Souches	Production d'A.B.I.A.
1	0
2	+
3	+++
4	+
5	0
6	+++
7	+
8	indole
9	+
10	+++
11	++
12	0
13	0
14	0
15	++
16	indole
18	+++
19	++
20	++
21	++
22	++

Souches	Production d'A.B.I.A.
A	0
B	+
C	++
D	+++
E	0
F	+
G	+
H	+
I	0
J	0
K	+++
L	++
M	++
N	++
O	++

Conventions : 0 Pas d'A.B.I.A.

+ Traces

++ Production nette

+++ Souche très productrice

Production d'A.B.I.A. par les différentes souches :

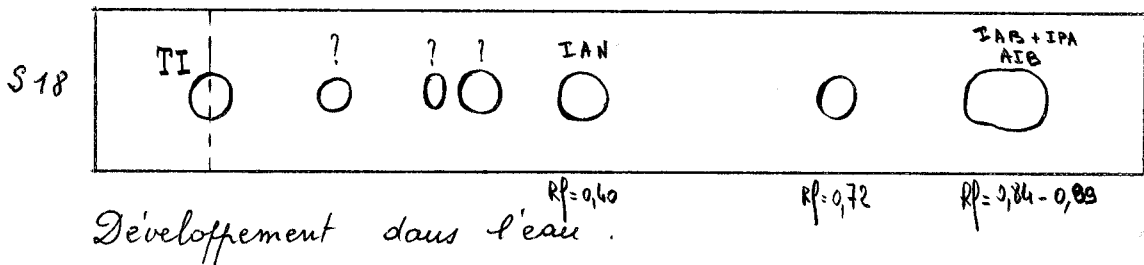
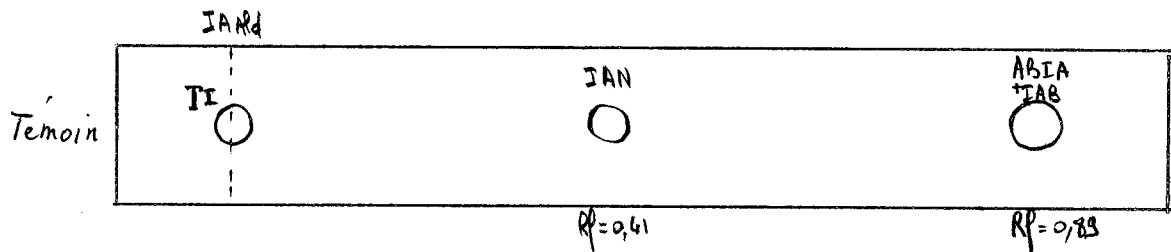
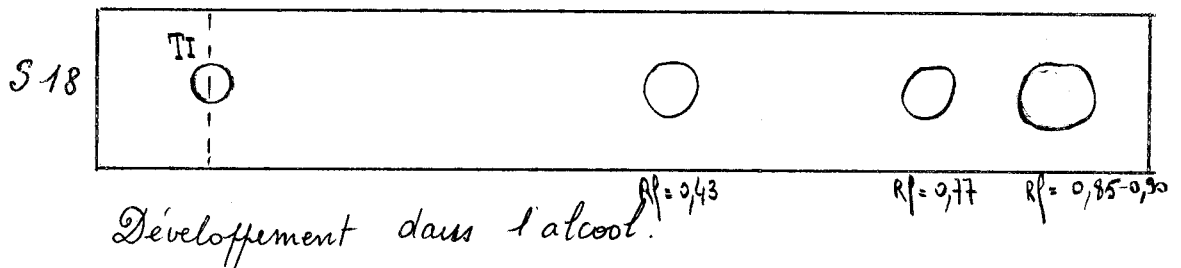
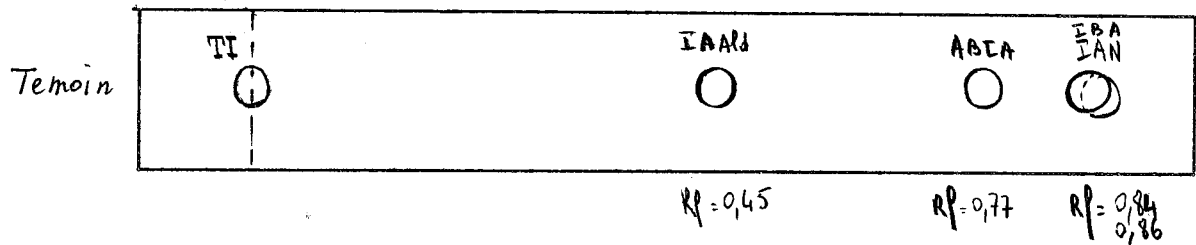
Séparation par électrophorèse



# Séparation chromatographique

Pl. 11

de composés indoliques autres que l'A.B.I.A.

