

50376
1968
142

50376
1968
142

UNIVERSITE DE LILLE — FACULTE DES SCIENCES

Mémoire présenté en vue de l'obtention du

DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES DE SCIENCES NATURELLES

Action de substances de croissance et d'inhibiteurs
métaboliques sur la teneur en acides cétoniques
de tissus de Topinambour cultivés "in vitro".



SOUTENU A LILLE EN NOVEMBRE 1968

par Jacqueline DEBETTE

ACTION DE SUBSTANCES DE CROISSANCE ET
D'INHIBITEURS METABOLIQUES SUR LA TE-
NEUR EN ACIDES CETONIQUES DE TISSUS DE
TOPINAMBOUR CULTIVES "IN VITRO"

- ABREVIATIONS UTILISEES -

A.D.P.	: acide adénosine diphosphate
A.T.P.	: acide adénosine triphosphate
A.I.A.	: acide β -indolylacétique
2,4 D.	: acide 2,4 dichlorophénoxyacétique
A.N.A.	: acide α -naphtylacétique
CoA	: Coenzyme A
D.N.P.H.	: dinitrophénylhydrazone
P.F.	: poids frais
P.S.	: poids sec
I.R.	: intensité respiratoire
Q.R.	: quotient respiratoire
N _t	: azote total
N _p	: azote protéique
N _s	: azote soluble
ex	: explantat

Ce travail de recherche fut effectué au Laboratoire de Physiologie végétale de Faculté des Sciences de Lille.

Je tiens à manifester toute ma gratitude et à adresser mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Bouriquet, qui m'a fait confiance pendant cette année de travail.

Je remercie également, Monsieur le Professeur Hocquette, qui a volontiers accepté de présider mon jury d'examen, ainsi que Monsieur le Professeur Guillaume, pour avoir bien voulu en faire partie.

Je veux aussi exprimer toute ma reconnaissance et ma sympathie à Monsieur Rambour, qui m'a initiée aux techniques du Laboratoire, pour les précieux conseils qu'il m'a fournis.

Que tous ceux qui m'ont aidée, avec toujours beaucoup de gentillesse, trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

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

Peu de travaux ont été consacrés à l'analyse des acides organiques des tissus végétaux cultivés "in vitro". Il faut toutefois signaler ceux de Hildebrandt et Riker (18) sur des cultures de tabac, ainsi que les comparaisons faites par Scott, Burris et Riker (45) sur des tissus normaux et tumoraux de Soleil.

D'autre part, voulant démontrer l'existence du cycle tricarboxylique chez certains végétaux, Sapp (43) montre qu'en fournissant de l'acétate marqué à des tissus de galles de Soleil, on observe le marquage de l' α -cétoglutarate et du malate ; de plus il réussit à bloquer le cycle de Krebs en leur fournissant du fluoro-acétate.

Enfin, Faludi et Daniel (11) étudient l'influence du 2,4 D. sur la croissance et la teneur en acides cétoniques de tissus de pomme de terre. De fortes concentrations (toxiques) provoquent un abaissement du taux d'acides α -cétoniques, alors que de faibles doses l'augmentent.

Il nous a paru intéressant d'étudier l'influence de différents facteurs de croissance sur la teneur en acides cétoniques de tissus de Topinambour cultivés "in vitro". De nombreux travaux ont, en effet, déjà signalé que les substances de croissance naturelles et synthétiques interviennent sur le métabolisme lié à la mise en oeuvre du cycle de Krebs.

Dès 1953, Leopold et Guernsey (28) travaillant sur des mitochondries de tomate, pensaient que les auxines agissent au niveau du métabolisme de l'acétylcoenzyme A, en causant la disparition par voie enzymatique du groupement -SH libre du CoA, formant avec ce dernier un thioester. Cette hypothèse fut supplantée par des travaux récents

de Kim et Bidwell (25) montrant que l'A.I.A. intervenait sur l'entrée de l'acétate dans le cycle de Krebs par décarboxylation du pyruvate, alors que la carboxylation de celui-ci était inhibée. Ils concluaient que les auxines (A.I.A. ou 2,4 D.) avaient un effet soit sur l'opération de la co-carboxylase (enzyme à thiamine pyrophosphate), soit plus vraisemblablement sur le cycle de régénération de l'acide lipofique.

D'autre part, Sarkissian (44) montre qu'à des concentrations faibles, l'A.I.A. augmente la synthèse du citrate à partir de la condensation de l'acétyl CoA et de l'oxaloacétate, grâce à la citrate synthétase. De fortes concentrations d'auxine inhibent au contraire l'activité de cette enzyme. L'A.I.A. influe de la même manière sur une réaction du cycle glyoxylique en agissant sur la malate synthétase ; cette enzyme permet la synthèse du malate par condensation de l'acétyl CoA et de l'acide glyoxylique.

Travaillant sur des cultures de fragments de tubercules de Topinambour en présence de différentes doses d'auxine, Rambour (42) remarque, après 60 jours, la présence d'acide citramalique d'autant plus importante que la concentration en auxine est forte. Trouvé par Hulme en 1954 (20), dans la pulpe de pomme, cet acide résulte de la fixation du groupement méthyle de l'acétate sur la fonction cétonique du pyruvate par réaction d'aldolisation (Carles) (8). Le métabolisme de l'acide citramalique fut d'abord précisé chez les bactéries par Barker (1958) (36), l'enzyme mise en jeu étant décrite comme pyruvate transacétase. Puis, Jolchine (24) en 1961, montre que dans les feuilles de *Bryophyllum daigremontianum*, cet acide citramalique est un intermédiaire dans la synthèse de l'acide glutamique.

LioRET (29) en 1963, retrouve cet acide dans les tissus de Crown-gall de Scorsonère et apporte des précisions quant au mécanisme de synthèse.

Enfin, Losada, Canovas et Ruiz Amil (31) travaillant sur la levure de boulanger, ont mis en évidence une nouvelle enzyme analogue à la citrate synthétase et la malate synthétase : la citramalate synthétase qui, par l'interaction du groupement méthyle de l'acétyl CoA avec la fonction cétonique du pyruvate, catalyse la formation du citramalate. Ils ont également montré que l'oxalate, qui inhibe la carboxylation du pyruvate en oxaloacétate stimule la synthèse du citramalate, sans inhiber, toutefois, la synthèse du citrate par condensation de l'oxaloacétate et de l'acétyl CoA. Ainsi, dans la levure, le citramalate est formé par condensation directe du pyruvate et de l'acétyl CoA sans passer par le citrate ou le cis-aconitate. Et il n'est pas exclu que dans différents types d'organismes, contenant de la citramalate synthétase, la formation de glutamate emprunte une voie différente de celle de l' α -cétoglutarate.

Nous avons donc étudié, tout d'abord, les variations de teneur en acides cétoniques dans des fragments de tubercules de Topinambour cultivés en présence de doses variables de différents facteurs de croissance : A.I.A., 2,4 D. et A.N.A.

