

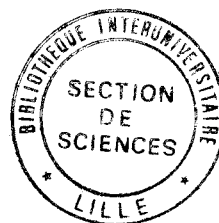
50376
1965
71

50376
1965
71

UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DES SCIENCES

Mémoire présenté en vue de l'obtention du

DIPLOME D'ÉTUDES SUPÉRIEURES
DE SCIENCES NATURELLES



Synthèse de Substances du
Groupe des Gibbérellines
par le *Bacillus licheniformis*

***Soutenu à Lille, en Décembre 1965
par Donat DUPUICH***

L'étude des substances de croissance (auxine, kinétine, gibbérellines) constitue une partie très importante de la Physiologie Végétale.

Dans ce cadre, la gibbérelline, bien que sa découverte remonte déjà à 1935 (YADUTA & SUMIKI) et qu'elle ait été longtemps délaissée, suscite aujourd'hui de plus en plus l'intérêt des Chercheurs. La connaissance de sa nature chimique et de ses propriétés physiologiques progresse rapidement.

La mise en évidence par les Japonais, les Britanniques, les Américains d'un certain nombre de gibbérellines fongiques différentes chimiquement et biologiquement fut une première étape.

Puis, WEST et PHINNEY (1959) chez *Phaseolus vulgaris*, MILAN et SUTTER (1961) chez *Phaseolus multiflorus*, KAWARADA et SUMIKI (1961) chez *Citrus unshiu*, KOSHIMIZU - IWAMURA - MITSUI et OGAVA (1963) dans les pousses de bambou, découvrirent que les végétaux supérieurs synthétisaient également des substances de type gibbérellinique. Ces travaux donnèrent aux recherches une nouvelle orientation : la gib-

bérelline fait partie des phénomènes normaux de la croissance chez les végétaux supérieurs. Certains auteurs envisagent même en ce domaine une interaction auxine-gibbérelline (GALSTON).

La présence de substances du type gibbérelline dans les tubercules de pommes de terre établie par HAYASHI-BLUMENTHAL-GOLDSCHMIDT et RAPPAPORT (1962) a été confirmée à la suite de travaux effectués au laboratoire (D.E.S. CHEMINAIS 1964)

Tenant compte du fait que les tissus tubérisés de la pomme de terre hébergent un certain nombre d'espèces bactériennes (MONTUELLE et BLONDEAU 1963 - MONTUELLE 1965), les travaux de CHEMINAIS (1964) eurent pour but de rechercher si elles pouvaient produire des substances de type gibbérelline. Utilisant la technique d'extraction de PHINNEY (1959), la chromatographie sur papier et le test Avoine, CHEMINAIS aboutit en 1964 à des résultats positifs.

Le travail qui nous a été confié avait pour but de vérifier tout d'abord ces premiers résultats et d'apporter ensuite plus de précisions en particulier sur :

- les aspects quantitatif et qualitatif de la production de gibbérelline.
- l'influence des substances introduites dans les milieux de culture.

Cette étude a été réalisée sur le *Bacillus licheniformis* qui avait été remarqué auparavant pour son in-

tense activité dans la production de gibbérelline.

L'isolement des gibbérellines à partir des milieux de culture a été conduit selon les méthodes déjà employées par CHEMINAIS (technique d'extraction de PHINNEY et chromatographie sur papier).

Les extraits obtenus ont été étudiés à l'aide de deux tests biologiques :

- 1) Le test Avoine qui avait déjà donné d'excellents résultats lors de la première étude. Nous avons tenu compte à ce sujet, des récentes mises au point de la technique effectuées dans nos laboratoires (MONTUELLE et DEERY 1965).
- 2) Le test Maïs nain (PHINNEY 1961).

On sait qu'il est possible de mettre fin au nanisme génétique de certains mutants nains du maïs par application de gibbérelline, les différentes variétés de mutants ayant la propriété de répondre différemment aux diverses gibbérellines. Ce test que nous avons employé pour la première fois au laboratoire, est particulièrement spécifique.

A l'aide de ces techniques, nous nous sommes proposés de préciser dans quelles conditions s'effectue la synthèse de ces substances :

- 1) En fonction de l'âge des cultures.
- 2) En fonction de la richesse du milieu de culture en tryptophane. Nous souhaitons ainsi déterminer si l'on peut

attribuer ou non au tryptophane un rôle particulier dans les différentes étapes de la synthèse de la gibbérelline.

M A T E R I E L E T T E C H N I Q U E S

A - PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE

1. Composition

Nous avons utilisé des milieux de culture liquides dont la composition de base est la suivante :

- Eau distillée.....	1000 ml
- $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$	0,75 g
- PO_4NH_2	0,75 g
- SO_4Ng	0,50 g
- $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	0,50 g
- Chlorhydrate de cystéine.....	0,02 g
- Tryptophane.....	0,50 g
- Pyruvate de sodium.....	2,50 g
- Glucose.....	2,50 g

On ajoute à cette solution : 12 gouttes de solution oligodynamique de BERTRAND et BERTHELOT, de composition :

- Eau distillée.....	1000 ml
- $(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2$	50,00 g
- $\text{SO}_4\text{Mn}, 7\text{H}_2\text{O}$	2,00 g
- $\text{SO}_4\text{Ca}, 2\text{H}_2\text{O}$	0,50 g
- $\text{Cl}_2\text{Ni}, 6\text{H}_2\text{O}$	0,05 g
- $\text{Cl}_2\text{Co}, 6\text{H}_2\text{O}$	0,05 g

- $(\text{SO}_4)_2 \text{Ti}_2$ 0,20 g
- $\text{SO}_4 \text{Zn}$, $7\text{H}_2\text{O}$ 0,10 g
- $\text{SO}_4 \text{Cu}$, $5\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g
- $\text{SO}_4 \text{Gl}$, $4\text{H}_2\text{O}$ 0,10 g
- Bo_3H_3 0,05 g
- $\text{SO}_4 \text{H}_2$ à 66° Bé..... 1 ml

Les milieux de culture sont ensuite stérilisés à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes. Ils sont prêts à être ensemencés.

2. Souche bactérienne utilisée

Notre étude a porté sur le *Bacillus licheniformis*.

Cette souche bactérienne fait partie de la collection du laboratoire et a été isolée de tissus sains de tubercules de pomme de terre (MONTUELLE et BLONDEAU 1963).

Ce sont des bâtonnets de 2 à 3 microns, Gram positif. Ils forment, sur des tranches de pomme de terre, un enduit plissé, épais, de coloration rosée. Sur milieu gélosé, ils donnent des colonies rugueuses, de grande taille, dont la coloration est rose au début, puis devient de plus en plus brunnâtre.

Nous avons choisi cette souche en raison des résultats obtenus lors d'une première étude (MONTUELLE et CHEMINAIS 1964). En effet, l'extrait de ce milieu bactérien, utilisé pour le test Avoine, avait donné les résultats les plus nets comparativement à *Bacillus pumilus* et à *Bacillus cereus*.

3. Ensemencement

Le milieu de culture est ensemencé avec le

Bacillus licheniformis, suivant les méthodes bactériologiques classiques. On place ensuite le milieu à l'étuve réglée à 37° C.

B - ISOLEMENT DE LA GIBBERELLINE

1. Extraction

Nous avons utilisé la méthode mise au point par WEST et PHINNEY (1959). Cette technique est, à part quelques modifications, la même que celle qui a été décrite et employée par CHEMINAIS (1964). Elle comporte 4 étapes que nous avons détaillées dans les planches I et II pages 8 et 9.

a) Centrifugation des milieux de culture :

Les milieux de culture sont centrifugés à 5.000 tours/mi-
nute pendant 20 minutes, puis ils sont filtrés.

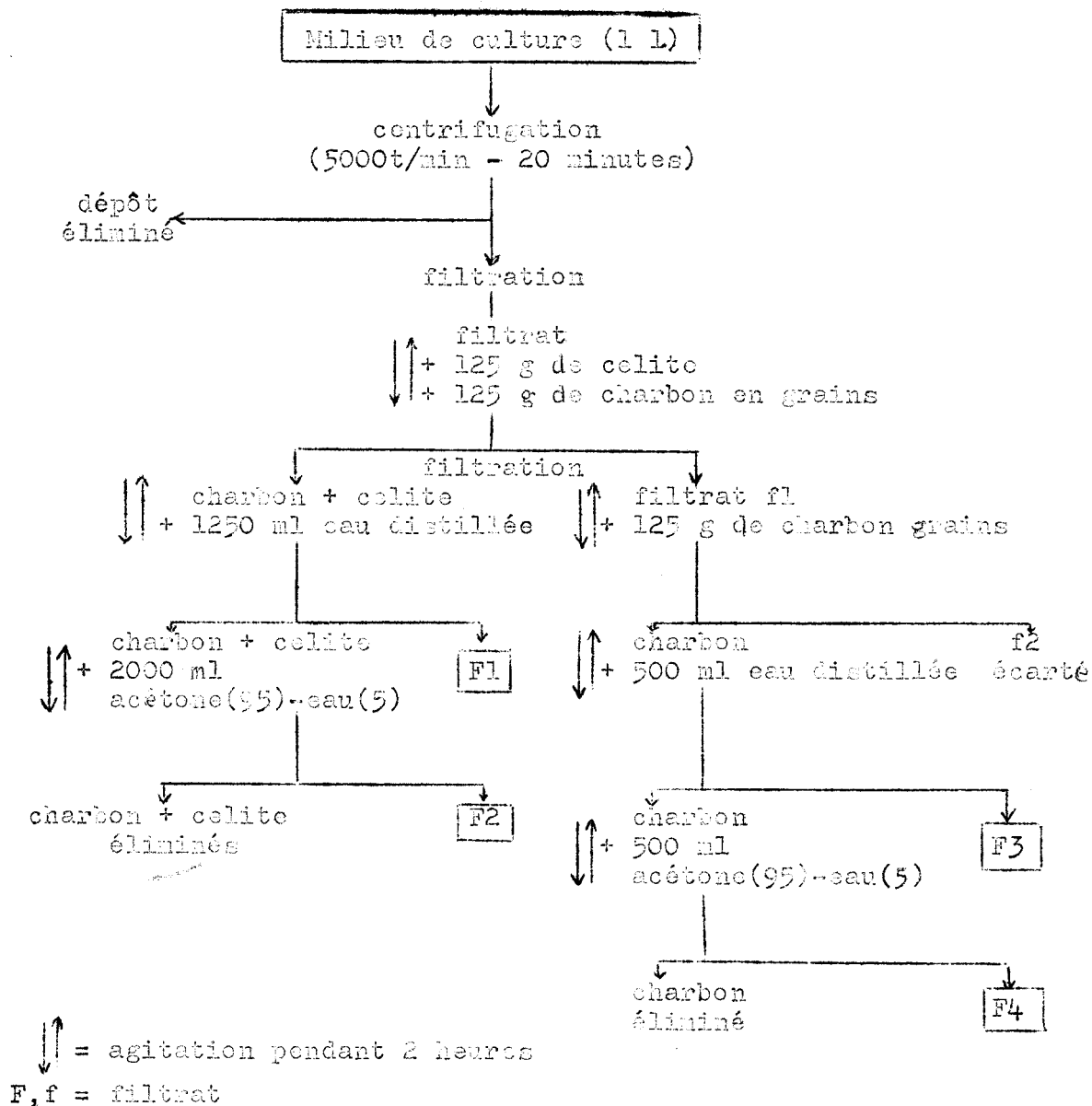
b) Adsorption - élution :

Pour l'adsorption, nous avons utilisé 125 g de charbon végétal activé en grains et 125 g de celite (Hyflo-super-cell) par litre de filtrat.

L'élution est faite à l'aide d'un mélange v/v acétone (95)-
eau (5). L'acétone technique dont nous disposions a été préalablement distillé afin d'éviter la présence de peroxydes. Après concentration sous vide des différents filtrats, on obtient 2 l d'une phase résiduelle très riche en eau.

c) Reprise par l'acétate d'éthyle :

Cette substance organique est le solvant électif des gib-
bérellines. La phase aqueuse est reprise par l'acétate d'éthy-



P L A N C H E N° I : SCHEMA DES DIVERSES OPERATIONS
 D'EXTRACTION DES GIBBERELLINES.

- Centrifugation
- Adsorption
- Elution.