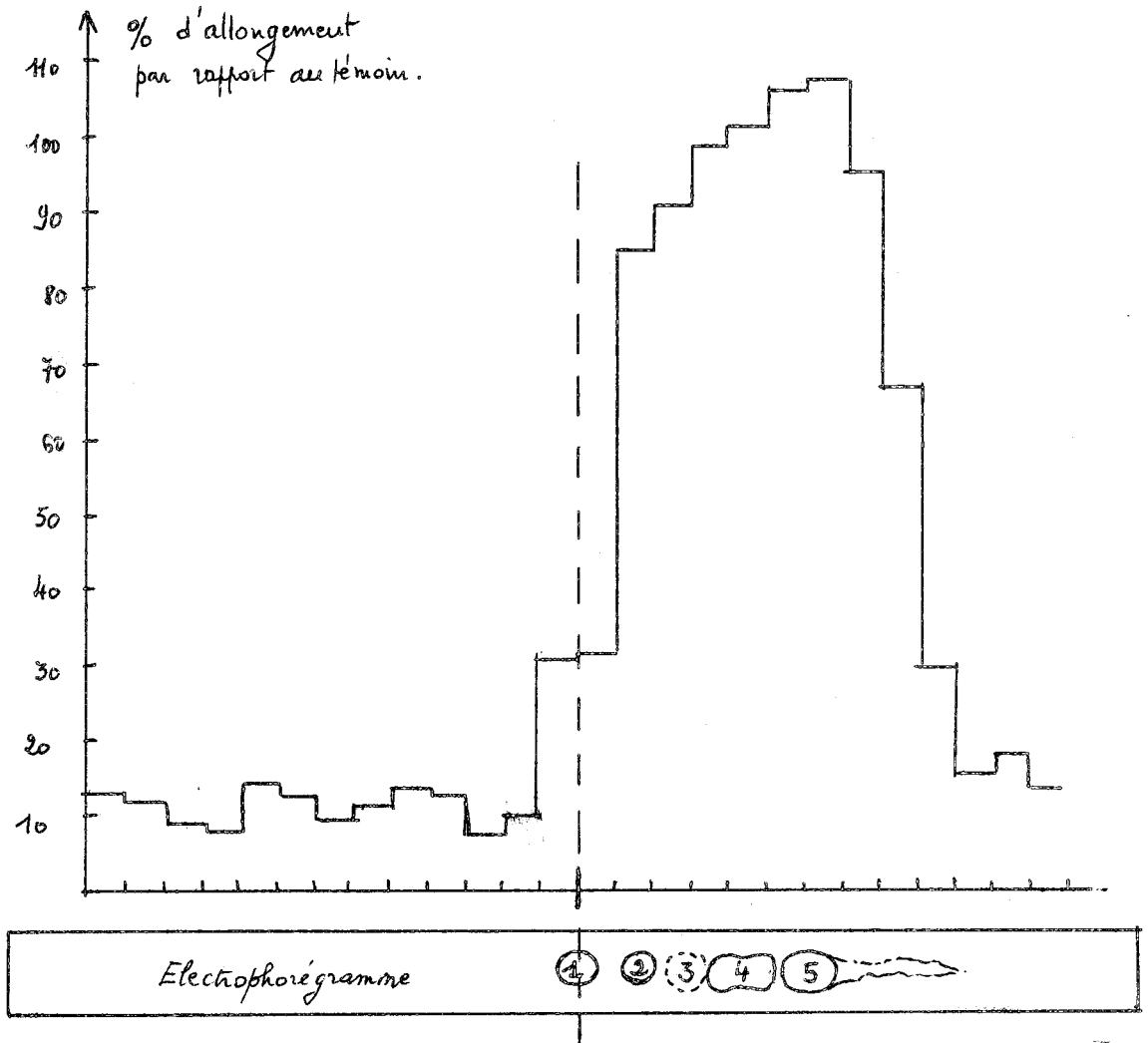


Composés	Migration à pH 7 électrophorèse	Rf éthanol chromatographie	Rf. eau
A. B. I. A	+ 12,7	0,77	0,89
Tryptophane	- 2,5		
Indole 3 Acétaldéhyde	ne migre pas	0,45	ne migre pas
Indole 3 Acétonitrile	+ 2,5	0,86	0,41
Acide $\beta$ Indolyle propionique	+ 10,2	0,91	0,85