Puis, pour une dose déterminée d'A.I.A. et de 2,4 D., nous avons fait agir deux inhibiteurs spécifiques du cycle de Krebs : l'acide malonique et le fluoroacétate de sodium, de façon à provoquer éventuellement des modifications du métabolisme du glutamate et à analyser les variations en acides cétoniques des colonies tissulaires ainsi traitées.

T E C H N I Q U E S

I. CULTURES DES TISSUS DE TOPINAMBOUR.

La technique utilisée est celle décrite par Gautheret (1959) (14).

A. Les milieux de culture

Le milieu nutritif solidifié par de la gélose à 0,9 p.100, comprend du glucose (3 p.100) et les sels minéraux de la solution de Knop diluée de moitié, dont la composition est la suivante :

$(\text{NO}_3)_2$		0,5 g
NO_3K		0,125 g
$\text{SO}_4 \text{ Mg, } 7\text{H}_2\text{O}$		0,125 g
PO_4K		0,125 g
eau distillée q. s. p.f.		1000 ml

A ce milieu de culture, nous avons ajouté, selon les cas, divers facteurs de croissance : l'acide β -indolylacétique (A.I.A.), l'acide α -naphtylacétique (A.N.A.), l'acide 2,4 Dichlorophénoxyacétique (2,4 D.). Ces substances sont préparées à une concentration donnée : solution-mère (en général 10^{-3} g/ml) à partir de laquelle, par dilutions successives, on peut obtenir des concentrations plus faibles (10^{-4} 10^{-10} g/ml). Les milieux de culture sont répartis dans des tubes à essais et stérilisés à l'autoclave (20 mn à 115-120°).

Parfois, outre les substances de croissance, nous avons ajouté des inhibiteurs et ajusté le pH à des valeurs déterminées. Dans ce cas, nous avons utilisé un milieu liquide identique à celui décrit précédemment, si ce n'est qu'il ne contient pas de gélose. Les explantats sont maintenus à la surface du milieu de culture au moyen d'un support de papier filtre sans cendres selon la méthode imaginée par Heller (17).

B. Stérilisation des organes et mise en culture

Les tubercules sont épluchés et stérilisés par l'hypochlorite de calcium à 90 g/l. pendant 75 minutes. Ils sont ensuite lavés par trois bains successifs d'eau stérilisée pour éliminer la solution antiseptique. Les tissus périphériques sont tués et se décolorent. Ils sont éliminés aseptiquement ; puis, on découpe les organes en cubes aussi réguliers que possible. Ces fragments introduits dans le tube, sont enfoncés dans le milieu gélosé de 3 à 4 mm, ou bien posés sur le support en papier filtre, en prenant soin que la partie inférieure des explantats plonge dans le milieu liquide sur 1 ou 2 mm.

C. Conditions expérimentales

Après ensemencement, les tubes sont capuchonnés au moyen de papier d'étain pour éviter la dessiccation sans empêcher les échanges gazeux, puis placés dans une pièce éclairée 12 heures par jour par des tubes lumineux, dont la température est maintenue à $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Nous avons ensemencé des lots de 24 tubes, ce qui permet compte tenu des pollutions de faire des mesures sur au moins 20 explantats.

II. MESURE DE L'INTENSITÉ ET DU QUOTIENT RESPIRATOIRES

Les mesures manométriques de respiration sont réalisées avec un appareil de Warburg.

Les explantats sont placés dans des fioles de volume connu V_f , elles mêmes reliées à un manomètre contenant du liquide de Brodie, dont le volume jusqu'au trait de repère 150, est également connu : V_m .

Afin de maintenir une certaine humidité, v ml de milieu liquide ou d'eau distillée, sont introduits dans la fiole.

La pression et la température pouvant varier dans le laboratoire au cours des mesures, on prépare une fiole ne contenant aucun explantat et servant de thermobaromètre.

Les mesures s'effectuent toutes les dix minutes pendant une heure; Puisque tout le CO_2 est absorbé par de la potasse contenue dans le bras latéral de la fiole, les variations de pression traduisent l'absorption d'oxygène.

Dans les fioles contenant le matériel étudié, la variation de pression est égale à celle indiquée par le manomètre correspondant, diminuée de la variation algébrique de pression du thermobaromètre.

Le volume gazeux de l'ensemble fiole-manomètre est :

$$V = (V_f + V_m) - v$$

Soit h la variation réelle due à la réaction étudiée, le volume d'oxygène échangé est donné par la formule :

$$X_{O_2} = h \times \frac{V \times \frac{273}{T} + v \times k}{10\,000} = h \times K$$

K est une constante propre à un ensemble fiole + manomètre. Connaissant la quantité d'oxygène absorbé, le poids des explantats, la durée de l'expérience, on en déduit l'intensité respiratoire I.R., qui est exprimée en microlitres, par gramme et par heure.

Les mesures de quotient respiratoire s'effectuent de la même façon que précédemment, si ce n'est que le bras latéral ne contient pas de potasse. Ainsi le gaz carbonique n'étant pas fixé, et les variations de pression mesurées, traduisent à la fois les échanges de O_2 et de CO_2 .

Connaissant les modifications de pression dues à l'absorption d'oxygène, celles dues aux variations simultanées d' O_2 et de CO_2 , on calcule la quantité de CO_2 dégagé, h_1 étant la variation réelle correspondant au CO_2 .

Le volume de gaz carbonique est donné par :

$$X_{CO_2} = h_1 \times K_1$$

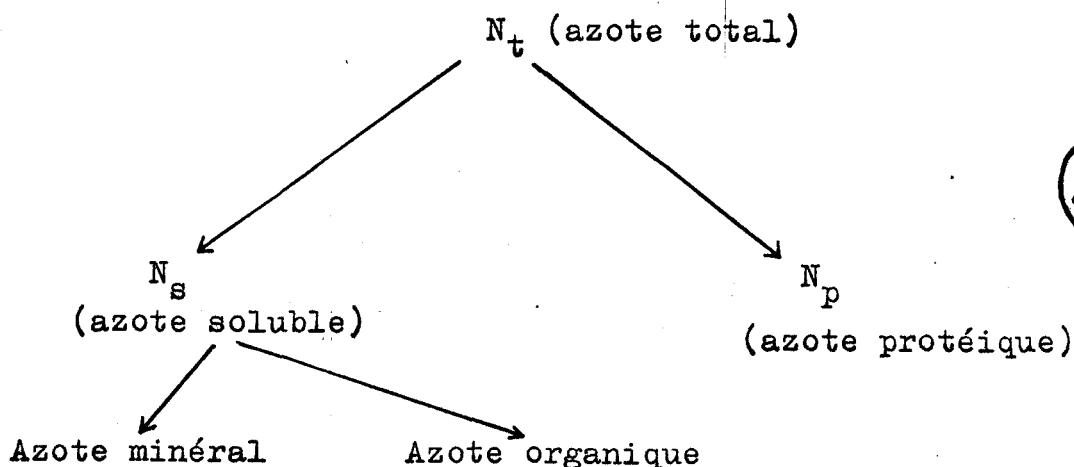
K_1 étant une constante du même ordre que K, mais concernant les échanges de CO_2 .