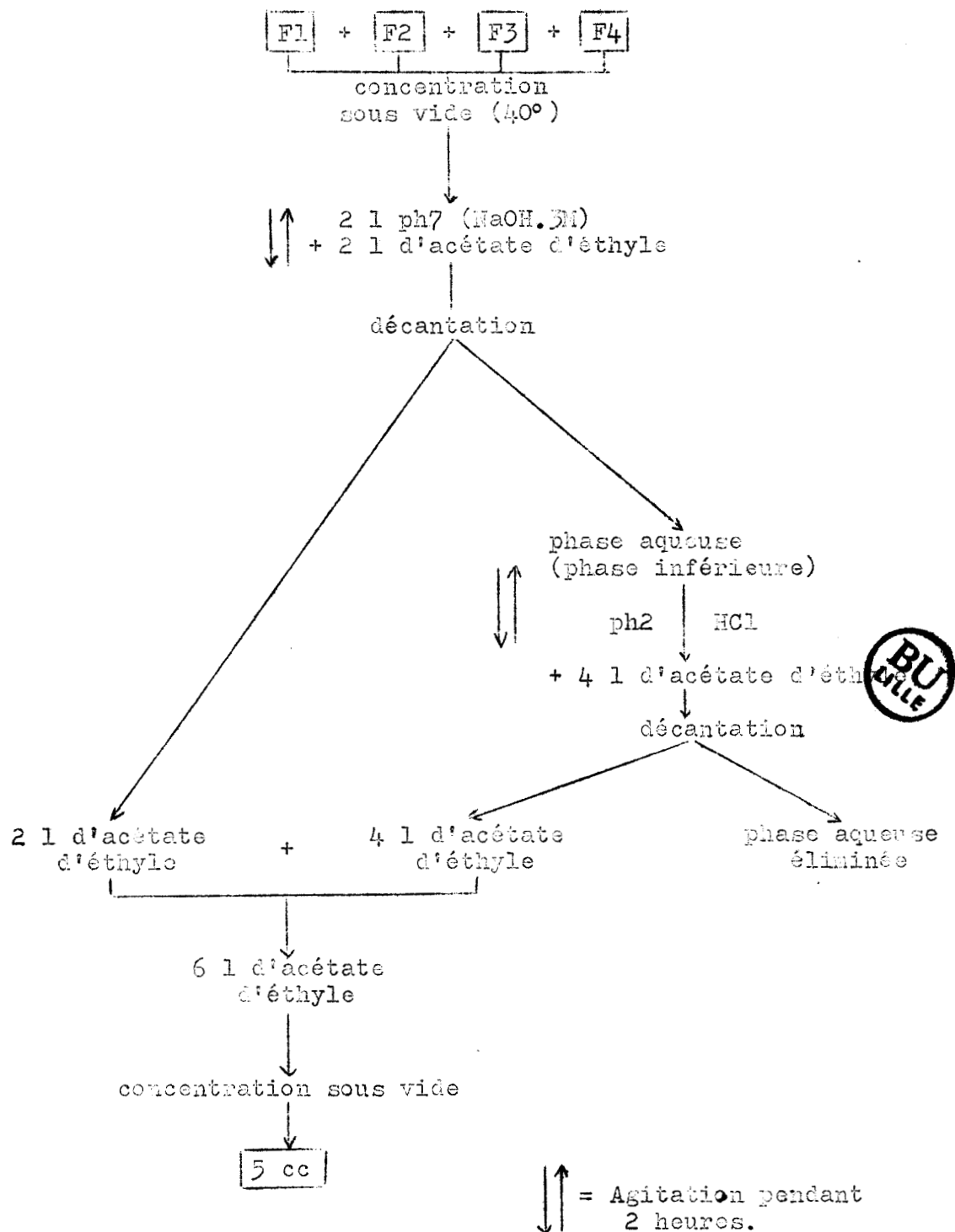


PLANCHE N° II : SCHEMA DES DIVERSES OPERATIONS
 d'EXTRACTION DES GIBBERELLINES (suite)

- Reprise par l'acétate d'éthyle.

le à deux pH différents (pH 7 puis pH 2) par agitation prolongée. L'acétate d'éthyle renfermant la gibbérelline en solution est récupéré chaque fois par décantation. Les deux fractions d'acétate d'éthyle correspondant aux deux pH sont ensuite réunies.

d) Concentration sous vide :

Les six litres d'acétate d'éthyle sont concentrés sous vide de façon à ramener le volume initial à 5 ml. Afin d'éviter les dégradations, la température ne dépasse pas 40° au cours de l'opération.

On obtient finalement un liquide de couleur brun-jaunâtre que l'on conserve à l'obscurité, à 4° C.

2. Chromatographie

L'extrait obtenu est susceptible de renfermer d'autres substances que les gibbérellines en solution dans l'acétate d'éthyle. La chromatographie ascendante va permettre d'isoler définitivement les substances que nous recherchons.

a) Matériel et produits utilisés :

On emploie des feuilles de papier Whatman n° 1 sur lesquelles on trace des bandes de 6 cm de largeur. Perpendiculairement à ces bandes, on délimite par deux traits parallèles :

- une ligne de départ du solvant.
- un front d'arrivée du solvant.

Ces deux limites sont distantes de 35 cm.

Nous avons employé le solvant qui, au laboratoire, a donné les meilleurs résultats jusqu'alors. Il s'agit du mélange (v/v) benzène (3), pyridine (6), ammoniacque (1).

La révélation des chromatogrammes est effectuée par pulvérisation sur le papier du mélange méthanol sulfurique à 3 % additionné de 0,05 % de perchlorure de fer (RAPPAPORT et SMITH 1962).

b) Méthode :

A l'aide d'une pipette graduée de grande précision, on réalise au niveau de la ligne de départ, au milieu de chacune des bandes, des taches de 0,1 ml de solution. On procède en plusieurs fois et en activant l'évaporation du solvant par un courant d'air tiède dirigé sur le papier. Outre ces dépôts d'extrait, on réalise également des taches de solution d'acide gibbéréllique à 10^{-3} qui serviront de témoins (planche n° III page 12).

Les chromatogrammes sont alors placés dans une cuve à chromatographie en verre du type "Shandon" renfermant l'éluant. Après avoir laissé le papier se saturer au contact des vapeurs de la cuve pendant quelques heures, on procède à l'élution des chromatogrammes. A la température du laboratoire, cette opération demande environ 16 heures. La séparation est suffisante et le front du solvant se trouve à 35 cm de la ligne de départ. Les chromatogrammes sont ensuite retirés de la cuve et ventilés afin d'assurer l'évaporation complète du solvant. On découpe ensuite les bandes où ont été déposés les taches témoins (0,1 ml d'acide gibbéréllique à 10^{-3}). On pulvérise a-

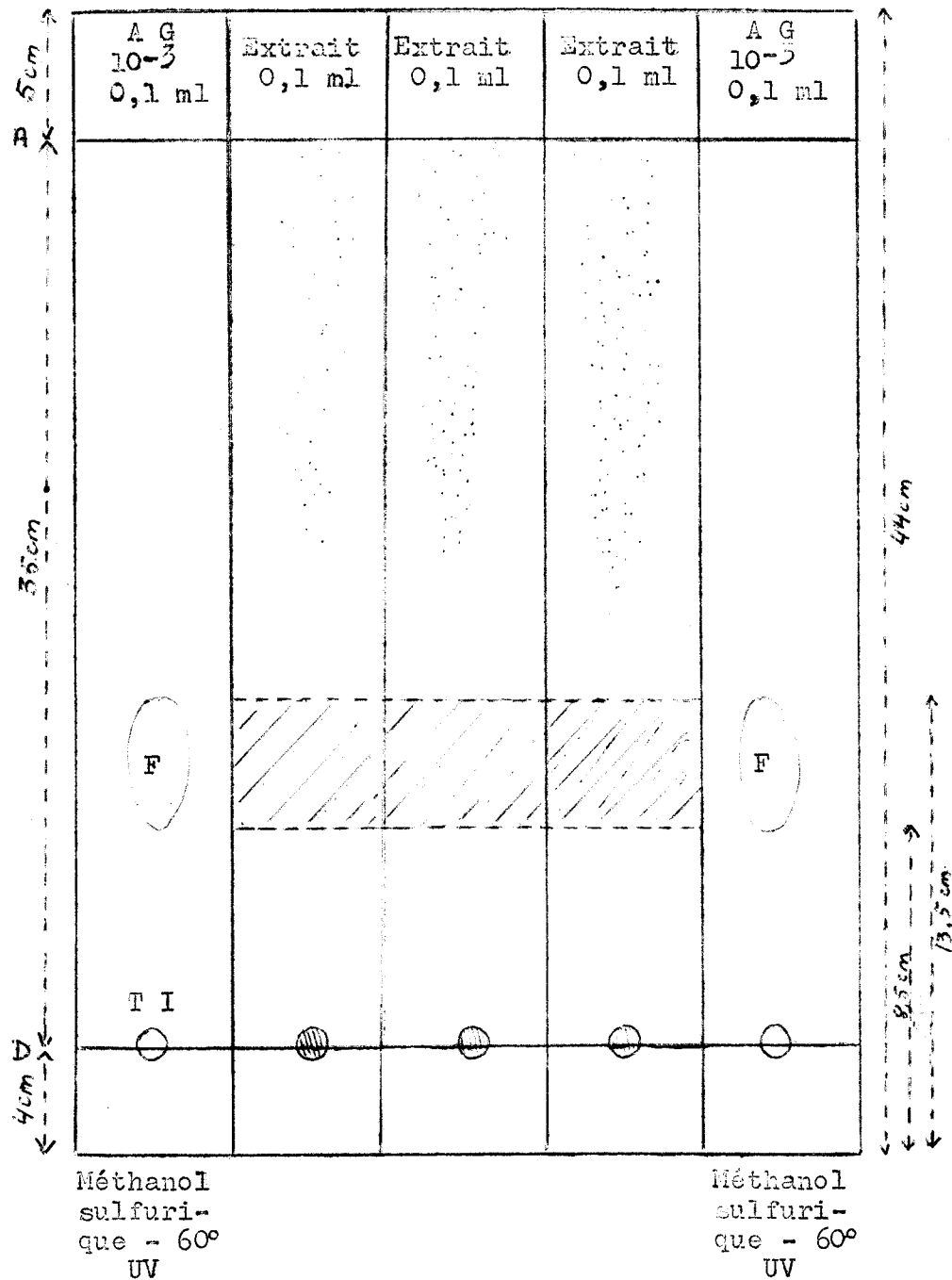


PLANCHE N° 3 : CHROMATOGRAPHIE ASCENDANTE

- F = fluorescence bleu-vert
 TI = tache initiale
 = traînée brune due aux pigments contenus dans l'extrait
 = partie du chromatogramme qui sera découpée
 A = arrivée du solvant
 D = départ du solvant

lors le liquide révélateur sur ces bandes. Cette pulvérisation est suivie d'un chauffage à l'étuve à 60° pendant 5 minutes. La gibbérelline n'apparaît que par observation à l'aide de la lumière ultra-violette émise par une lampe à main (Spectroline lamp SL 3660 long-wave). On peut observer dans ces conditions une tache fluorescente bleu-vert caractéristique. On délimite l'emplacement de celle-ci au crayon noir. Sur les bandes non révélées où a été déposé l'extrait, on peut alors déterminer, par comparaison avec les bandes témoins, les limites entre lesquelles s'est effectuée la migration des substances du type gibbérelline (voir planche n° III page 12).

C'est la portion de papier comprise entre ces limites qui sera utilisée lors des différents tests biologiques.

C - TESTS BIOLOGIQUES

1. Principe :

Il n'existe actuellement aucune méthode physique ou chimique pour doser l'acide gibbérellique. Seuls les tests biologiques sont applicables. Ils consistent en la mesure d'allongements d'organes végétaux aériens dont la croissance est fonction de la quantité de gibbérelline appliquée. Ces tests portent le nom du végétal utilisé.

De nombreuses recherches ont été faites dans ce domaine afin de trouver le test qui soit à la fois :

- facile et commode à réaliser en laboratoire
- rapidement obtenu
- spécifique de la gibbérelline, sinon des différentes substances de ce groupe
- sensible et aisément mesurable.

Nous avons relevé, à titre d'exemples, dans la littérature scientifique, les tests principaux suivants.

2. Les différents tests :

a) Le test topinambour :

Préconisé par JP. et C. NITSCH (1956), ce test consiste à prélever aseptiquement des petits cylindres de volumes et poids égaux (20 mg de poids frais) dans le parenchyme vasculaire du tubercule. Ces petits cylindres sont placés horizontalement sur un milieu minéral additionné de saccharose et de gélose. Ces tubes sont ensuite fermés hermétiquement. Suivant les cas, se produit ou non une prolifération de l'explantat. Il ne semble pas que ce test ait donné les résultats escomptés. Par contre, des cals normaux ont été obtenus avec l'acide indol acétique (JP. et C. NITSCH 1962).

b) Le test avoine ("Leaf section test")

C'est sans doute celui qui a donné les meilleurs résultats jusqu'alors. Il est basé sur l'élongation de la feuille renfermée dans les sections de mésocotyles placées au contact de solutions de gibbérellines. Il a été décrit par VAN OVERBEEK (1956) et par ROVICKA et KENTZER (1963). Une mise au point récente a été réalisée dans ce domaine visant à préciser la variété d'avoine à utiliser et les conditions opti-

males (température, composition de la solution tampon sucrée) (MONTUELLE et DEBRY 1965).

Ce test présente incontestablement un certain nombre d'avantages :

- spécificité à la gibbérelline (VAN OVERBEEK 1956)
- sensibilité à des concentrations très faibles, de l'ordre de 10^{-9} et même 10^{-10}
- rapidité de mise en oeuvre : les mesures peuvent être effectuées 48 heures après traitement des segments de mésocotyles.

c) Le test maïs nain :

Il a été mis au point par WEST et PHINNEY (1961). Il a pour origine les observations suivantes faites par cet auteur :
 "..... la croissance normale peut-être obtenue à partir de mutants nains du maïs, par addition d'acide gibbéréllique. Certains autres mutants ne montrent pas de réponse, ou tout au plus une toute petite à ce composé."

En effet l'acide gibbéréllique supprime le nanisme chez cinq mutants nains du maïs (dwarf 1, dwarf 2, dwarf 3, dwarf 5, et anther ear 1). Par contre, cinq autres mutants (nana 1, nana 2, dwarf 8, pe 1, mi 2) ne donnent qu'une réponse passagère qui cesse dès que l'on supprime l'apport d'acide gibbéréllique. Les premiers sont sous la dépendance d'un caractère récessif, les seconds d'un caractère dominant.

Jusqu'alors, aucun mutant nain n'avait pu être modifié, ni par les conditions physiques, ni par aucune substance chimique. Etant donné le non-allélisme, l'hypothèse d'un mécanis-

me biochimique contrôlant la croissance, en rapport avec certains gènes mutants, fut émise. Les gènes mutants bloqueraient une étape dans la synthèse d'une gibbérelline endogène. L'application d'une solution d'acide gibbéréllique convenable suffirait à supprimer ce phénomène.

Il fallait cependant vérifier la spécificité de ce test. La croissance des mutants nains du maïs a été étudiée après application d'autres substances que la gibbérélline telles que l'acide indol acétique, l'acide indol butyrique, l'acide naphtyl acétique, la linétine, de nombreux acides (PHINNEY 1961). Avec tous ces produits, aucune action comparable à celle de la gibbérélline n'a été obtenue sur les mutants nains du maïs. On a noté pourtant une augmentation de pourcentage d'acide indol acétique dans les plantes traitées avec la gibbérélline (BOUILLENNE et WALRAN). La gibbérélline pourrait agir dans ce cas comme inhibiteur de l'acide indol acétique oxydase (GORTNER 1958). Certains auteurs, (D.C. MAC CUNE et A.A. GALSTON 1959), pensent que le blocage de l'acide indol acétique oxydase par la gibbérélline, fait partie des phénomènes de croissance. Il a été montré que des variétés naines renferment plus de peroxydase que des variétés normales de même espèce (G.A. KAMERBECK 1956) .