Acide $\beta$ Indolyle butyrique	+ 10,2	0,84	0,89
Acide $\beta$ Indolyle pyruvique	+ 10,2	-	0,72

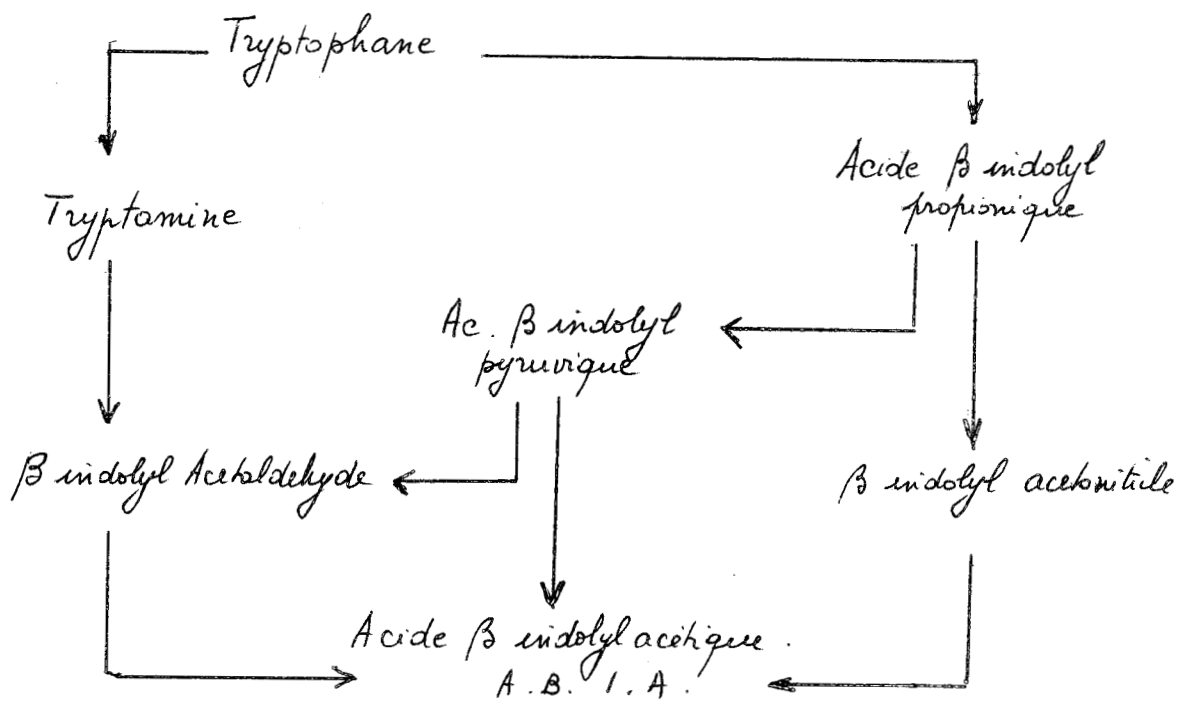
Comparaison des migrations des différents  
composés indoliques  
en électrophorèse et en chromatographie



- 1 Tache initiale ; I.A.Ald.
- 2 I.A.N.
- 3 ?
- 4 I.B.A. - I.P.A. - I.Ry.A.
- 5 A.B.I.A.