Exprimant le volume de CO_2 dégagé en microlitres, par gramme et par heure, le quotient respiratoire nous sera donné par le rapport de ce volume et du volume d' O_2 .

$$Q.R. = \frac{V_{CO_2}}{V_{O_2}}$$

III. ANALYSE DES COMPOSES AZOTES

Afin de rendre compte des synthèses de matière vivante au sein des colonies tissulaires, il est intéressant de doser l'azote sous ses différentes formes.



A. Technique de séparation N_s - N_p

Les colonies pesées, sont séchées par lyophilisation pendant 48 heures. Le rapport poids sec - poids frais donne le pourcentage en eau des explantats. Après dessiccation ceux-ci sont broyés dans un broyeur à billes et la poudre obtenue est passée à l'étuve à 70° C pendant 30 minutes environ, pour éliminer l'eau restante. Nous pesons 400 à 500 mg de poudre sèche à laquelle nous ajoutons 10 ml d'eau distillée ; le tout est laissé 5 minutes à température ordinaire, puis 30 minutes dans un bain-marie à 60°C.

Après avoir laissé refroidir, nous ajoutons 10 ml d'acide trichloracétique (A.T.C.A.) à 10 % pour précipiter les protéines en laissant reposer 12 heures à température ordinaire dans une fiole de 30 ml bouchée.

L'azote protéique est séparé de l'azote soluble par filtration sur verre fritté et papier filtre sans cendres, sous léger vide.

B. Méthode de minéralisation de KJELDAHL

Le résidu solide sert à déterminer l'Np, le filtrat à évaluer l'Ns. Ils sont introduits dans des ballons de Kjeldahl où nous ajoutons 10 ml de H_2SO_4 concentré et 500 mg de catalyseur au sélénium. La minéralisation est terminée 3 heures après la décoloration. Après refroidissement, nous vidons le contenu des ballons dans des fioles jaugées de 50 ml, et nous complétons à 50 ml avec les eaux de rinçage et de l'eau distillée.

C. Dosage à l'aide de l'appareil de PARNASS et WAGNER

Nous introduisons tout d'abord 5 ml de liqueur, puis 2 gouttes d'hélianthine, et enfin de la lessive de soude concentrée en excès. Nous recueillons l'ammoniac dans 10 ml d'acide borique à 2 %, puis nous dosons l'ammoniaque dans l'acide borique par HCl N/100, après avoir ajouté quelques gouttes du réactif de Tashiro qui, du rose, vire au vert au point de neutralisation. Ce réactif est composé d'une solution alcoolique de méthyl rouge à 0,2 % et d'une solution alcoolique de bleu de méthylène à 0,1 % (v/v) ; il est renouvelé tous les jours et conservé à l'abri de la lumière.

D. Calculs résultant d'un titrage acidimétrique

Soient p, le poids de poudre sèche pris au départ, exprimé en mg, et N le nombre de ml de HCl N/10 versés, nécessaires pour la neutralisation de l'ammoniaque la réaction s'écrit :



Or, 1 litre de HCl centinormal correspondant à 0,14 g d'azote, le dosage s'effectuant avec une prise de 5 ml dans 50 ml de liqueur, on en déduit la quantité d'azote contenue dans 1 g de substance sèche :

$$\frac{0,14 \times N \times 10 \times 10^3}{10^3 \times p} = \frac{1,4 \times N}{p} \quad \text{g d'azote}$$

soit $\frac{1,4 \times N \times 10^3}{p}$ mg d'azote soit soluble, soit protéique

Et l'azote total s'exprimera par la somme des deux résultats respectifs : $N_t = N_s + N_p$

IV. METHODES D'IDENTIFICATION DES ACIDES CETONIQUES

Etant donné la grande instabilité de la plupart des acides cétoniques, il est souhaitable de les transformer en composés plus stables. De tous les dérivés possibles, ce sont les dinitrophénylhydrazones (D.N.P.H.) qui ont paru les plus appropriés.

Les acides cétoniques qui nous intéressent existent à l'état pur et sont disponibles commercialement.

A. Préparation des D.N.P.H. d'acides cétoniques selon SMITH et M.J. SMITH (46)

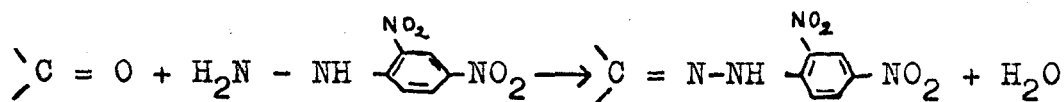
Un demi gramme d'acide cétonique est dissous soit dans 10 ml d'eau désionisée, soit dans 10 ml d'eau contenant l'équivalent de bicarbonate de sodium, selon la solubilité de l'acide.

Un léger excès d'une solution de 2,4. dinitrophénylhydrazine dans HCl 2N (à 0,5 %) est ajouté, et les D.N.P.H. commencent à cristalliser presque immédiatement. La réaction est complète en une ou deux heures à la température de la pièce ou en 20 à 30 minutes à 37°C.

Ces D.H.P.H., solubles dans l'acétate d'éthyle, sont extraits dans 20 ml environ de ce solvant.

Les solutions ainsi préparées, peuvent être conservées au réfrigérateur pendant 10 à 15 jours.

La transformation chimique à l'origine de ces dérivés, peut s'écrire :



Fonction	2,4. dinitrophényl	D.N.P.H. Hydrazone
cétone	hydrazine	

L'identification des D.N.P.H. d'acides cétoniques peut être effectuée par différents procédés.

B. La chromatographie de partage sur papier

Cette méthode a été décrite par Smith et M.J. Smith (46). Les chromatographies ascendantes sont effectuées sur papier Whatman n°4 dans des cuves placées à température constante (25°C).

Comme Smith, nous avons retenu la chromatographie unidimensionnelle : certains D.N.P.H. d'acides cétoniques (pyruvique et glyoxylique) se décomposent en effet en deux isomères qui donnent deux taches en une seule dimension et donneraient quatre taches en chromatographie bidimensionnelle.

1. Solvants

Nous avons essayé de nombreux solvants utilisés pour la chromatographie de ces composés.