Les différents mutants nains qui donnent une réponse avec l'acide gibbéréllique ont été testés avec les autres gibbéréllines actuellement connues. PHINNEY a d'abord étudié en 1961, l'activité des gibbéréllines A1, A2, A3. L'ordre d'activité était le suivant : A3 > A1 > A2. J.P. et C. NITSCH (1963) ont

étudié l'action de huit gibbérellines (A1, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9) sur les mutants d1, d3, d5. Ils constatent que l'ordre d'activité des gibbérellines est différent suivant les mutants. Cela laisse supposer qu'en choisissant le mutant le plus approprié on peut avoir une idée du type de gibbérelline auquel appartient une substance indéterminée.

Ce test apparaît donc comme étant parfaitement spécifique des gibbérellines. Le grand intérêt découle de la spécificité d'action des différentes gibbérellines sur les divers mutants nains.

d) Le test riz (Oriza sativa) :

La découverte des gibbérellines est intimement liée à cette plante. La forte élévation des plantes malades a servi de base à la recherche d'un test utilisant la feuille de riz. Ce test est actuellement l'objet de nombreux travaux.

Considérant toutes ces données nous avons été conduit à utiliser :

- le test avoine en raison surtout de sa grande sensibilité
- le test maïs nain pour sa spécificité toute particulière.

3. Les tests utilisés :

a) Le test avoine :

- élution des chromatogrammes :

On utilise des petits cristallisoirs de 5 cm de diamètre.

On y verse 2,5 ml de solution tampon sucrée et 4 gouttes de

Tween 20 à 0,05 %. Le Tween 20 est un agent mouillant qui facilite la dissolution des substances. On y dépose, après l'avoir découpée en petits fragments, la portion de chromatogramme renfermant les substances gibbéréliniques. Le cristallisateur, recouvert d'un verre de montre, est placé dans une boîte à tare, afin d'éviter toute évaporation. L'ensemble est placé à 4°C pendant 12 heures.

- choix de la variété d'avoine :

Jusqu'alors, ce test avait été réalisé avec la variété "Brighton", d'origine canadienne, qui convient parfaitement aussi aux dosages auxiniques. Mais, nous avons choisi la variété "Noire de Moyencourt" en raison des travaux préliminaires de MONTUELLE et DEBRY consacrés à la recherche d'une variété locale, facilement disponible et dont la réponse soit suffisamment sensible. Cependant, la durée de germination de cette variété est plus longue que pour la variété "Brighton". Les glumelles épaisses qui la protègent absorbent difficilement l'eau et gênent l'imbibition de la graine.

- germination :

Les caryopses sont mis à tremper pendant 2 heures dans une solution de Karathane Nov'hélione à 50 %, puis rincés à l'eau. Ce traitement a pour but de détruire les spores de Rhizopus et autres champignons qui accompagnent les caryopses et qui sont susceptibles de se développer lors de la germination. Les semences sont ensuite placées dans des boîtes de Pétri de grand diamètre renfermant de la perlite imbibée d'eau et recouverte d'un papier filtre. Ces boîtes, fermées, demeurent

pendant 5 jours à l'obscurité, dans une étuve réglée à 26°C. Les boîtes de Pétri sont ensuite mises à la température ambiante, à l'obscurité, et inclinées à 45° de façon à assurer une croissance rectiligne des plantules. Quatre jours plus tard, les coléoptiles mesurent 6 à 7 cm. Le noeud est situé au milieu de la pousse. L'avoine est alors prête à être utilisée.

- préparation des sections de feuilles :

On réalise des sections de 8 mm -(2 mm sous le noeud, 6 mm au dessus du noeud)- à l'aide d'un appareil constitué par deux lames de rasoir disposées parallèlement. Les segments sont lavés à l'eau distillée et placés à l'obscurité dans une étuve réglée à 26°C, pendant 2 heures. On prélève alors les segments présentant déjà une légère sortie de la feuille. Ils sont utilisés pour le test, les autres sont définitivement éliminés.

- préparation de la solution tampon sucrée :

Il s'agit d'un mélange renfermant :

PO ₄ HNa ₂	à 0,02 M.....	20 ml
PO ₄ H ₂ K	à 0,02 M.....	40 ml
Eau distillée.....		20 ml
Saccharose.....		1,6 g

On obtient une solution à pH 6 et une concentration en sucre de 2 %.

- le test proprement dit :

Les fragments de chromatogrammes élués sont égouttés sous pression afin de faire passer toutes les substances dans la

solution tampon sucrée contenue dans le cristalliseur. On dispose dans chacun d'eux un disque en matière plastique percé de trous dont les diamètres correspondent à celui d'un segment de coléoptile. On plante ainsi verticalement quinze segments de façon que leur partie inférieure plonge jusqu'au noeud dans la solution étudiée. Cette méthode présente deux avantages :

- a) la partie supérieure du mesocotyle n'est pas immergée, ce qui permet la respiration des tissus et l'allongement de la feuille dans des conditions normales.
- b) ceci élimine l'emploi d'une substance telle que la perlite comme support et simplifie par conséquent, à notre grès, la manipulation.

Les cristalliseurs sont ensuite placés dans un couvercle de boîte de Pétri renfermant un peu d'eau et recouverts par un bécher. L'ensemble, schématisé sur la figure n° I page 21, est finalement placé à l'obscurité pendant 48 heures dans une étuve réglée à 26°C.

- mesures et établissement des courbes standard :

L'allongement de chacune des feuilles d'avoine est évalué par mesure sur papier millimétré. On effectue quinze mesures et calcule une moyenne. Chacune d'elles est portée sur un graphique où sont notés :

- a) en abscisse, les données correspondant à chaque solution testée.
- b) en ordonnée, les moyennes des allongements foliaires en mm.

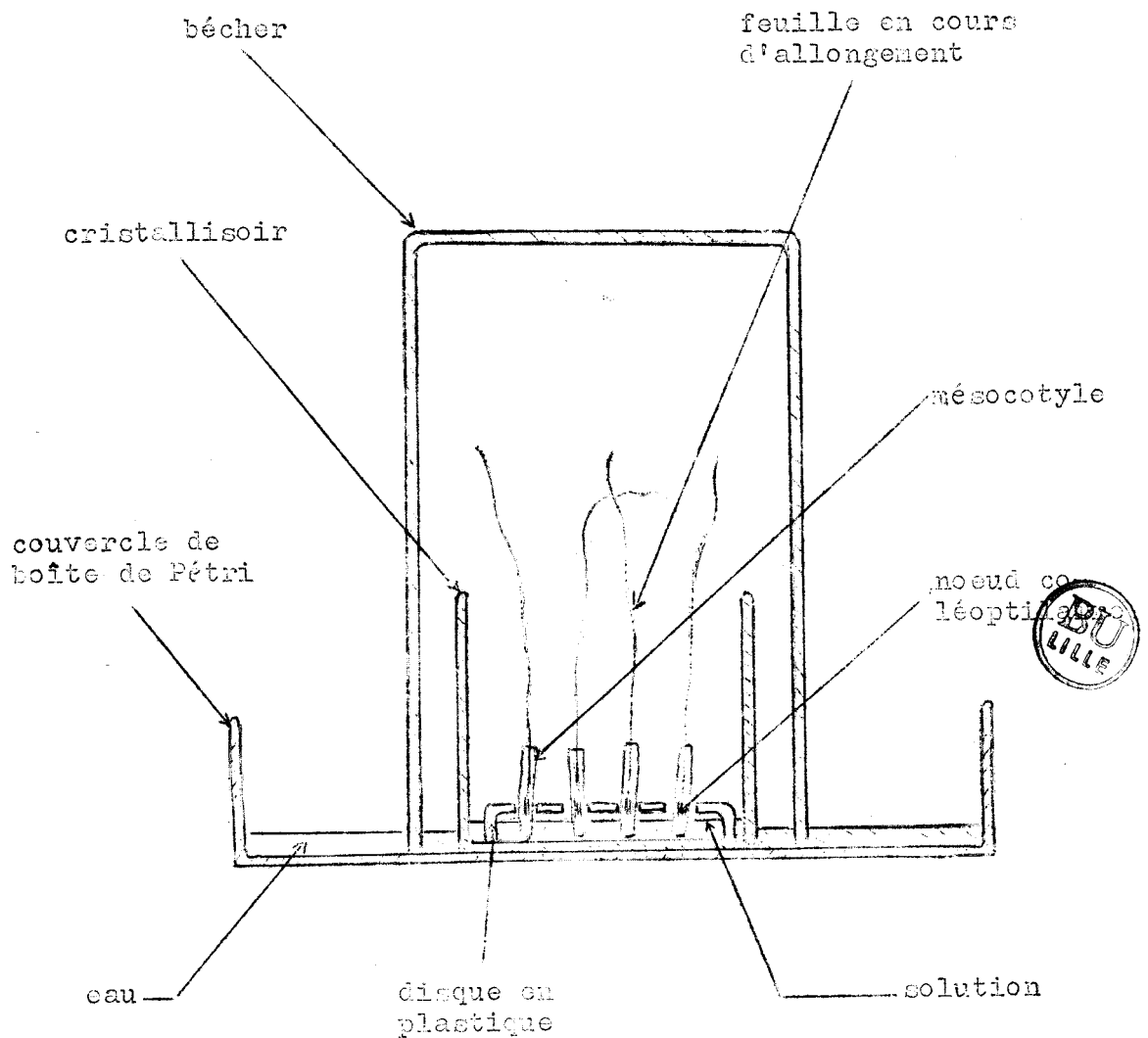


FIGURE N° I : VUE EN COUPE DU DISPOSITIF UTILISÉ
POUR LE TEST AVOINE.

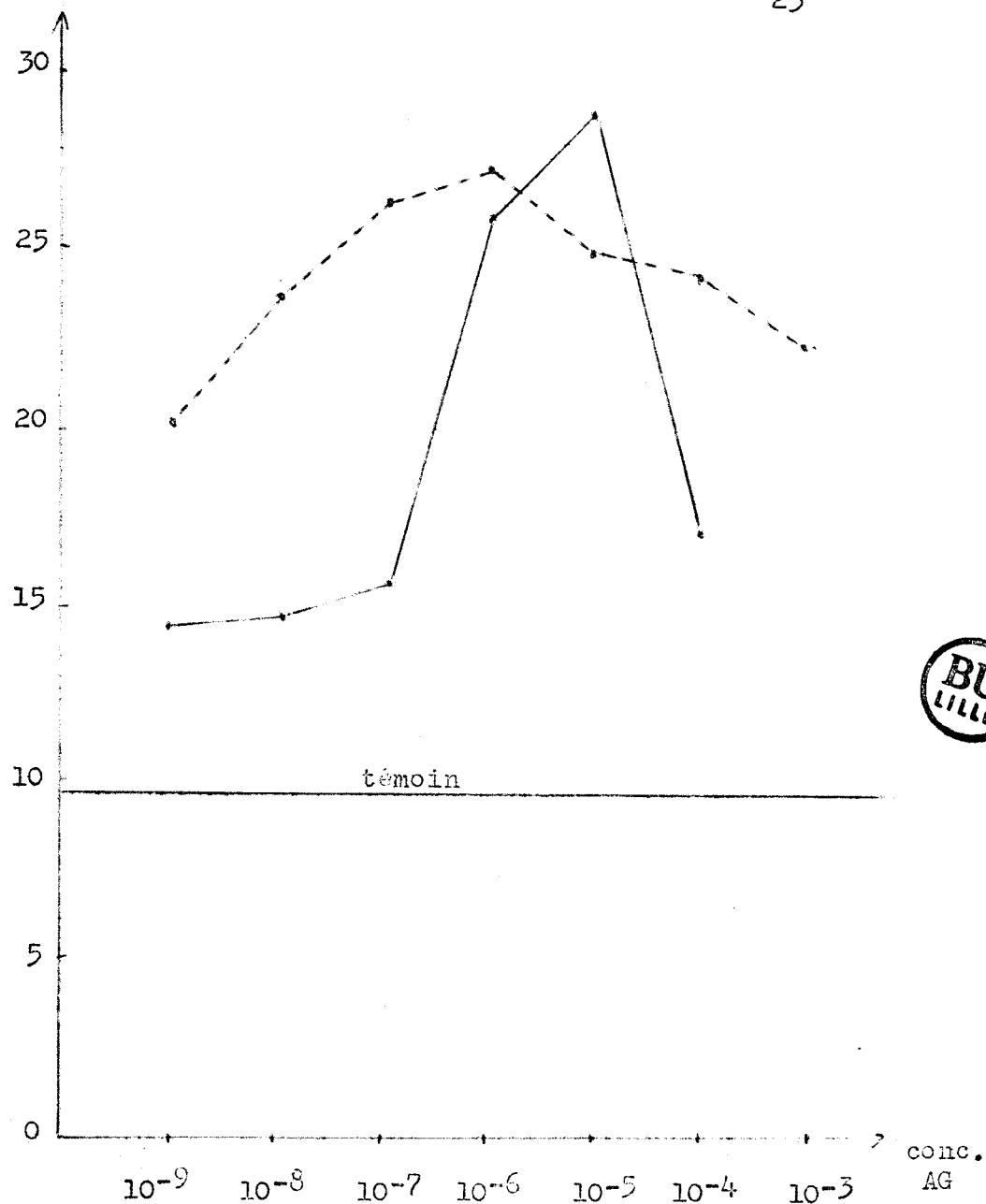
Nous avons pensé qu'au cours de la chromatographie, certains facteurs pouvaient intervenir et contribuer à modifier l'activité de la gibbérelline. Il se peut en particulier, que les substances recherchées ne migrent pas totalement ou que, lors de l'élution des chromatogrammes, une certaine proportion de substances reste dans le papier ou encore que des traces de solvant exercent une action propre, inhibitrice ou stimulante, sur le test.

Nous avons donc réalisé, en fonction d'une solution témoin constituée par une solution tampon sucrée, deux séries de tests avec des concentrations d'acide gibbérellique des flacons allant de 10^{-3} à 10^{-9} g/litre.

- 1) sans chromatographier la solution : à 2,4 ml de solution tampon sucrée à pH 6,3 nous avons ajouté chaque fois 0,1 ml de solution d'acide gibbérellique, de concentration connue, et effectué le test.
- 2) en chromatographiant 0,1 ml de solution d'acide gibbérellique de concentration connue et en utilisant la technique complète exposée ci-dessus.