Test biologique : Allongement des cotéophyles de Blé'



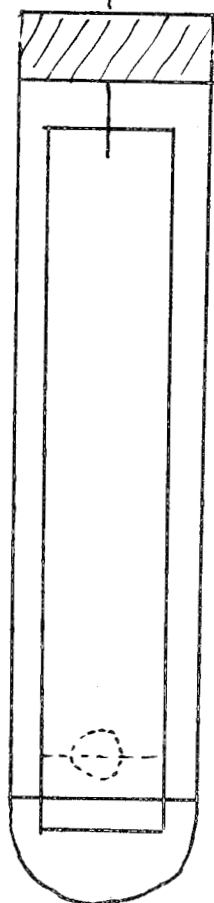
Etapes de la synthèse des  
différents composés indoliques.

d'après PILET

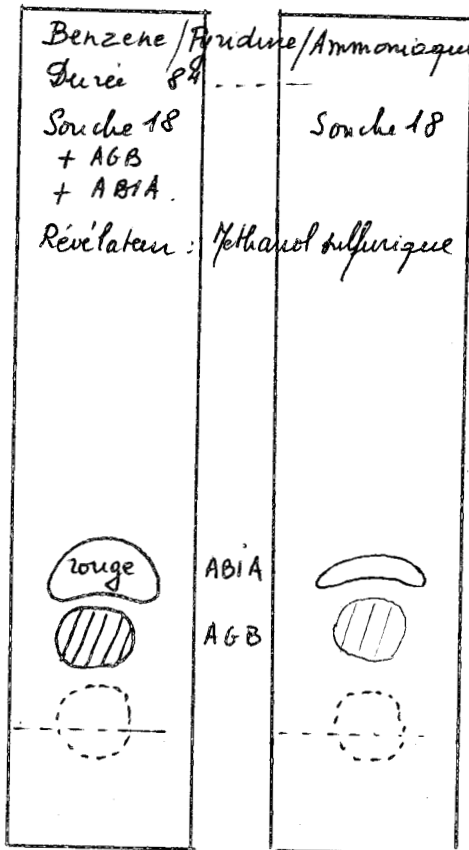


Chromatographie  
ascendante

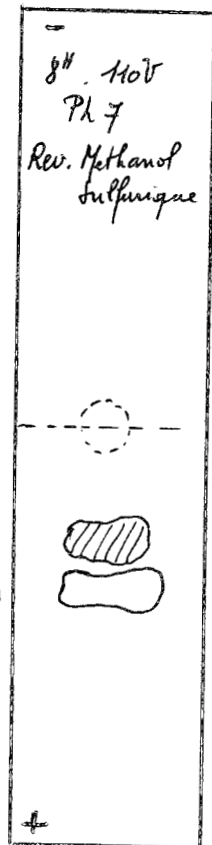
Pl. 15



Chromatogrammes



Electrophorese



Ⓜ fluorescence en U. V.

Mise en évidence de l'acide gibberellique



Test *Pisum sativum* var. "Amouray"