- (a) n Butanol - Ethanol - Eau (70-10-20) (Smith) (46)
- (b) n Butanol - Ethanol - Ammoniaque 0,5 N (70-10-20)
type de solvant utilisé par Mme Jerebzooff-Quintin (23)
- (c) Isopropanol - Eau - Ammoniaque (200-20-10) (Smith) (4)
- (d) Phénol saturé par Na_2CO_3 à 10 % utilisé par Mme Jerebzooff-Quintin (23) et par Meister et Abendschein (33) par méthode ascendante.
- (e) Méthanol - benzène - 1 butanol - eau (40-20-20-20) (Jerebzooff-Quintin) (23) (Meister et Abendschein) (33)

La purification du phénol présentant de nombreux inconvénients et le solvant (d) n'étant pas plus satisfaisant que les autres systèmes, nous avons retenu pour la suite de nos travaux le système (c) qui donne les meilleures séparations.

2. Méthodes de localisation

Nous déposons un minimum de 5 μ g de DNP hydrazones d'acides cétoniques à 5 cm du bord d'une feuille de papier Whatman n°4 de 39,5 x 40,5 cm. Lorsque le solvant a atteint le sommet de la feuille, le chromatogramme est séché sous une hotte ventilée. Tous les D.N.P.H. hydrazones sont jaunes et 5 à 10 μ g sont aisément visibles après séchage.

Néanmoins, les D.N.P.H. absorbent la lumière dans la région des U.V., et apparaissent ainsi comme des taches sombres sur le chromatogramme. Cette méthode très sensible, permet de détecter jusqu'à 1 μ g de D.N.P.H. L'observation peut être complétée après aspersion du chromatogramme par une solution de soude alcoolique à 2 % (Smith)(46) (Jerebzoff-Quintin) (23). Ce révélateur donne une coloration des taches différente selon les acides.

3. Valeurs des Rf de D.N.P. hydrazones d'acides cétoniques témoins

D.N.P. hydrazones d'acides cétoniques	Rf Isopr./Eau/Am.	Couleurs données par le révélateur
D.N.P. hydrazine	0,98	brun pâle
OA : oxalo-acétate	0,35	brun vert
KG : céto-glutarate	0,32	verdâtre
OS : oxalosuccinate	0,31	verdâtre
P : pyruvate	0,94 / 0,85 °	brun
G : glyoxylate	0,95 / 0,76 °	rouge

° : composés donnant deux taches a/b.

Cette technique chromatographique donne une bonne séparation des acides pyruvique et glyoxylique.

C. L'électrophorèse sur papier

Nous nous sommes référés aux méthodes décrites par W.J.P. NEISH (37), et nous avons utilisé la cuve à électrophorèse SHANDON.

Afin de compléter les résultats obtenus en chromatographie, nous avons essayé différents électrolytes proposés par Neish, afin de séparer les D.N.P.H.

- (a) tampon Mc Ilvaine pH 8
- (b) carbonate de sodium 0,05 M
- (c) borate de sodium 0,05 M

Les meilleures séparations sont obtenues avec le carbonate de sodium 0,05 M. (b)

L'électrophorèse dure 3 heures pour un voltage de 314 volts, à une température de 19°C.

Nous utilisons du papier Whatman n°1 en bandes de 25 cm x 22 cm que nous partageons dans le sens de la longueur afin d'éviter une trop grande rhéophorèse.

A 4,5 cm de la cathode, nous déposons les D.N.P.H. en taches qui doivent migrer vers l'anode.

Les électrophorégrammes sont mis à sécher sous hotte ventilée et les procédés de localisation décrits pour la chromatographie, peuvent être appliqués.

D.N.P. Hydrazones d'acides cétoniques	:	Distance parcourue en cm.
OA : oxaloacétique	:	9,5
OS : oxalosuccinique	:	8,7
KG : α - cétoglutarique	:	8,8
P : pyruvique	:	7,3 / 6,5
G : glyoxylique	:	7,6 / 6,5

Les résultats montrent que chromatographie et électrophorèse se complètent et permettent une bonne identification d'un mélange de D.N.P. hydrazones.

D. Chromatographie sur couches minces

Cette technique de séparation des 2,4. D.N.P.H. d'acides cétoniques est décrite par E. Denti et M.P. Luboz (9).

Nous avons essayé comme adsorbants, le gel de silice G (25 g de silice dans 50 ml d'eau, agités pendant 30 à 45 secondes) et le gel de silice H, ainsi que la cellulose MN 300 (15 g pour 90 ml d'eau sous agitation magnétique, pendant 2 heures).

Nous avons utilisé des plaques de verre de 20 x 20 cm et y avons déposé le gel correspondant sur une épaisseur de 300 microns. L'uniformité du dépôt était réalisée avec un appareil Stratomat.

Ces plaques sont séchées à l'air pendant 5 minutes, puis à l'étuve à 110 ° pendant 30 minutes.

Les solvants successivement employés :

- (a) chloroforme - éther de pétrole (75-25)
- (b) benzène - éther de pétrole (60-40)

n'ont donné aucun résultat positif quant à la séparation des mélanges. A titre de comparaison, nous avons également employé le solvant utilisé en chromatographie sur papier (Isopr./Eau /Am.), sans résultat meilleur.

Aussi, n'avons nous pas poussé plus loin cette méthode qui ne nous apportait aucun résultat nouveau.

Cependant, pour mieux contrôler l'identification des acides cétoniques séparés, les D.N.P.H. peuvent être réduits par voie électrolytique conduisant aux acides aminés correspondants. (Jerebzoff-Smith) (46-23).

E. Réduction des D.N.P.H. en acides aminés -
Identification des composés formés.

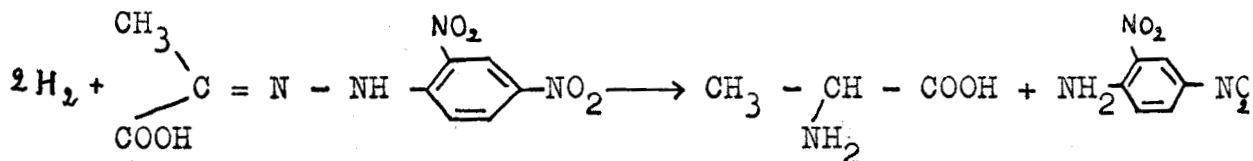
Mme Jerebsoff-Quintin pratiquait une hydrogénation catalytique (palladium-bore) (G Biserte et coll.) (4) sur les 2,4. D.N.P.H. obtenus.

Nous avons tenté d'opérer une réduction électrolytique des D.N.P.H. à l'aide de l'appareil représenté planche n°1 et utilisé par Schoonover Dohan (22). Il s'agit d'un pont KCl reliant une cathode au mercure à une anode en platine. La solution à réduire, qui comprend 1 ml de D.N.P.H. de l'acide cétonique, 6 ml d'acide acétique à 50 % et 12 gouttes d'HCl 2N, est placée sur le mercure. Le compartiment dans lequel plonge l'anode, contient de l'acide acétique à 50 %. La réduction est satisfaisante après avoir fait passer un courant de 40 mA pendant 30 minutes.