Les résultats sont exposés sur la figure n° II page 23.

On constate, à la lecture de ces courbes, une certaine irrégularité dans les résultats. La solution non chromatographiée est, comme on pouvait logiquement l'attendre, plus active que la solution chromatographiée à la concentration de 10^{-5} g/l seulement. Pour toutes les autres concentrations



-----= solution chromatographiée
 ———= solution non chromatographiée

FIGURE N° II : TEST AVOINE - Influence de la chromatographie sur l'activité de solutions d'acide gibbérélique de concentration croissante.

c'est l'inverse, ce qui est paradoxal et nous ne voyons pas de quelle façon expliquer ce phénomène. Telles qu'elles se présentent les deux courbes sont difficilement comparables. Néanmoins, si l'on ne considère que la courbe correspondant aux solutions chromatographiées, les allongements obtenus apparaissent comme étant très valables et notamment très supérieurs au témoin. La chromatographie ne supprime pas la sensibilité du test, elle diminue seulement l'amplitude des écarts d'allongement.

b) Le test maïs nain :

Nous nous sommes procurés au laboratoire de B.O. PHINNEY, les mutants nains suivants :

dwarf 1 = d1

dwarf 2 = d2

dwarf 5 = d5

Notre étude a porté essentiellement sur les variétés d1 et d2 étant donné que nous disposions d'une quantité insuffisante de maïs de la variété d5 pour réaliser tous les tests prévus.

- germination :

Dans des terrines en terre cuite, on plante les caryopses en ligne, à 1 cm de profondeur et à 2,5 cm l'un de l'autre. On arrose avec une solution nutritive dont la composition est la suivante :

eau distillée..... 1000 ml

CaNO₃..... 0,5 g

PO₄NO₃..... 0,25 g

PO₄Na₂..... 0,25 g

SO₄Mg..... 0,25 g

On ajoute 5 gouttes de solution oligodynamique de BERTRAND et BERTHELOT.

La germination est réalisée à une température de 25 à 28°C.

La levée s'effectue dès le 4ème jour. A partir du 8ème jour le test peut être entrepris.

- sélection des nains :

Il y a une ségrégation génétique de trois maïs normaux pour un maïs nain environ. Il est indispensable d'éliminer dès le début les maïs normaux. Ceux-ci sont caractérisés par :

- . une levée plus rapide
- . des premières feuilles plus allongées
- . une taille nettement plus importantes dès le début.

La feuille légèrement arrondie des mutants nains est, d'autre part, caractéristique.

Les maïs à éliminer sont sectionnés à leur base pour éviter d'endommager les systèmes racinaires.

- préparation de la solution à étudier :

Dans une boîte à tare parfaitement propre, on découpe en petits morceaux un fragment de chromatogramme. Il a été prélevé de la même façon que pour le test avoine (voir page 13). On ajoute 2,5 ml d'eau distillée et 4 gouttes de Tween 20 à 0,05 %. L'ensemble est placé à 4°C pendant 12 heures. Au bout de ce laps de temps le papier est égoutté sous pression. C'est la solution ainsi obtenue qui sera employée pour les

applications.

- méthode d'application :

On applique la solution à l'intérieur du cornet formé par les deux premières feuilles, à raison de 0,1 ml par plante chaque fois. Le traitement est répété quatre fois à des intervalles de 24 heures.

- mesures :

Une semaine après la première application on mesure la longueur de la gaine des deux premières feuilles, entre le noeud et la ligule. Cette mesure est réalisée au mm près. Une moyenne est faite sur quinze mesures. Un lot est gardé comme témoin.

- étude du rôle du Tween 20 :

On sait que la présence du Tween 20 dans la solution appliquée renforce l'action de l'acide gibbéréllique (P. NEELY et B.O. PHINNEY 1957). Plusieurs esters d'acides gras et le Tween 80 présentent une action comparable. J. MARGARA (1960) a étudié l'action du Tween 80 seul sur l'élongation de la tige du pois de senteur nain et mis ainsi en évidence l'action stimulante du Tween 80 sur l'élongation des plantes entières.

Avant de réaliser le test nous avons, quant à nous, cherché à déterminer quel pouvait être le rôle du Tween 20 sur la croissance des maïs nains d1, d2, d5. En effet, sans supprimer la nanisme, cette substance pouvait néanmoins intervenir directement. Nous avons donc opéré sur trois lots dans chaque variété de maïs, en faisant trois applications de 0,1 ml à des intervalles de 2 jours, de la façon suivante :

- 1er lot : témoin - aucune application
- 2ème lot : une solution renfermant 1 goutte de Tween 20 à 0,05 % par ml.
- 3ème lot : une solution d'acide gibbéréllique à 1 mg/litre, soit une concentration de 10^{-6} g/litre. On sait que l'action de l'acide gibbéréllique est optimale à cette concentration.

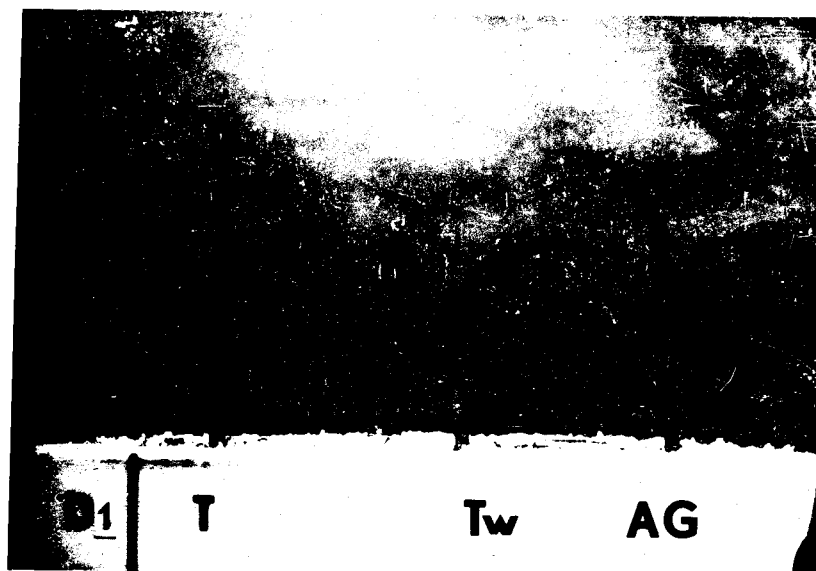
L'observation est faite quinze jours après le premier traitement (photos A, B, C page 28). La taille du maïs nain traité avec la solution de Tween 20 (Tw) est légèrement supérieure à celle du maïs qui ne reçoit rien (T). Elle demeure nettement inférieure à celle du troisième (AG 10^{-6}) recevant la solution d'acide gibbéréllique, qui a perdu définitivement son caractère nain.

En conclusion, on peut penser que le Tween 20 exerce sur les trois variétés une action d'intensité constante qui n'est pas négligeable mais qui ne peut se confondre complètement avec celle de la gibbérélline et ne compromet pas le déroulement du test. On pourrait, comme MARGARA, se demander si l'action du Tween 20 sur l'allongement de ces maïs ne résulterait pas d'une interaction avec une gibbérélline native existant à faible dose dans la plante.

A

Mutant

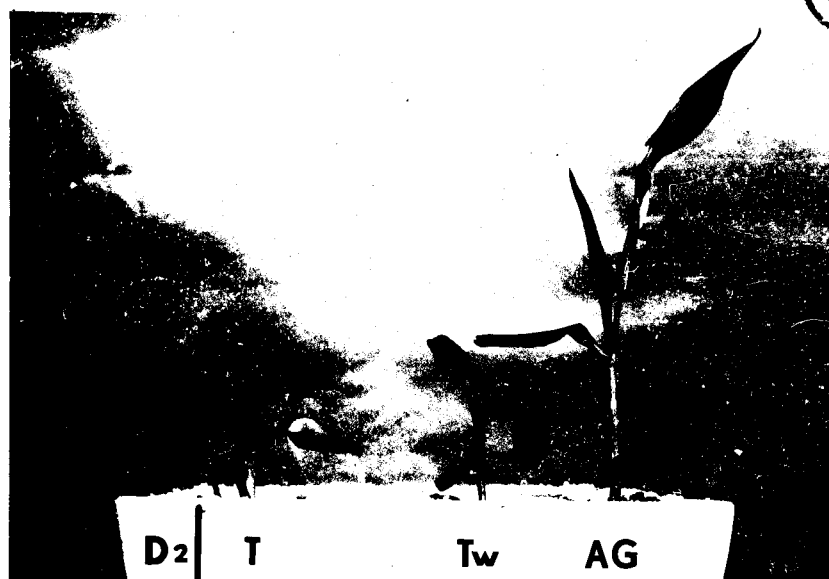
d1



B

Mutant

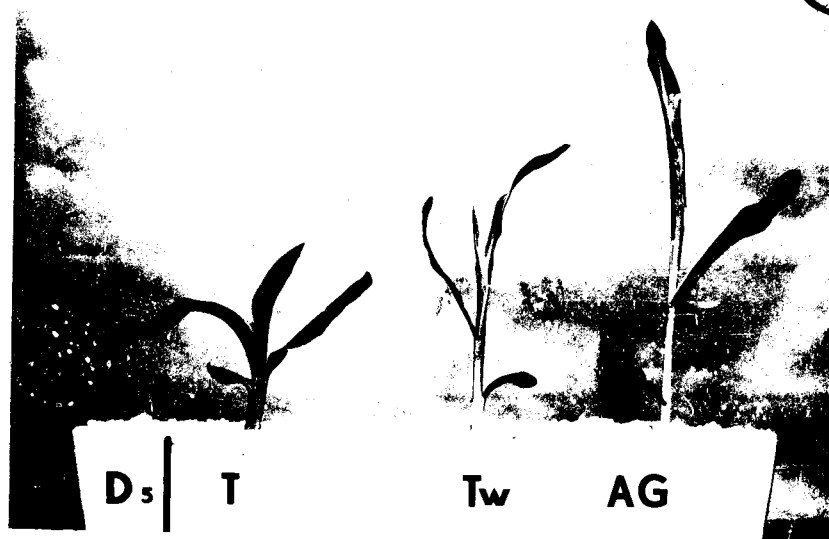
d2



C

Mutant

d5



P L A N C H E N° IV : ETUDE DU ROLE DU TWEEN 20.

R E S U L T A T S E X P E R I M E N T A U X

Cette étude avait pour but de confirmer tout d'abord la production de substances du type gibbérelline par le *Bacillus licheniformis*. Pour connaître les variations dans l'élaboration de gibbérelline par les micro-organismes en fonction de l'âge des milieux de culture, nous avons procédé à l'extraction d'une série de milieux dont l'âge variait de 1 à 10 semaines. Notre but était de déterminer lesquels de ces extraits montreraient la plus grande activité gibbérellinique et quelles conclusions on pouvait en tirer.

Nous n'avions pas de données très précises sur les substances à introduire dans le milieu. La première étude avait été réalisée à partir d'un mélange riche en tryptophane. Celui-ci intervient, on le sait, comme précurseur dans les synthèses d'auxine mais sa structure chimique ne semble pas permettre de lui attribuer, à priori, un rôle comparable dans l'élaboration des gibbérellines.

Dans le cadre de chaque étude nous avons cherché à obtenir des précisions d'ordre quantitatif par le test avoine et d'ordre qualitatif par le test maïs nain.

A - INFLUENCE DE L'AGE DES MILIEUX

Dix fioles renfermant chacune un litre de milieu de culture ont été préparées puis ensemencées avec le *Bacillus licheniformis*. Chaque semaine nous avons procédé à l'extraction des gibbérellines d'une des fioles. L'opération terminée, l'extrait était conservé à 4°C.

Un milieu témoin non ensemencé a été soumis aux mêmes méthodes d'extraction.

1 - Résultats obtenus par le test avoine :

Les résultats de nos dosages sont exprimés graphiquement sur la figure III page 31. Nous avons porté :

- en abscisse, l'âge des différents milieux
- en ordonnée, l'allongement moyen des segments de feuilles d'avoine exprimé en mm et calculé à partir de 15 mesures.

L'allongement du témoin est figuré par une droite parallèle à l'axe des abscisses.

Bien que les variations de la courbe soient assez faibles, on peut noter qu'au bout d'une semaine d'incubation, le milieu renferme déjà des substances actives. Cette activité s'accroît pendant la deuxième semaine, puis les allongements demeurent ensuite très voisins jusque la neuvième semaine, l'activité décroît ensuite brusquement.