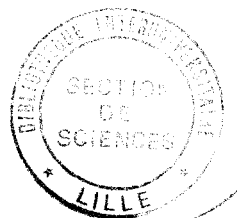


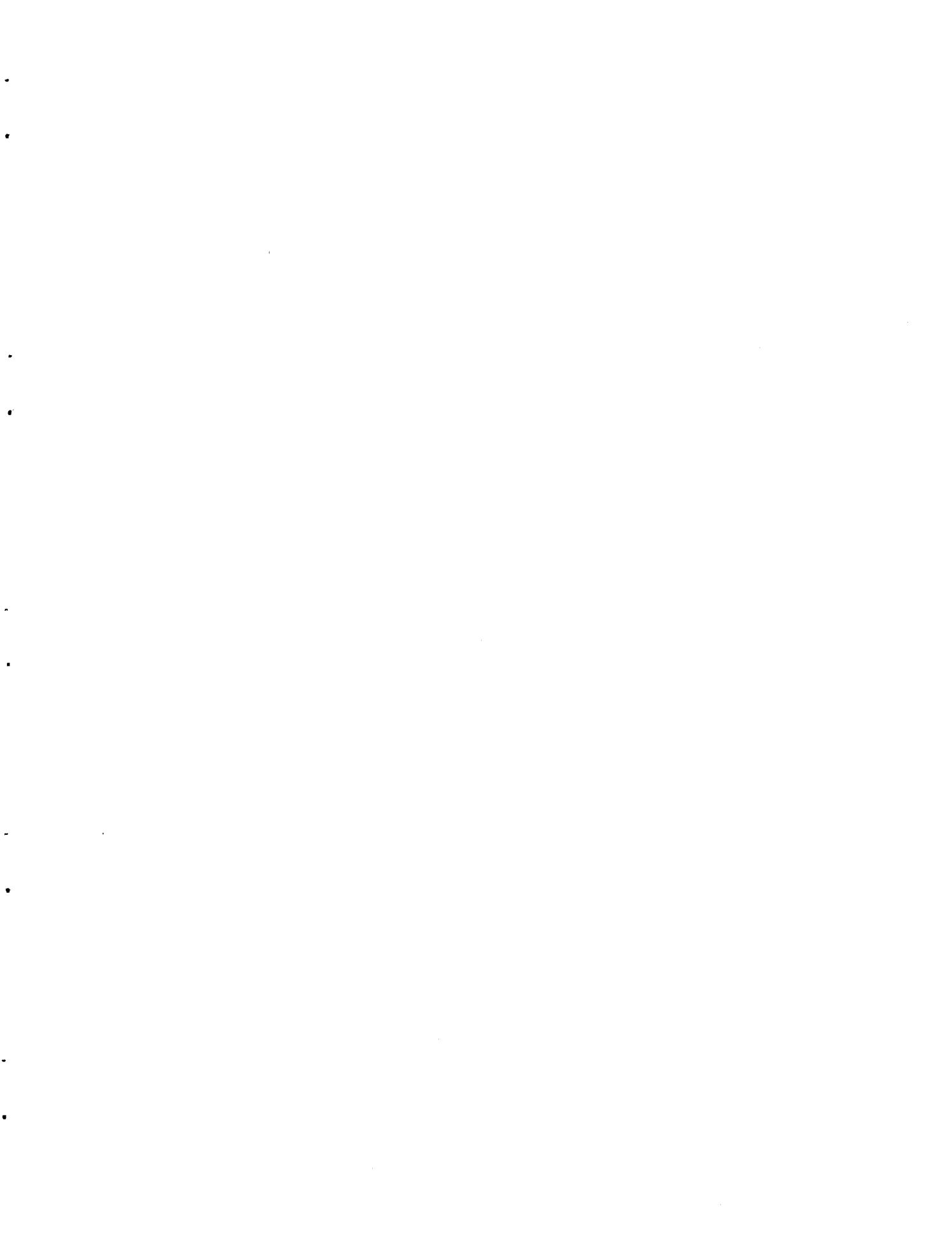


## TABLE DES MATIERES

	<u>pages</u>
Introduction .....	1
A - PRODUCTION DE SUBSTANCES DE CROISSANCE INDOLIQUES	2
I - MATERIEL .....	2
1) - Origine des souches bactériennes .....	2
2) - Milieux de culture .....	2
II - METHODES .....	3
1) - Recherche colorimétrique .....	4
a - Réactif .....	4
b - Mode opératoire du dosage .....	4
2) - Séparation par électrophorèse .....	5
a - Conduite proprement dite de l'électrophorèse .....	5
b - Révélation des électrophorégrammes	6
3) - Test biologique .....	6
a - Extraction des substances indoliques des milieux de culture .....	6
b - Séparation par électrophorèse et découpage des électrophorégrammes ....	7
c - Dosage biologique .....	7
III - RESULTATS .....	8
1) - Dosage colorimétrique .....	8
a - Courbe de référence en fonction de la concentration .....	8
b - Résultats obtenus avec les milieux de culture .....	9
2) - Résultats obtenus lors de l'analyse par électrophorèse .....	10
a - Identification des composés indoliques observés .....	10
b - Souches productrices d'acide B-indolyl-acétique .....	10
c - Mise en évidence de composés indoliques autres que l'ABIA .....	11
3) - Test biologique .....	14
4) - Conclusion .....	15

B) - PRODUCTION DE SUBSTANCES DE CROISSANCE NON INDOLIQUES .....	16
I - SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE .....	16
1) - Chromatographie proprement dite .....	16
2) - Révélation .....	17
3) - Résultats .....	18
II - SEPARATION PAR ELECTROPHORESE .....	19
III - ESSAI BIOLOGIQUE .....	19
C) - CONCLUSIONS GENERALES .....	21





109355M