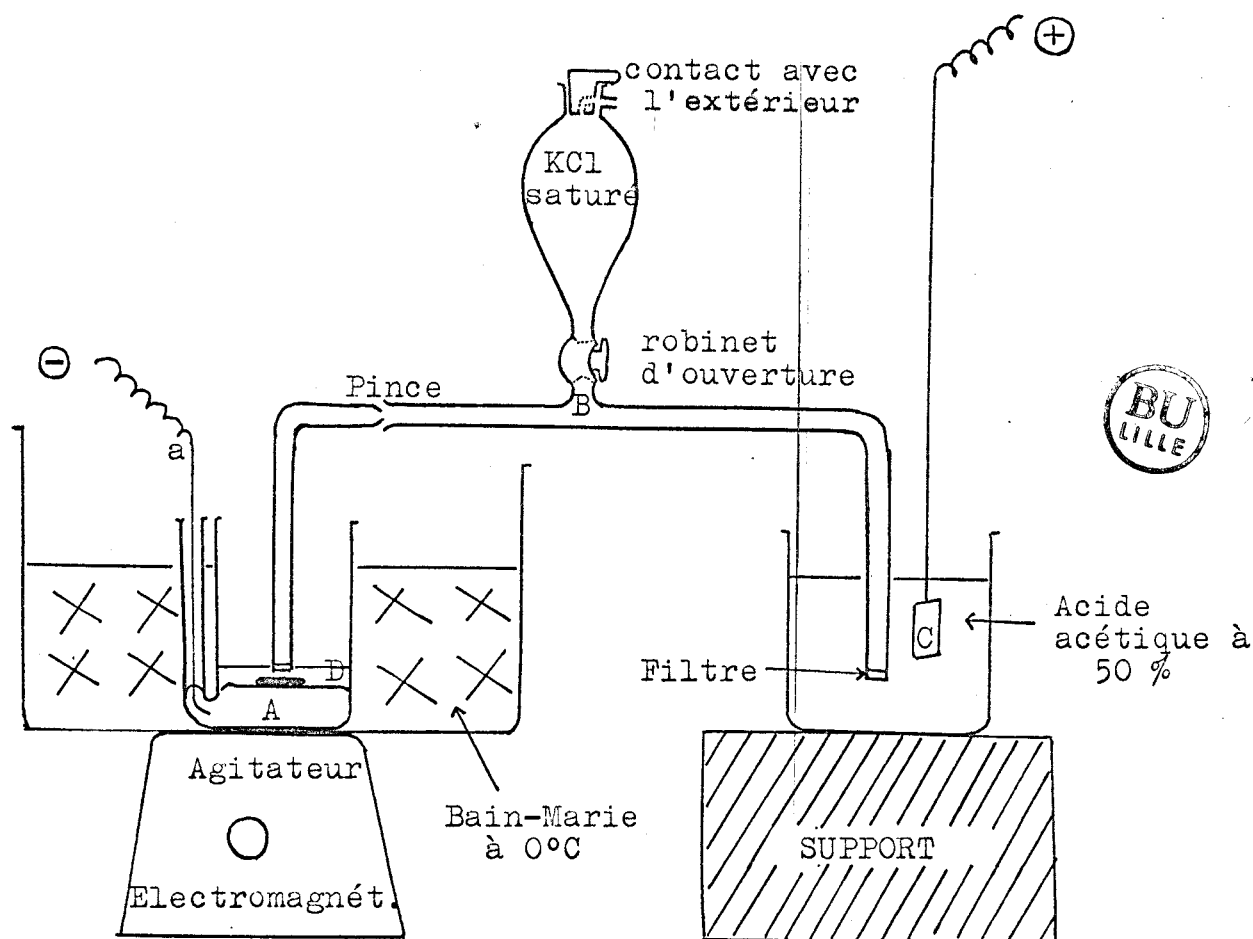
1. Produits d'hydrogénation

Par réduction, les 2,4. D.N.P.H. d'acides cétoniques sont transformés en acides aminés ; mais, si nous connaissons bien les correspondances chimiques, il est cependant possible d'obtenir pour certains composés, différents produits de dégradation.

Le 2,4 D.N.P.H. de l'acide pyruvique donne par réduction, de l'alanine.



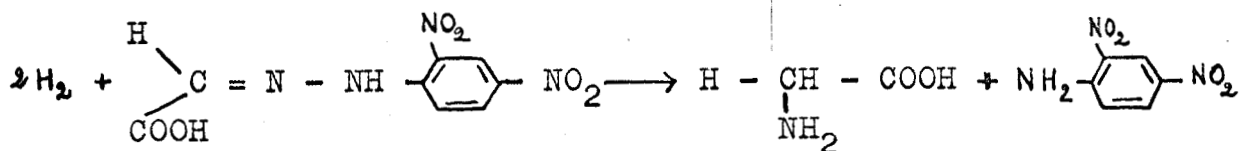
De même, le 2,4 D.N.P.H. de l'acide glyoxylique donne :



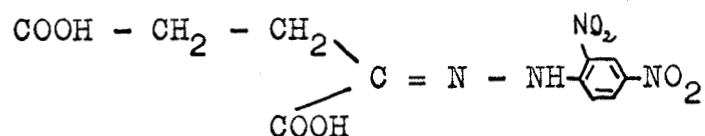
Dispositif de réduction électrolytique
à cathode au mercure.

-
- A - Mercure où plonge l'électrode correspondant à la cathode : "a"
 - B - Pont KCl
 - C - Plaque de platine correspondant à l'anode
 - D - Solution à réduire :
 - 1 ml de D.N.P. Hydrazone
 - 6 ml d'acide acétique à 50 %
 - 12 gouttes d'HCl 2N

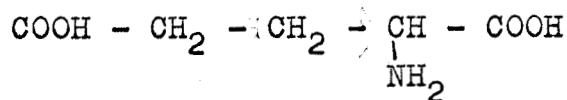
du glycocolle:



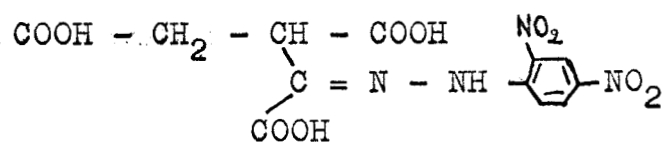
De la même façon, le 2,4 D.N.P.H. de l'acide cétoglutarique :



donne de l'acide glutamique :



Et enfin, le 2,4 D.N.P.H. de l'acide oxaloacétique :



Donne de l'acide aspartique : $COOH - CH_2 - \underset{\substack{| \\ NH_2}}{CH} - COOH$

Mais aussi, par dégradations successives, de l' α -alanine et β -alanine.

Le résultat commun de ces réductions est la 2,4 Dinitro-aniline.