La présence de substances de type gibbérelline est ainsi confirmée. En effet, dans tous les cas, la moyenne des allon-

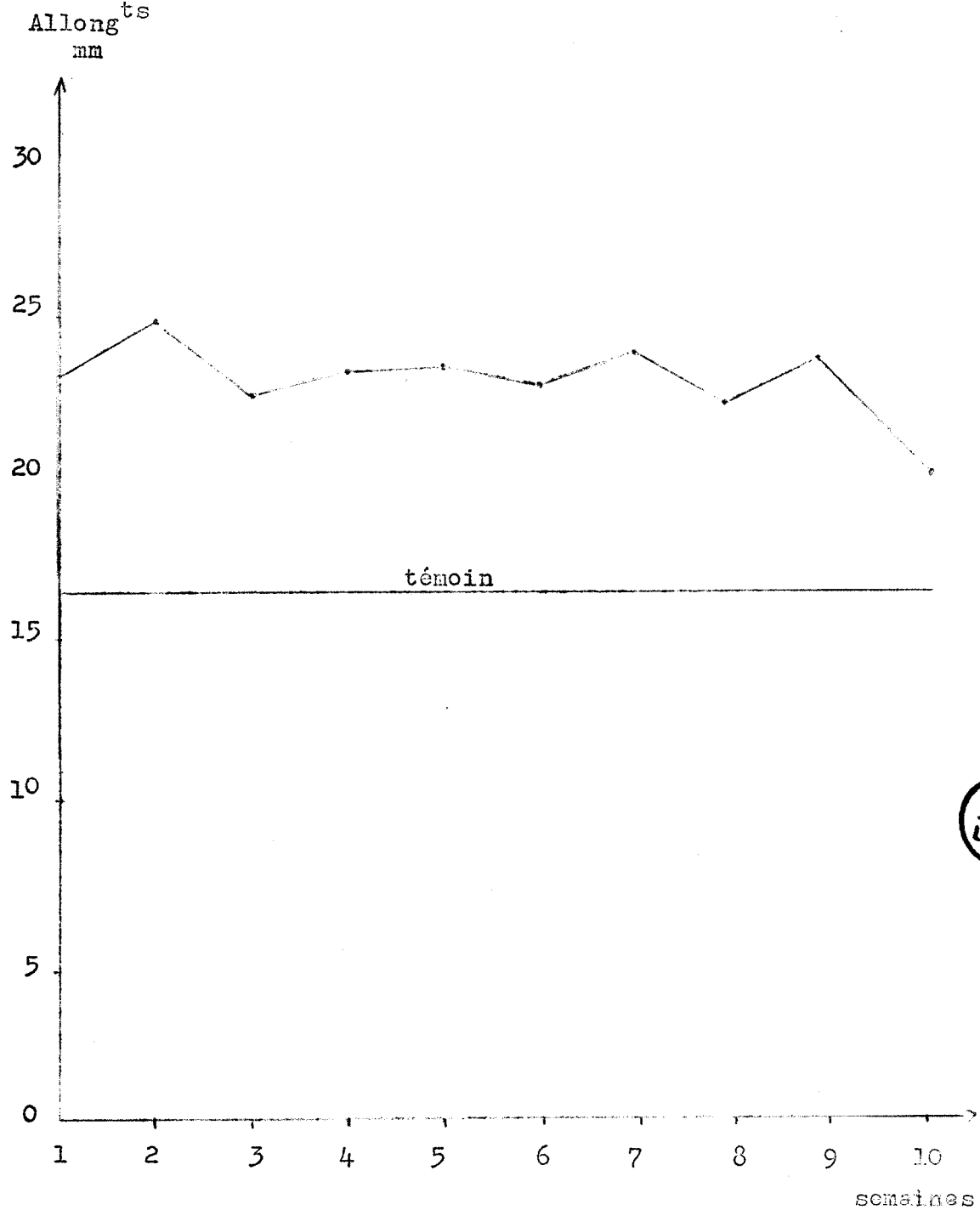


FIGURE N° III : TEST AVOINE - INFLUENCE DE
L'AGE DES MILIEUX

gements est supérieure à celle du milieu témoin non ensemencé . Cette différence est donc le résultat de l'activité des micro-organismes.

Ces substances seraient donc produites très tôt, lorsque les bactéries se trouvent dans la phase de multiplication active. Un certain équilibre s'établirait ensuite : la lyse des bactéries et la dégradation du milieu s'accompagneraient enfin de la destruction des substances du type gibbérellone.

En comparant la figure III à celle correspondant à des solutions d'acide gibbérannique chromatographiées (figure II page 23), on constate que la concentration des substances recherchées est comprise entre 10^{-5} et 10^{-3} ou entre 10^{-7} et 10^{-9} puisque la courbe témoin présente une phase ascendante et une phase descendante. Lors de la révélation des chromatographies d'extraits nous n'avons jamais observé de taches fluorescentes bleu-vert caractéristiques : il faut donc penser que la concentration dans l'extrait est de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-9} . Etant donné que 5 ml d'extrait correspondent à 1 litre de milieu de culture, cette concentration devrait encore être divisée par 200. Ceci est calculé sans évaluer les pertes au cours des opérations d'isolement (extraction - chromatographie - élution). En fait, la concentration dans le milieu bactérien semble être très faible. Elle est certainement voisine de 10^{-10} g/l.

Il faudrait naturellement tenir compte aussi, pour plus de précision, des différences d'activité possibles entre les gibbérellines de nos milieux de culture et celle du commerce.

2 - Résultats obtenus par le test maïs nain :

Etant donné la complexité de toutes les opérations et tenant compte des résultats obtenus par le test avoine, nous avons effectué ce nouveau test, seulement avec les trois extraits qui nous ont semblé les plus dignes d'intérêt (une, trois et cinq semaines). Ne disposant que de très peu de mutants de la variété d5, nous n'avons pu effectuer qu'un seul test sur cette variété (milieu de 3 semaines).

Au cours de chacun de nos essais, nous avons réparti les maïs en cinq lots dénommés et traités de la façon suivante :

- 1er lot = "Lot témoin début"

- 2ème lot = "Lot témoin fin"

Ces deux lots ne sont l'objet d'aucune application.

- 3ème lot = "Lot extrait témoin"

Il reçoit une solution correspondant à l'extrait témoin non ensencé.

- 4ème lot = "Lot extrait"

Il reçoit la solution étudiée.

- 5ème lot = "Lot témoin AG 10^{-5} "

Il reçoit la solution obtenue par chromatographie de 0,4 ml de solution d'acide gibbéréllique du commerce à la concentration de 10^{-5} g/l.

On calcule la moyenne de la longueur des gaines des deux premières feuilles :

- Pour le "lot témoin début" ; le jour de la première application sur les 3 lots traités.

- Pour le "lot témoin fin" , une semaine plus tard, en même temps que les 3 lots traités.

Le tableau n° I page 35 donne, à titre d'exemple, les résultats des mesures effectuées sur le mutant d2 avec l'extrait du milieu bactérien âgé de 5 semaines. Il peut sembler, à l'examen des chiffres du tableau n° I, que ce soient uniquement les gaines des secondes feuilles qui s'accroissent. Cependant, dans certains cas, il y a également un allongement de la gaine de la première feuille. Ceci est en relation avec l'âge biologique du matériel vivant utilisé et justifie la nécessité de faire la moyenne de la longueur des gaines des deux premières feuilles. La différence très faible entre les deux longueurs de gaines dans le "lot témoin fin" est en outre à noter. Ce tableau fait également ressortir la variabilité des résultats entre les individus d'un même lot.

Les photographies de la planche n° V page 36 ont été prises une semaine après le premier traitement, sur des échantillons de même âge. Elles montrent les modifications provoquées, chez les 3 variétés de mutants d1, d2, d5, par l'application des différentes solutions.

On voit que :

- Les maïs traités avec une solution d'acide gibbéréllique à la concentration de 10^{-5} (AG) ont perdu leur caractère nain. Leur taille est devenue généralement identique à celle des maïs normaux (N).
- La taille des maïs traités à partir d'un milieu non ensemencé (T) est légèrement supérieure à la taille des maïs nains témoins (T_0). On peut invoquer dans ce cas l'action

Mesures	Lot témoin début	Lot témoin fin	Lot extrait témoin	Lot extrait (5semai.)	Lot témoin AG IO-5
(I)	I6+I8=34	2I+27=48	22+27=49	I8+33=5I	I5+24=49
	2+I3=I5	2I+26=47	I5+20=35	24+33=57	22+47=69
	I8+I3=3I	20+22=42	22+20=42	I8+26=44	22+40=62
	I9+I3=32	20+20=40	I6+20=36	I7+23=40	20+33=53
	9+I8=27	I8+I8=36	20+30=50	20+29=49	20+32=52
somme	I3+ 3=I6	I9+23=42	22+26=46	I8+24=42	I6+28=44
des	I9+IO=29	22+25=47	20+29=49	I6+33=49	24+30=62
2	8+20=28	20+23=43	20+29=49	20+30=50	I8+26=44
gaines	I3+I5=30	I8+24=42	22+30=52	I6+25=4I	I5+32=47
	I7+IO=27	2I+22=43	26+25=5I	I9+35=54	I9+38=57
	I6+ 4=20	I9+2I=40	I6+23=39	I4+2I=45	I8+35=53
	8+I8=26	22+24=46	25+28=53	24+30=54	I5+4I=56
	8+I7=25		25+30=55	20+28=48	I8+36=54
	I9+ 6=25		22+32=54	I9+25=44	22+33=55
	I3+ 3=I6				
	4+20=24				
total	405	5I6	660	668	757
moyenne	25,3I	43	47,I4	47,7I	54



(I) Mesures exprimées en mm:

-la première se rapporte à la gaine de la première feuille

-la seconde à la gaine de la seconde feuille.

T A B L E A U N ° I : TEST MAIS NAIN-Mesures réalisées
sur le mutant d2 avec l'extrait d'un milieu bactérien de
5 semaines.

D
Mutant
d1



E
Mutant
d2



F
Mutant
d5



PLANCHE N° V : N = Maïs normal -
To = Maïs nain témoin - T = Extrait milieu non ensencé -
Ext = Extrait milieu de 3 semaines - AG = Acide gibbéré-
lique 10-5

stimulante du Tween 20.

- Les maïs traités à partir d'un milieu âgé de trois semaines (Ext) manifestent une élongation nettement plus grande que les témoins (T).
- L'action apparaît plus nettement chez les mutants d2 et d5 que chez d1.

A l'aide des mesures de longueurs rassemblées dans le tableau n° II page 38, nous avons déterminé la moyenne des allongements dans les différents lots par rapport au "lot témoin début". Nous avons obtenu pour chaque test, 4 moyennes d'allongements. Elles correspondent :

- 1) aux mutants non traités (To)
- 2) aux mutants traités avec l'extrait témoin non ensencé (T)
- 3) aux mutants traités avec l'extrait étudié (Ext)
- 4) aux mutants traités avec la solution d'acide gibbérellique à la concentration de 10^{-5} g/l (AG).

Les résultats sont représentés sous forme de graphiques sur les figures IV et V pages 39 et 40.

Bien que, d'une part, les applications soient toujours effectuées en quantités égales, sur des plantes de même âge, à des intervalles réguliers, et que, d'autre part, le traitement ait toujours la même durée, les valeurs de To, T et AG présentent des variations importantes. Cependant, pour chaque test, la valeur des allongements est toujours croissante : $To < T < Ext < AG$. Ceci souligne bien la présence de

	âge des milieux (soma)	lot témoin début	lot témoin fin	lot extrait témoin	lot extrait	lot témoin AG 10-5
Mutant d1	1	17,10	33,40	41	48,10	75,18
	3	16,25	23	30,23	34,83	47,63
	5	23,60	41,76	53,83	55,91	70,33
Mutant d2	1	11,60	36,78	37	42,75	70,50
	3	6,70	34,60	55,80	64,60	85,10
	5	25,31	43	47,14	47,71	54
Mutant d5	3	14,50	39,70	51,50	58,60	76,40



T A B L E A U N° II : TEST MAIS NAIN - INFLUENCE DE

L'AGE DES MILIEUX

Somme des longueurs (exprimées
en mm) des gaines des deux pre-
mières feuilles.

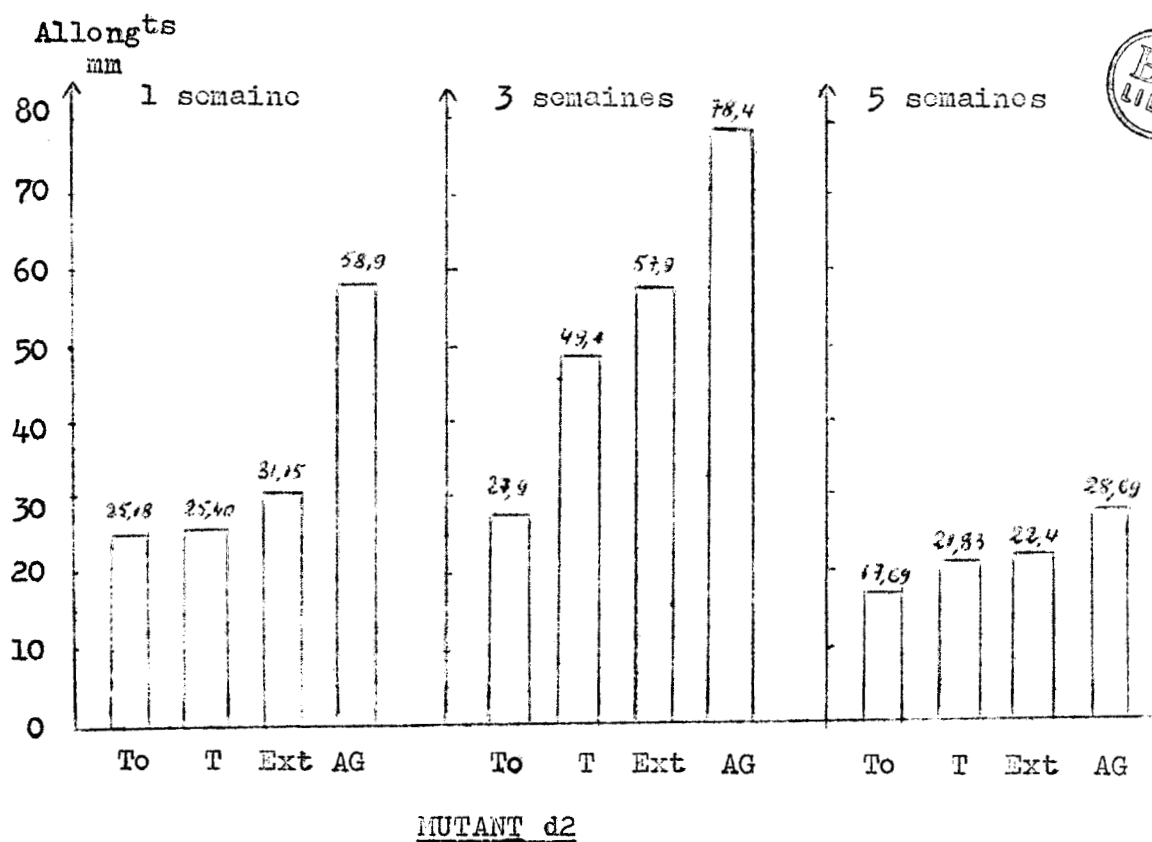
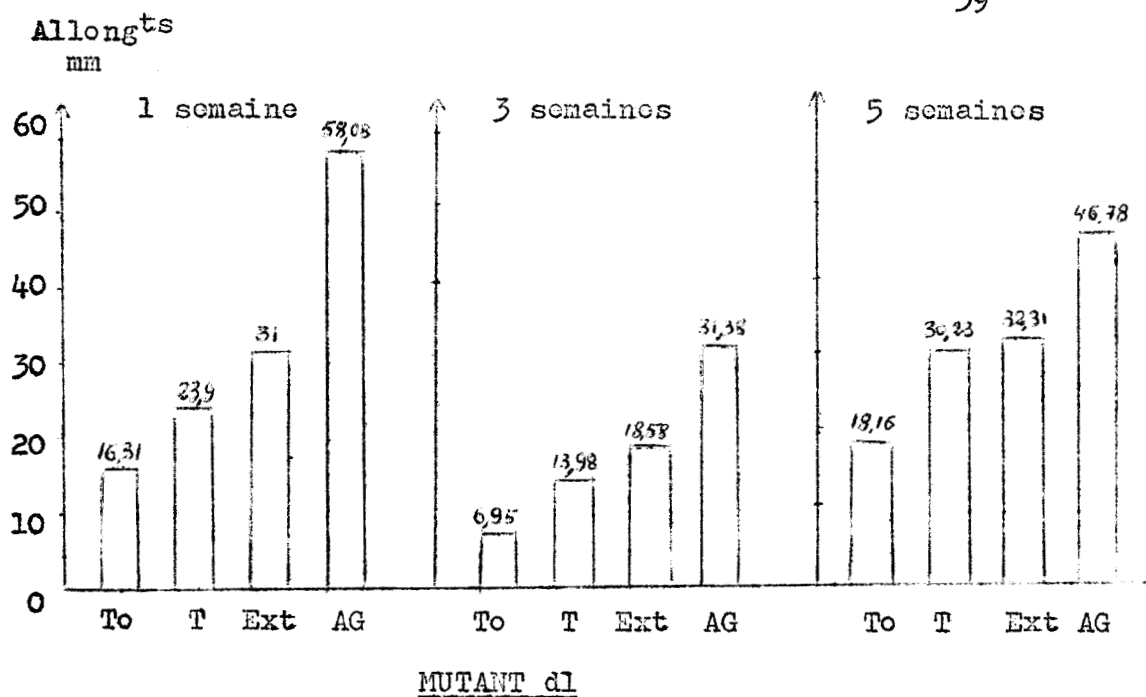


FIGURE N° IV : TEST MAIS NAIN - INFLUENCE DE L'AGE
DES MILIEUX.