2. Chromatographie des produits d'hydrogénation des D.N.P. hydrazones, par référence à des acides aminés témoins.

Les acides aminés obtenus sont séparés par chromatographie bidimensionnelle de partage sur papier, et révélés à la ninhydrine suivant la technique décrite par Biserte et coll. (4).

La chromatographie unidimensionnelle n'est pas suffisante pour séparer les acides aminés de mélanges complexes. Elle ne nous a servi qu'à titre de vérification rapide pour chaque D.N.P.H. témoin, réduit.

Les chromatographies sont réalisées avec du papier Whatman n°1. La première phase se fait par écoulement continu et descendant de la phase supérieure du solvant de Part-ridge : butanol / acide acétique / eau (4-1-5), pendant 48 heures.

Les chromatogrammes, séchés à température ambiante pendant 24 heures, sont ensuite soumis au passage, suivant une direction perpendiculaire, du second système solvant : solution aqueuse de phénol à 90 % (v/v) saturée d'eau, atmosphère d'ammoniac et d'acide cyanhydrique. La migration dure environ 18 heures.

Les chromatogrammes sont alors séchés pendant 24 heures à l'air libre, puis pendant plusieurs heures à 50°C afin d'éliminer toute trace de phénol.

Les chromatogrammes sont révélés avec le réactif à la ninhydrine (dans 100 ml de n-butanol contenant 1p.100 d'acide acétique est dissous 1 g de ninhydrine). Après un chauffage de 5 mn à l'étuve à 100°C, l'emplacement des acides aminés est marqué par l'apparition de taches bleues ou violettes.

V. EXTRACTION DES D.N.P.H. D'ACIDES CETONIQUES A PARTIR DU MATERIEL VEGETAL.

Plusieurs méthodes ont été décrites et nous avons réalisé deux d'entre elles.

A. Technique préconisée par A.I. Virtanen (48)

1. Transformation en D.N.P.H.

Dans un mortier, nous broyons 10 g de matériel avec 10 ml de NaOH 2N, qui amène le pH à environ 13. Le tout est filtré, et le mortier ainsi que le précipité sont lavés avec 200 ml d'une solution d'acide trichloracétique à 8 %. Le pH de l'extrait est ainsi porté à 1. La solution est ensuite centrifugée ; puis nous ajoutons au surnageant 10 ml d'une solution à 1 % de 2,4 Dinitrophénylhydrazine dans SO_4H_2 5N. Ce mélange est laissé à la température du laboratoire pendant 1 heure.

2. Extraction des DNPH

La solution de D.N.P.H. est agitée avec de l'acétate d'éthyle jusqu'à ce que l'on ne puisse plus obtenir de composé coloré. Puis, nous agitons les extraits avec de petites quantités de CO_3Na_2 jusqu'à ce que les nouvelles phases sodiques soient incolores.

A celles-ci nous ajoutons SO_4H_2 2N jusqu'à ce que la réaction soit acide. Nous extrayons ensuite les composés jaunes avec de l'acétate d'éthyle et nous séchons avec SO_4Na_2 anhydre pendant une nuit ; le sel est alors séparé et lavé avec une petite quantité d'acétate d'éthyle.

Les solutions combinées d'acétate d'éthyle sont ensuite évaporées sous vide jusqu'à environ 1 ml.

L'élimination des acides gras qui pourraient empêcher la migration chromatographique des D.N.P.H., se fait sur une colonne constituée en quantités égales de "bentonite" et de "célite 545".

B. Technique recommandée par Isherwood (21)

Isherwood et Niavis qui ont critiqué certaines méthodes, non satisfaisantes quantitativement, fondaient leur technique sur le principe selon lequel : "il est meilleur d'arrêter l'activité enzymatique en refroidissant à basse température, puis d'inactiver les enzymes par traitement chimique tandis qu'ils sont en état d'arrêt".

Le matériel végétal (5 à 10 g) placé dans une capsule métallique est congelé par un mélange de neige carbonique et d'acétone pendant 3 mn.

1. Précipitation des D.N.P.H.

Les explantats congelés sont mis dans 50 ml d'acide métaphosphorique à 5 %, maintenu à 0°C, et broyés à grande vitesse. Après broyage, on laisse macérer le tout pendant 10 mn. Le mélange est centrifugé à une température voisine de 0°C pendant 10 mn à 10500 tours/minute. Les culots sont repris par 50 ml d'acide froid, et centrifugés de nouveau. Une troisième opération identique est faite lors de recherches quantitatives.

Nous ajoutons à l'extrait 20 ml de dinitrophénylhydrazine à 1 % dans SO_4H_2 5N (conservé au froid et renouvelé chaque semaine) ; le tout est laissé à la température ambiante pendant 1 ou 2 heures, ou bien à 37°C pendant 20 mn.

2. Extraction des D.N.P.H.

Les D.N.P.H. qui ont précipité sont ensuite extraits par 40 ml d'éther dépourvu de peroxydes. L'extraction est renouvelée trois fois. L'extrait étheré est alors agité avec un léger excès de solution saturée de NaHCO_3 (environ 40 ml), de telle sorte que le pH reste définitivement alcalin. Une seconde extraction est effectuée avec 15 ml de NaHCO_3 et les émulsions qui ont pu se former, sont éliminées. L'extrait bicarbonaté est alors acidifié avec SO_4H_2 3N de telle sorte que le pH final atteigne 2.

Les D.N.P.H. qui se trouvent alors en milieu acide sont extraits en 3 fois, avec du chloroforme lavé à l'eau et contenant 15 % d'éther (v/v).

3. Reprise des composés dans l'acétate d'éthyle

Le solvant est éliminé par passage d'air froid ventilé et l'extrait organique jaune, cristallisé sur les parois des fioles, est dissous dans 0,5 ml d'acétate d'éthyle.

En fait, cette méthode diffère peu de la précédente, mais à l'essai, elle s'est révélée nettement plus efficace, vraisemblablement par suite de la fixation du matériel végétal à basse température, ce qui évite des réactions secondaires.

Aussi avons-nous mis en application cette technique pour la suite de nos travaux.

VI. APPRECIATION QUANTITATIVE DES ACIDES CETONIQUES CONTENUS DANS LE MATERIEL VEGETAL

Ayant mis au point une technique de réduction électrolytique satisfaisante pour des D.N.P.H. d'acides céto-

niques témoins, nous avons pensé évaluer la quantité d'acides cétoniques d'après la détermination quantitative des acides aminés obtenus.

A. Détermination quantitative des acides aminés produits par réduction des D.N.P.H. d'acides cétoniques

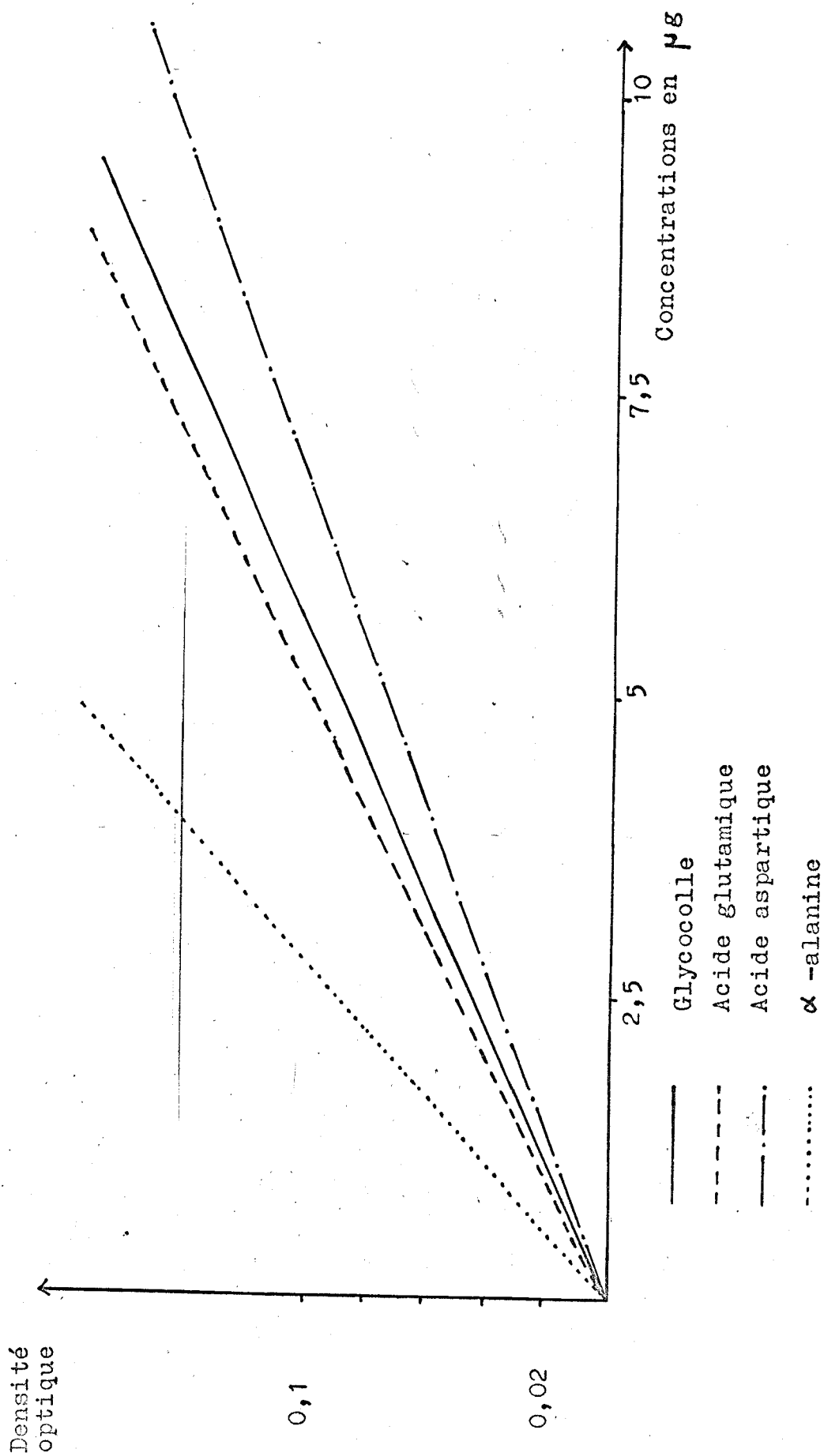
Lederer propose une détermination directe sur papier, procédérapide et facile. Cette méthode est basée sur la comparaison visuelle des taches après une chromatographie monodimensionnelle. Il s'agit de comparer sur le même chromatogramme la dimension et l'intensité de coloration de la tache formée par un acide aminé avec une gamme témoin obtenue avec des quantités connues de ce même acide.

Néanmoins, la précision d'une telle méthode est faible ; elle ne peut être utilisée que d'un point de vue semi-quantitatif. Jerebzooff-Quintin (23), après chromatographie sur papier et révélation des acides aminés, évalue ceux-ci par densitométrie selon la technique décrite par Biserte, Dautrevaux et Boulanger (5).

Il est indispensable d'opérer dans une atmosphère exempte d'ammoniac et de construire des courbes témoins pour chaque acide aminé.

1. Conditions opératoires

La révélation des chromatogrammes doit se faire toujours dans les mêmes conditions et d'une façon un peu différente de celle pratiquée habituellement. Après séchage, les chromatogrammes sont trempés dans le réactif à la ninhydrine dont la formule est : (Bell et al.) (3).



Intensité de la coloration à la ninhydrine d'acides aminés témoins
en fonction de leur concentration.



- 10 g de ninhydrine
- 900 ml d'acétone
- 100 ml de tampon phosphate 0,05 M de pH 7
 - { phosphate disodique 0,390 g/l
 - { acide citrique 0,960 g/l

Les chromatogrammes sont ensuite égouttés et séchés pendant 1 heure dans une atmosphère dépourvue d'ammoniac, puis mis à l'étuve à 37°C pendant 15 heures.

Les surfaces englobant la totalité de la coloration et des surfaces voisines de même dimension servant de témoins, sont découpées dans le chromatogramme et éluées chacune par 5 ml d'acétone contenant 25 % d'eau ; le tout est agité de façon discontinue pendant 20 mn.

Les débris de papier sont séparés par centrifugation ou par simple sédimentation et l'intensité de coloration est mesurée immédiatement au spectrophotomètre, à 5750 Å, contre le témoin. Biserte signale que la précision obtenue par cette méthode est de l'ordre de 10 % pour de nombreux acides aminés.

2. Etablissement de courbes témoins d'acides aminés connus.

Nous avons préparé des solutions d'acides aminés (acide aspartique, acide glutamique, glycocolle, α-alanine, β-alanine) en dissolvant 20 ml de ceux-ci dans 10 ml d'isopropanol à 10 %, nous obtenons donc des solutions mères à $2 \cdot 10^{-3}$ g/ml.

En opérant par dilutions successives, nous appliquons des séries de taches de 10 µl. sur les chromatogrammes. Les résultats de l'éluion sont exprimés par des courbes traduisant la densité optique en fonction d'une concentration donnée (planche n°2).