Graphiques traduisant l'allongement
des gaines des deux premières feuil-
les chez les mutants d1 et d2.

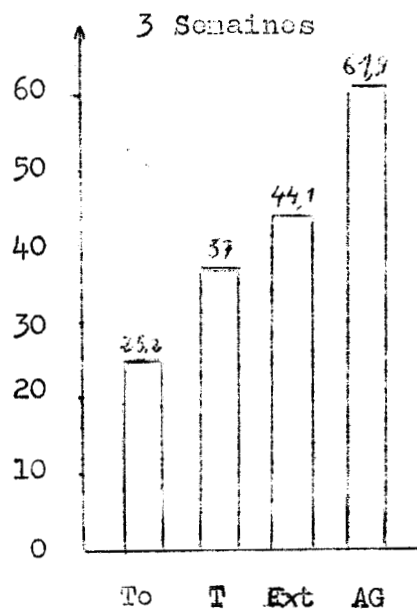
Allongts
mm

FIGURE N° V : TEST MAIS NAIN

INFLUENCE DE L'AGE
DES MILIEUX.

Allongement des gaines des
deux premières feuilles chez
les mutants d5.

Mutant d5

	Milieu	(AG - T)	(Ext - T)	(Ext-T)%(AG-T)
Mutant d1	1 semaine	34,18	7,10	+ 20,77
	3 semaines	17,40	4,60	+ 26,43
	5 semaines	16,50	2,04	+ 12,36
Mutant d2	1 semaine	33,50	5,75	+ 17,16
	3 semaines	28,30	8,80	+ 31,09
	5 semaines	6,86	0,57	+ 8,30
Mutant d5	3 semaines	24,90	7,10	+ 28,51



T A B L E A U N° III : TEST MAIS NAIN - INFLUENCE
DE L'AGE DES MILIEUX.

Valeurs des pourcentages d'allongement des lots traités
par les extraits par rapport aux deux témoins T et AG.

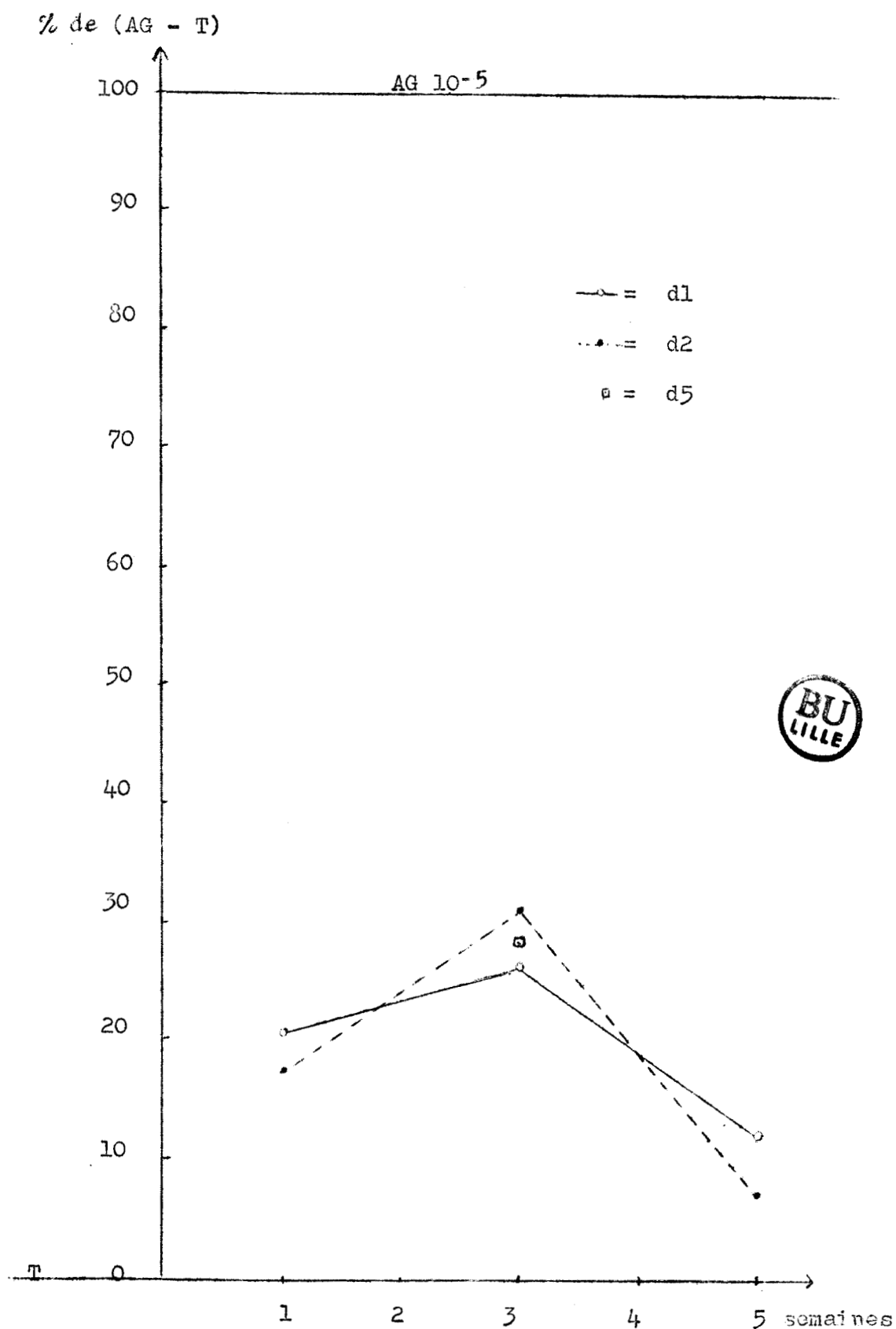


FIGURE N° VI : TEST MAIS NAIN - INFLUENCE DE
L'ÂGE DES MILIEUX.

gibbérullines dans les milieux de culture.

Tels qu'ils sont, en raison de la variabilité du matériel biologique, ces graphiques ne peuvent être comparés entr'eux. Afin de pouvoir comparer l'activité respective des trois milieux sur chaque mutant il fallait déterminer leur degré d'activité par rapport à des témoins constants. Pour cela, nous avons exprimé leur valeur en pourcentage de la différence entre les deux témoins T et AG correspondants. Ceci a été l'objet des calculs figurant sur le tableau n° III page 40. A partir de ces valeurs nous avons établi le graphique de la figure VI page 41 où nous avons porté :

- en abscisses : l'âge respectif des milieux testés.
- en ordonnées : les pourcentages des écarts (AG - T).

Les témoins sont représentés par des lignes parallèles à l'axe des abscisses. L'activité du milieu témoin non ensemencé (T) a pour ordonnée 0, celle du témoin acide gibbérullique (AG) a pour ordonnée 100.

Les deux courbes représentées intéressent les mutants d1 et d2. Un seul point concerne le mutant d5.

Dans les conditions expérimentales définies, l'activité est croissante pendant les trois premières semaines et décroissante ensuite. Au début et à la fin de l'expérience, l'activité est plus grande sur la variété d1 que sur la variété d2. Par contre, au bout de trois semaines, on constate

que les trois variétés de mutants répondent en intensité croissante, dans l'ordre :

$$d2 \rightarrow d5 \rightarrow d1$$

On peut donc supposer qu'il y aurait production de plusieurs types de gibbérellines synthétisées dans les milieux à des phases différentes du métabolisme et agissant de façon variable sur les diverses variétés de mutants. D'après J.P. NITSCH et C. NITSCH (1962), la gibbérelline A9 présente une plus grande activité sur la variété d5 que sur la variété d1. Ne disposant pas de la gibbérelline A9 il ne nous a pas été possible d'apporter plus de précisions dans ce domaine.

3 - Comparaison des résultats et conclusions :

De la comparaison des résultats obtenus au cours des deux tests, plusieurs faits peuvent être retenus :

- 1) Ces deux tests prouvent la synthèse de substances de type gibbérellino par le *Dacillus licheniformis*. Dans tous les cas, en effet, les allongements obtenus à partir des milieux témoins non ensemencés sont inférieurs à ceux des milieux de culture examinés.
- 2) L'activité des milieux paraît être croissante pendant une période de 2 à 3 semaines ; elle a tendance à diminuer par la suite. Cette diminution d'activité s'opère de façon certaine avant la cin-

quième semaine.

- 3) La quantité de substances synthétisées semble être assez faible mais cependant biologiquement active.

B - INFLUENCE DE LA RICHESSE DES MILIEUX EN TRYPTOPHANE

Nous avons, pour cette étude, préparé six fioles contenant un litre de milieu de culture. La richesse en tryptophane dans chacune des six fioles est respectivement de : 0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 et 0,5 g/litre. C'est le seul facteur variable dans notre expérience.

Après ensemencement, les milieux ont été placés pendant 3 semaines à l'étuve réglée à 37°C. Nous avons eu recours aux techniques d'isolement habituelles. Les extraits ont été étudiés par le test avoine et le test maïs nain. Toutes les mesures ont été réalisées comparativement à un milieu témoin non ensemencé renfermant 0,5 g de tryptophane par litre.

1 - Résultats obtenus par le test avoine :

Ils sont exprimés sur la figure n° VII page 46. On constate que l'activité gibbéröllinique est pratiquement nulle pour le milieu sans tryptophane. L'allongement moyen des feuilles d'avoine n'est dans ce cas que très légèrement supérieur à celui du milieu témoin. L'augmentation d'activité est déjà très nette à la dose de 0,1 g/l. Jusque 0,3 g/l l'accroissement continue, mais de façon beaucoup plus modérée. Ensuite, pour des doses supérieures à 0,3 g/l l'activité demeure à peu près constante.

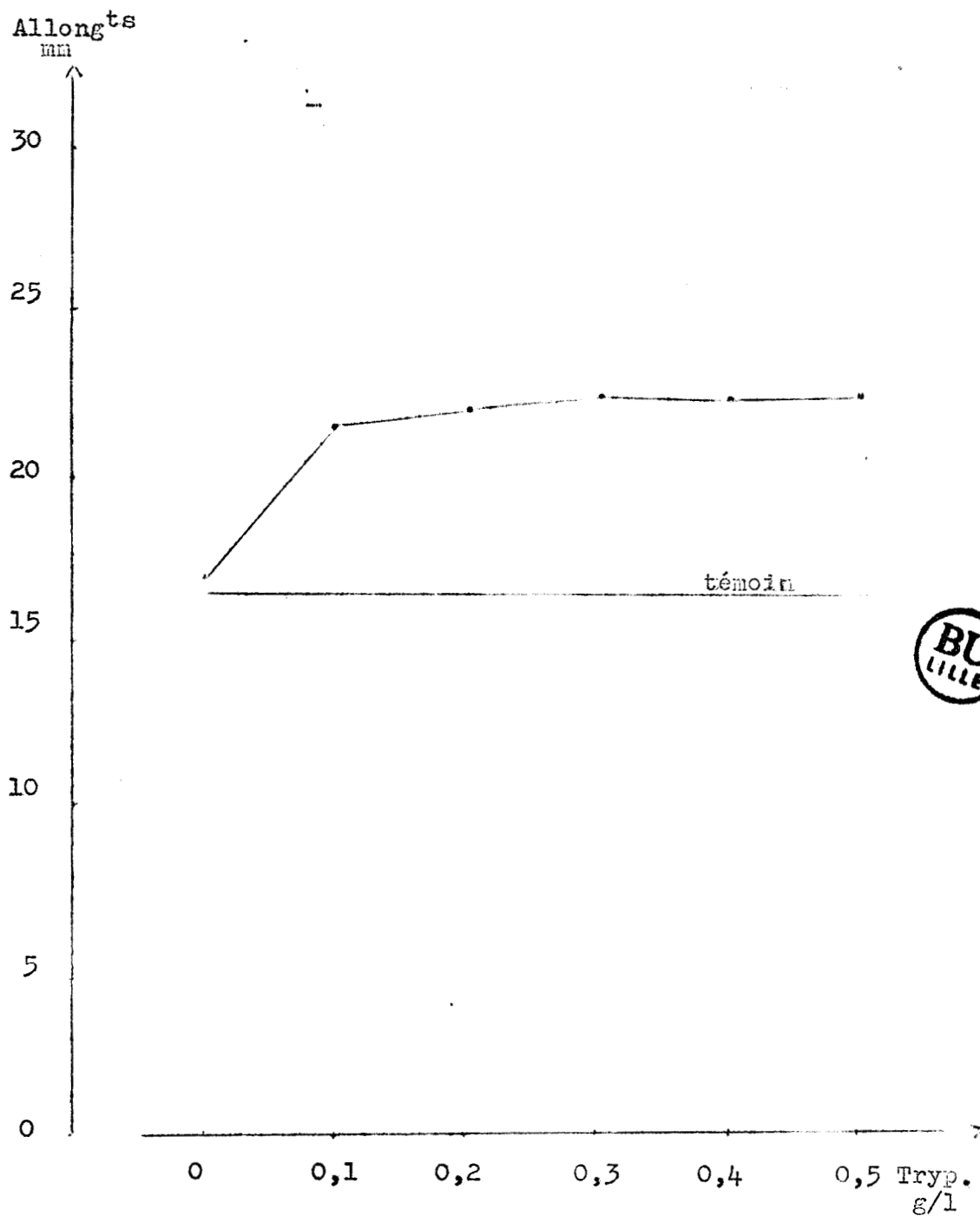


FIGURE N° VII : TEST AVOINE - INFLUENCE DE LA
RICHESSE DU MILIEU EN TRYPTO-
PHANE.

2 - Résultats obtenus par le test maïs nain :

Ce travail a été réalisé sur chacun des mutants d1 et d2 avec trois extraits provenant des milieux renfermant respectivement : 0 ; 0,2 ; 0,5 g de tryptophane par litre. Un seul test, avec le milieu renfermant 0,5 g/l de tryptophane a été effectué sur la variété d5.

La technique, les méthodes de mesure et les calculs qui en découlent sont les mêmes que dans la première étude. Le tableau n° IV page 48 donne les moyennes des longueurs des gaines des 2 premières feuilles dans les différents lots. Les graphiques des figures n° VIII et IX pages 49 et 50 ont été élaborés à partir de ces mesures. Nous avons ensuite calculé (tableau n° V page 50) l'activité en pourcentage de l'écart (AG - T) et tracé les courbes correspondantes sur le graphique de la figure n° X page 51.

La courbe obtenue avec la variété d1 est à rapprocher de celle obtenue par le test avoine (figure n° VII page 46). Le milieu sans tryptophane présente, dans le cadre du test utilisé, une activité inférieure à celle du milieu témoin. Pour une dose de 0,2 g/l, la réponse devient nettement plus forte. Elle augmente encore sensiblement jusqu'à 0,5 g/l.

La courbe obtenue avec la variété d2 est assez discutable. Il est en effet difficile d'interpréter la légère baisse d'activité qui se manifeste à la dose de 0,2 g/l de tryptophane. Il semble qu'il faudrait incriminer le résultat correspondant au milieu sans tryptophane.

	Tryptophane g/l	lot témoin début	lot témoin fin	lot extrait témoin	lot extrait	lot témoin AG 10 ⁻⁵
Mutant d1	0	18,90	36,21	48,20	46	57,41
	0,2	11,33	32,40	46,87	50,80	69,23
	0,5	16,25	23	30,23	34,33	47,63
Mutant d2	0	20	42,83	42,66	45,28	51,57
	0,2	17,53	42,66	50,54	53,21	61,33
	0,5	6,70	34,60	55,80	64,60	85,10
Mutant d5	0,5	14,50	39,70	51,50	58,60	76,40



~ T A B L E A U N° IV : TEST MAIS NAIN - INFLUENCE DE
LA RICHESSE DES MILIEUX EN
TRYPTOPHANE.

Somme des longueurs (exprimées
en mm) des gaines des deux pro-
mières feuilles.

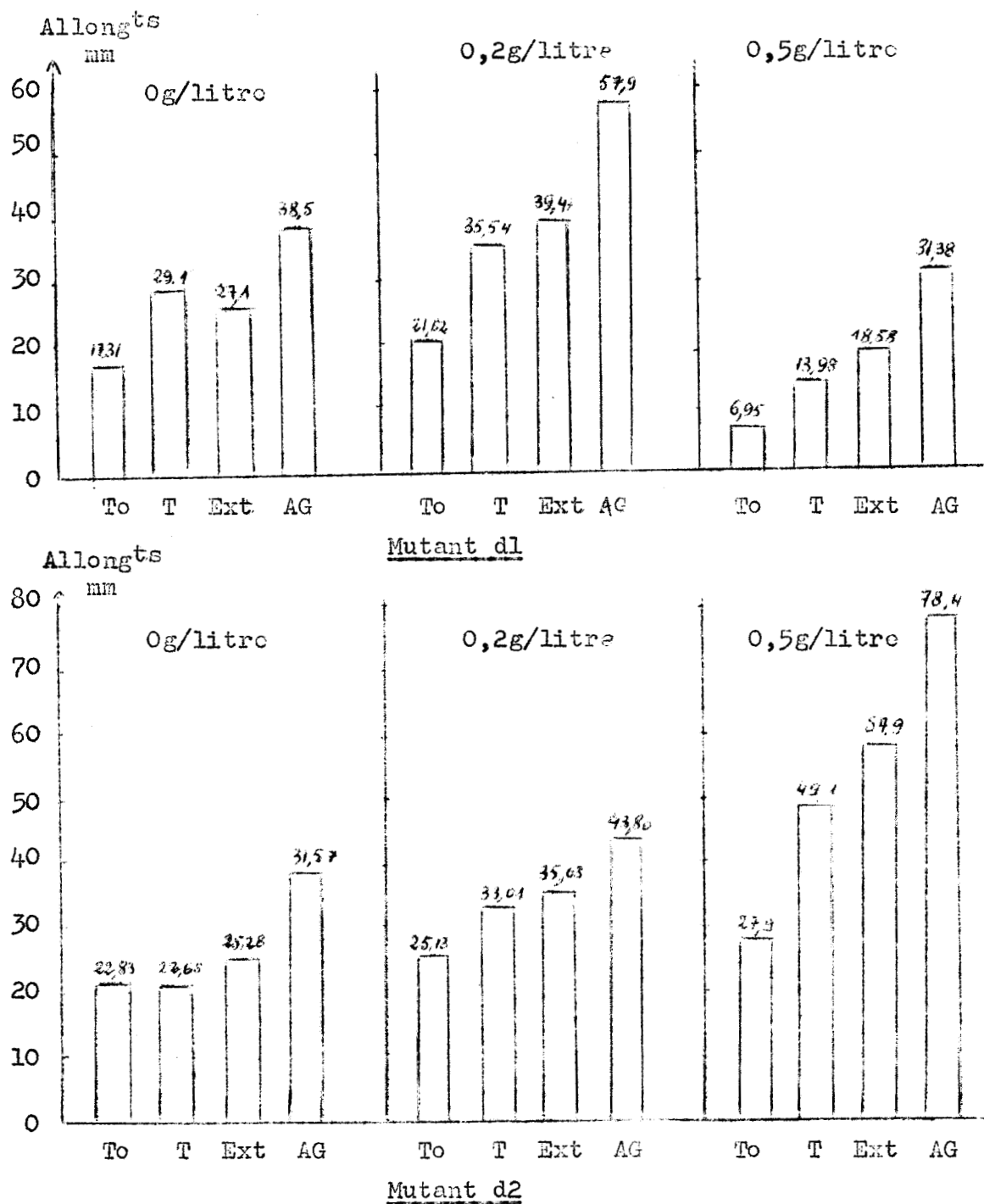


FIGURE N° VIII : TEST MAIS NAIN - INFLUENCE DE
LA RICHESSE DES MILIEUX EN
TRYPTOPHANE.

Allongement des gaines des deux premières feuilles chez les
mutants d1 et d2.

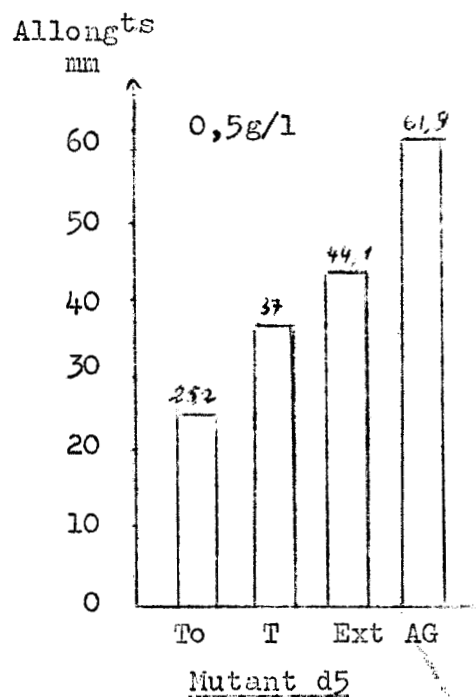


FIGURE N° IX : TEST MAIS NAIN -
INFLUENCE DE LA
RICHESSSE DES MI-
LIEUX EN TRYPTO-
PHANE.

Allongement des gaines des aux
premières feuilles chez les mu-
tants d5.

	Milieu g/l	(AG - T)	(Ext, - T)	(Ext-T)%(AG-T)
Mutant d1	0	9,4	- 2	- 21,27
	0,2	22,36	3,93	+ 17,57
	0,5	17,40	4,60	+ 26,43
Mutant d2	0	8,91	2,62	+ 27,15
	0,2	10,79	2,67	+ 24,70
	0,5	28,30	8,80	+ 31,09
Mutant d5	0,5	24,90	7,10	+ 28,51



T A B L E A U N° V : TEST MAIS NAIN - INFLUENCE
DE LA RICHESSE DES MILIEUX
EN TRYPTOPHANE.

Valeurs des pourcentages d'allongement des lots traités
par les extraits par rapport aux deux témoins T et AG.

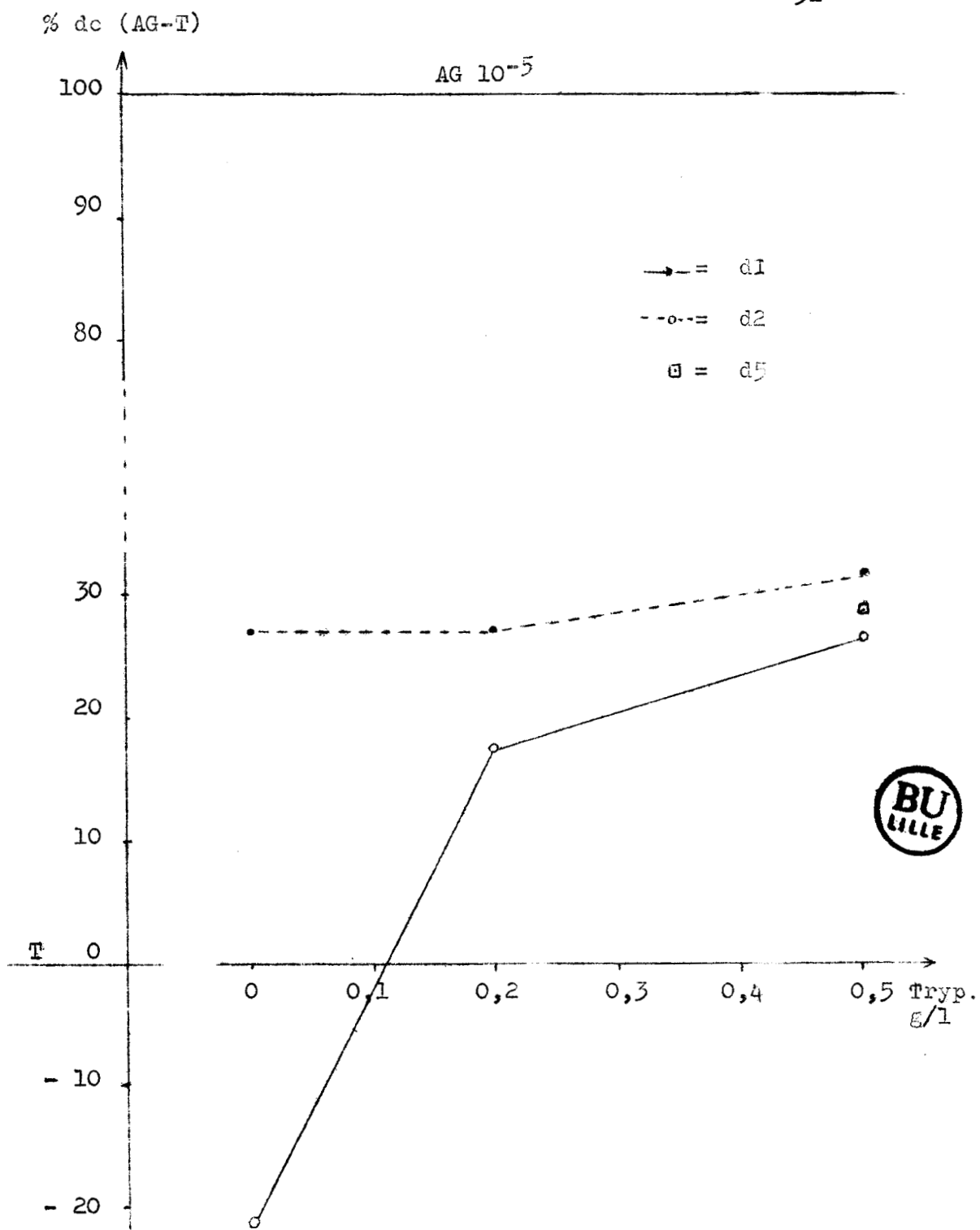


FIGURE N° X : TEST MAIS NAIN -

INFLUENCE DE LA RICHESSE DES
 MILIEUX EN TRYPTOPHANE.

On peut également noter que la réponse du mutant d2 est toujours supérieure à celle du mutant d1, celle du mutant d5 venant s'intercaler.

Dans cette expérience, le tryptophane peut agir :

- indirectement, en favorisant la multiplication des bactéries.
- directement, sans provoquer de modification du nombre des micro-organismes, mais en accroissant, grâce à une plus grande disponibilité de tryptophane, les synthèses de gibbérellines par les bactéries.

Afin de vérifier l'une ou l'autre de ces hypothèses nous avons réalisé l'expérience suivante .

3 - Dosage de trouble :

A l'aide d'un colorimètre, nous avons procédé à une mesure de trouble dans les six milieux de culture, 3 semaines après l'ensemencement.

Plus la transmission des rayons lumineux est faible, plus le nombre de bactéries présentes dans le milieu est important. Nous avons pris pour base la transmission à 100 % des rayons lumineux dans le milieu sans tryptophane. Les résultats obtenus sont exprimés sur le graphique de la figure n° XI page 53. La lecture de cette courbe montre que :

- a) le tryptophane est indispensable au développement des

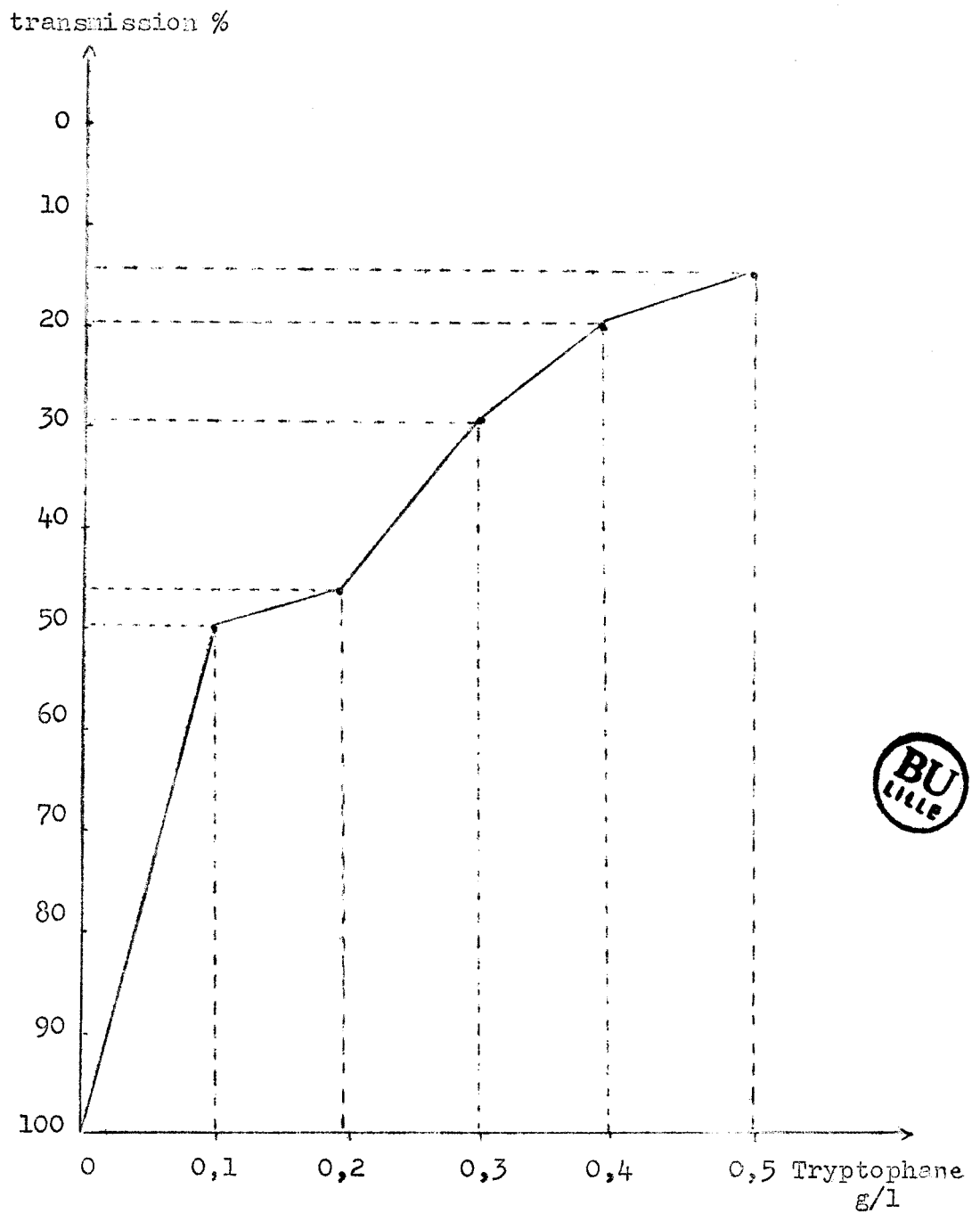


FIGURE N° XI : DOSAGE DE TROUBLE _
INFLUENCE DE LA RICHESSE DES
MILIEUX EN TRYPTOPHANE.

bactéries : pour une dose très faible de tryptophane (0,1 g/l), la multiplication des bactéries est déjà très intense.

b) l'accroissement du nombre des bactéries est très rapide jusqu'à la dose de 0,3 g de tryptophane par litre.

c) de 0,3 g à 0,5 g par litre l'accroissement continue mais en s'atténuant progressivement.

4 - Comparaison des résultats et conclusions

Il est à noter la similitude d'aspect des courbes obtenues au cours des trois études précédentes.

Plusieurs constatations sont à retenir :

a) l'absence de tryptophane dans le milieu entraîne normalement une absence d'activité du type gibbérellinique.

b) on ne peut, grâce à l'étude de trouble, affirmer que le tryptophane intervient comme précurseur dans la synthèse des substances étudiées. Il ne fait que favoriser la multiplication des bactéries.

c) la dose de 0,3 g/l de tryptophane est suffisante.

d) le mutant d2 montre la réponse la plus nette avec les trois milieux étudiés.

Les résultats des travaux que nous venons de présenter mettent une nouvelle fois en évidence la production de substances du groupe des gibbérellines par le *Bacillus licheniformis* cultivé "in vitro" sur un milieu riche en tryptophane.

1°) Nous avons choisi d'étudier l'activité de ces substances à l'aide de deux tests biologiques :

- Le test avoine : la variété NOIRE DE MOYENCOURT utilisée dans les conditions précisées par le travail de DEBRY (1965) a donné des résultats satisfaisants. Grâce à la grande sensibilité de ce test il nous a été possible d'évaluer approximativement la concentration de ces substances dans les différents milieux. Il semble que cette concentration soit voisine de 10^{-10} gramme par litre dans les meilleures conditions.
- Le test maïs nain, particulièrement spécifique des gibbérellines et employé pour la première fois dans

ce type d'étude a confirmé les résultats précédents. Nous avons obtenu des réponses différentes avec les trois variétés de maïs nain utilisées (d1, d2, d5). Les réponses les plus nettes ont été observées sur le mutant d2 et à un degré moindre sur le mutant d5.

2°) Plusieurs conditions nécessaires au développement des micro-organismes dans le milieu de culture peuvent être précisées :

- Les substances gibbérelliniques apparaissent très tôt dans le milieu et leur production atteint une quantité maximale au bout d'environ 2 à 3 semaines. Elle tend à décroître ensuite. Une durée d'incubation des milieux de 3 semaines à la température de 37°C est donc suffisante.
- Il semble que la quantité de tryptophane optimale soit de 0,3 gramme par litre.

3°) Il ne nous a pas été possible de déterminer la nature chimique des gibbérellines présentes dans le milieu. Il se pourrait que plusieurs types de gibbérellines soient synthétisés par le *Bacillus licheniformis*. C'est ce qu'il serait intéressant d'étudier à condition de disposer des différentes gibbérellines connues et d'un nombre plus grand de variétés de maïs nains.

4°) Le fait que ces substances soient produites au début de

l'incubation permet de penser qu'elles seraient synthétisées lors de l'activité normale des bactéries et ne résulteraient pas de transformations chimiques dues à la dégradation du milieu bactérien.

- 5°) Nous avons cherché à préciser le rôle du tryptophane .
Sa présence est indispensable au développement des bactéries. Les résultats obtenus ne permettent pas d'affirmer qu'il intervient directement dans la synthèse des gibbérellines.

En remplaçant le tryptophane par d'autres acides aminés dans le milieu de culture, il serait peut-être possible de savoir dans quelle mesure il est indispensable. On pourrait alors, dans ces conditions, lui attribuer un rôle plus précis dans cette synthèse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BRIAN W., (1960)

Les gibbérellines : un nouveau groupe d'hormones végétales.

Bull. Soc. Franç. Physiol. Vég. ; 6, 107-118.

CHEMINAIS L., (1964)

Evolution quantitative des gibbérellines au cours de la conservation des tubercules de pomme de terre.

D.E.S. Lille.

DEERY C., (1965)

Contribution à la mise au point d'une méthode de dosage biologique des gibbérellines.

D.E.S. Lille.

HAYASHI-BLUMENTHAL-GOLDSCHMIDT & RAPPAPORT, (1962)

Acid and neutral gibberellic like substance in potato tubers.

Plant. Physiol., 37 (6) ; 774.

KENTZER T. & ROWICKA H., (1963)

The use of different varieties of oat in bioassays for determination of plant growth regulators.

Acta Agrobotanica Vol. XIII (1963).

KOSHIMIZU K, IWAMURA-MITSUI-OGAWA, (1963)

Gibberellin like substances in Bamboo-shoots.

Nature G.B.-198-n° 4887-1306-1307.

LEYH C., GASPAR Th. & BOUILLENNE-WALRAND M., (1963)

Nanisme, acide gibbérollique et effecteurs auxino-
oxydases chez *Zea mays* L.

Bull. Soc. Roy. Sc. Liège, n° 5-6 (suppl.) 430-448.

MARGARA J., (1960)

Action du tween sur l'élongation de la tige du pois
de senteur nain.

Bull. Soc. Franç. Physiol. Vég. ; T6, n° 3, 166-167.

MARGARA J., (1963)

Remarques sur le rôle éventuel de "gibbérolines"
endogènes dans le déterminisme du nanisme monofac-
toriel du pois de senteur nain (*Lathyrus odoratus* L.)
et des mutants de maïs dl et d5.

Ann. Physiol. Vég., n° 5 (4) ; 249-261.

MARY RITZEL CORCORAN & PHINNEY B.O., (1962)

Changes in amounts of gibberellin-like substances
in developing seed of *Echinocystis*, *Lupinus* and
Phaseolus.

Physiol. Plant. Vol. 15 ; 252-262.

MILLAN M. & SUTER P.J. , (1958)

The occurrence of gibberellin A in higher plants :

isolation from the seed of runner bean (*Phaseolus multiflorus*).

Natur. Wis. 45-46.

MONTUELLE B., (1962)

Les Gibbérellines.

Bull. Soc. Bot. Nord de la France ; T. XV, n° 4 ; 73-90.

MONTUELLE B. & BLONDEAU R., (1963)

Rapports entre le bourgeonnement des tubercules de pomme de terre et la multiplication des bactéries qu'ils hébergent.

Bull. Soc. Bot. du Nord de la France ; n° 16, 199-202.

MONTUELLE B. & CHEMINAIS L., (1964)

Synthèse de substances du groupe des gibbérellines par des bactéries.

C.R. Acad. des Sc. de Paris ; T. 258, 6016-6017.

MONTUELLE B., (1965)

Les bactéries hébergées par les plantes supérieures. Leur localisation, leur métabolisme et ses rapports avec ce lui de la plante hôte.

Thèse Doct. Sc. Nat. - Lille Mai 1965.

NITSCH J.P. & NITSCH C., (1962)

Activité comparée de neuf gibbérellines sur trois tests biologiques.

Ann. Physiol. Vég. 4 (I), 85-97.

PHINNEY B.O., (1956)

Growth response of single-gene dwarf mutants in maize to gibberellic acid.

Nat. Acad. of Sc. ; Vol. 42, n° 4, 185-189.

PHINNEY B.O. - WEST C.A. - MARY RITZEL & PETER M. NEELEY, (1957)

Evidence for "gibberellin-like" substances from flowering plants.

Nat. Acad. of Sc. ; Vol. 43, n° 5, 398-404.

PHINNEY B.O. & WEST C.A., (1960)

Gibberellins as native plant growth regulators.

Ann. Rev. Plant Physiol. Vol II.

PHINNEY B.O., (1961)

Dwarfing genes in Zea mays and their relation to the gibberellins.

Fourth international conference. IOWA State.

Plant. Growth Regulation ; 483-487.

PHINNEY B.O. & WEST C.A.

Gibberellins and the growth of flowering plants.

Reprinted from XVIII Growth Symposium.

SUMIKI Y. & KAWARADA A., (1961)

Occurrence of gibberellin A in the water sprouts of Citrus.

Plant. Growth Regulation 483-487.

VAN OVERBEEK J. & DOWDING L.,(1961)

Inhibition of gibberellin action by auxin.

Plant. Growth Regulation (fourth international conference), IOWA State ; 657-663.

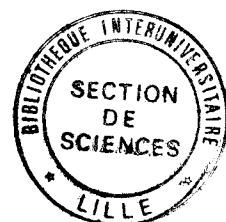
WEST C.A. & PHINNEY B.O.,(1959)

Gibberellins from flowering plants. Isolation and properties of a gibberellin from *Phaseolus vulgaris*.

J. Ann. Chem. Soc. 81 ; 2424-2427.

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION.....	1
MATERIEL ET TECHNIQUES.....	5
A - PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE.....	5
1. Composition.....	5
2. Souche bactérienne utilisée.....	6
3. Ensemencement.....	6
B - ISOLEMENT DE LA GIBBERELLINE.....	7
1. Extraction.....	7
2. Chromatographie.....	10
C - TESTS BIOLOGIQUES.....	13
1. Principe.....	13
2. Les différents tests.....	14
3. Les tests utilisés.....	17
a) le test avoine.....	17
b) le test maïs nain.....	24
RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	29
A - INFLUENCE DE L'AGE DES MILIEUX.....	30
1. Résultats obtenus par le test avoine.....	30
2. Résultats obtenus par le test maïs nain....	33



3. Comparaison des résultats et conclusion..	43
B - INFLUENCE DE LA RICHESSE DES MILIEUX EN TRYPTOPHANE.....	45
1. Résultats obtenus par le test avoine.....	45
2. Résultats obtenus par le test maïs sain.....	47
3. Dosage de trouble.....	52
4. Comparaison des résultats et conclusion..	54
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	55
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES....	58