3. Détermination quantitative des produits d'hydrogénation des D.N.P.H. d'acides cétoniques témoins

Nous avons préparé des D.N.P.H. d'acides pyruvique, glyoxylique, α -cétoglutarique et oxaloacétique, selon la technique décrite précédemment. Ces solutions témoins de D.N.P.H. ont une concentration de $27 \cdot 10^{-3}$ g/ml. Pour chacune d'entre elles, nous prélevons 1 ml qui est soumis à la réduction électrolytique, pendant un temps déterminé. Celle-ci terminée nous recueillons les 7 ml placés sur le mercure ; 10 μ l. de cette solution sont utilisés pour la chromatographie. Le solvant est un mélange : butanol - acide acétique - eau (4 - 1 - 5). Les différents acides aminés sont élués ; la densité optique lue au spectrophotomètre, nous donne par référence aux courbes moyennes des témoins, la concentration correspondante de l'acide aminé produit par réduction. Les courbes de référence nous permettent d'écrire :

10 μ l. de solution réduite $\longrightarrow$ x μ g d'acide aminé
 donc : 7 ml de solution réduite $\longrightarrow$ 0,7.x mg d'acide aminé
 soit : 27 mg d'acide cétonique $\longrightarrow$ 0,7.x mg d'acide aminé correspondant.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

27 mg d'acide cétonique	poids molécul.	Quant. d'ac. aminé obt.	pds. mol. des A.A.	Rend %
ac. glyoxylique	74,04	0,92 mg	75,07	3 %
ac. oxalo-acétique	188,18	1,43 mg	133,10	4 %
ac. α -cétoglutarique	146,10	1,72 mg	147,13	7 %
ac. pyruvique	88,06	1,43 mg	89,09	5 %

Ces résultats n'étaient pas très encourageants pour une éventuelle évaluation quantitative de différents acides cétoniques, d'autant plus que dans ce cas, nous avons réduit des solutions de D.N.P.H. de concentration très élevée. Nous avons renouvelé ces expériences et également vérifié que la solution de D.N.P.H. avait été entièrement réduite. Pour cela, nous avons soumis la solution à réduire à une chromatographie de partage sur papier, afin d'identifier les DNPH d'acides cétoniques. Aucune trace de ces composés n'a pu être détectée, si ce n'est au front du solvant, une tache fluorescente aux U.V. qui pourrait être due à la présence de dinitroaniline mêlée aux dinitrophénylaminoacides.

Mais au cours de ces expériences, nous nous sommes rendus compte que la concentration en acides cétoniques n'était pas seule à intervenir au cours d'une telle réduction électrolytique. Le temps de la réduction intervenait également. Aussi, avons-nous tenté de préciser le temps de réduction produisant un rendement maximal.

Nous nous sommes aperçus (planche n°3) que cette technique était soumise à une grande variabilité et qu'il fallait reproduire des conditions expérimentales très précises et toujours rigoureusement identiques. Cependant, nous n'avons jamais obtenu de rendement supérieur à ceux signalés précédemment. Aussi, pour la suite de nos travaux, nous n'avons utilisé ce procédé de réduction électrolytique que comme un élément supplémentaire de détermination qualitative.

B. Technique de détermination quantitative directe des D.N.P.H.

La méthode précédente ne permettant pas une bonne estimation des acides cétoniques contenus dans un matériel végétal, nous avons cherché à mettre au point une méthode plus directe. Nous l'avons établie en modifiant des

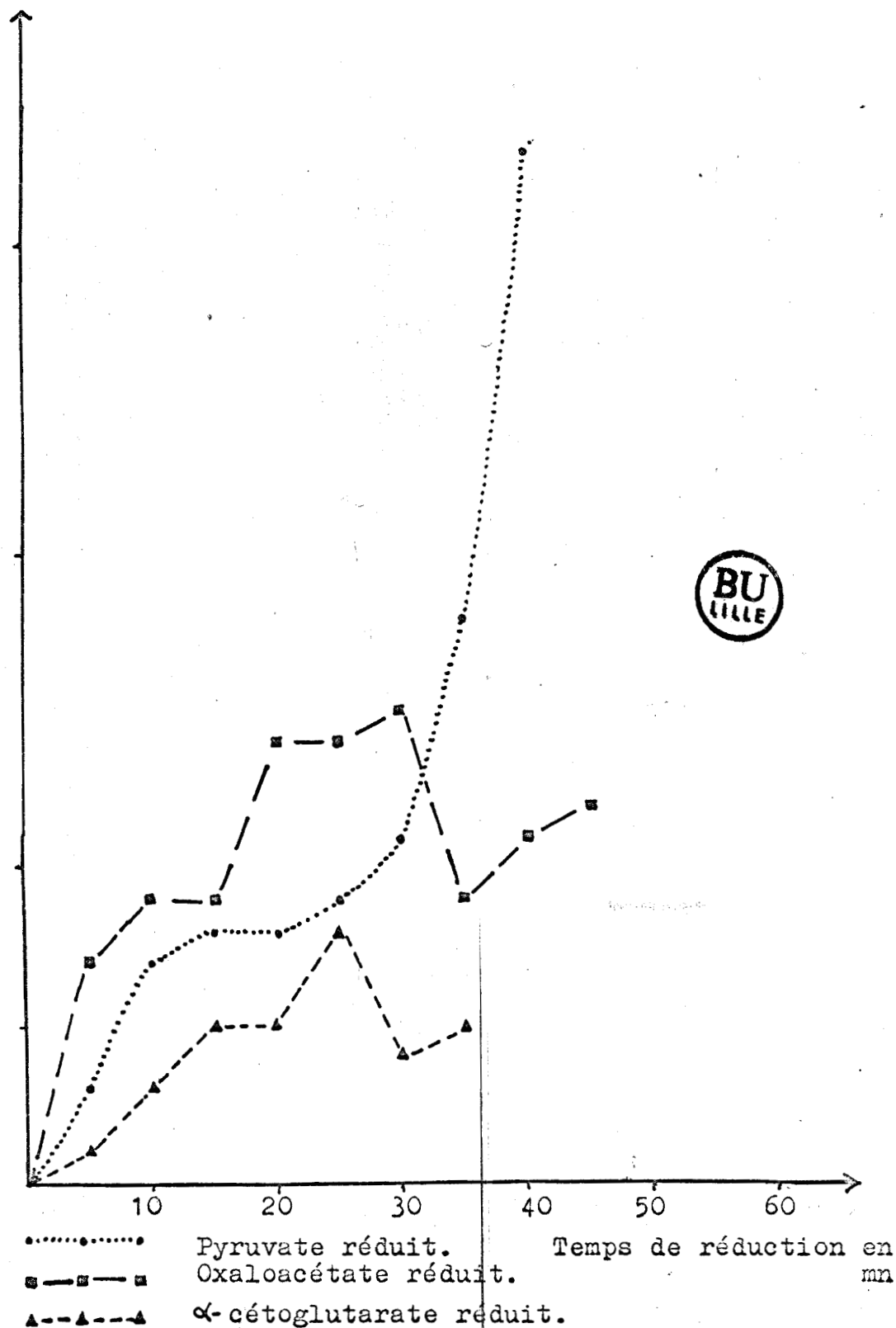
Densité
optique

0,03

0,02

0,01

0,005



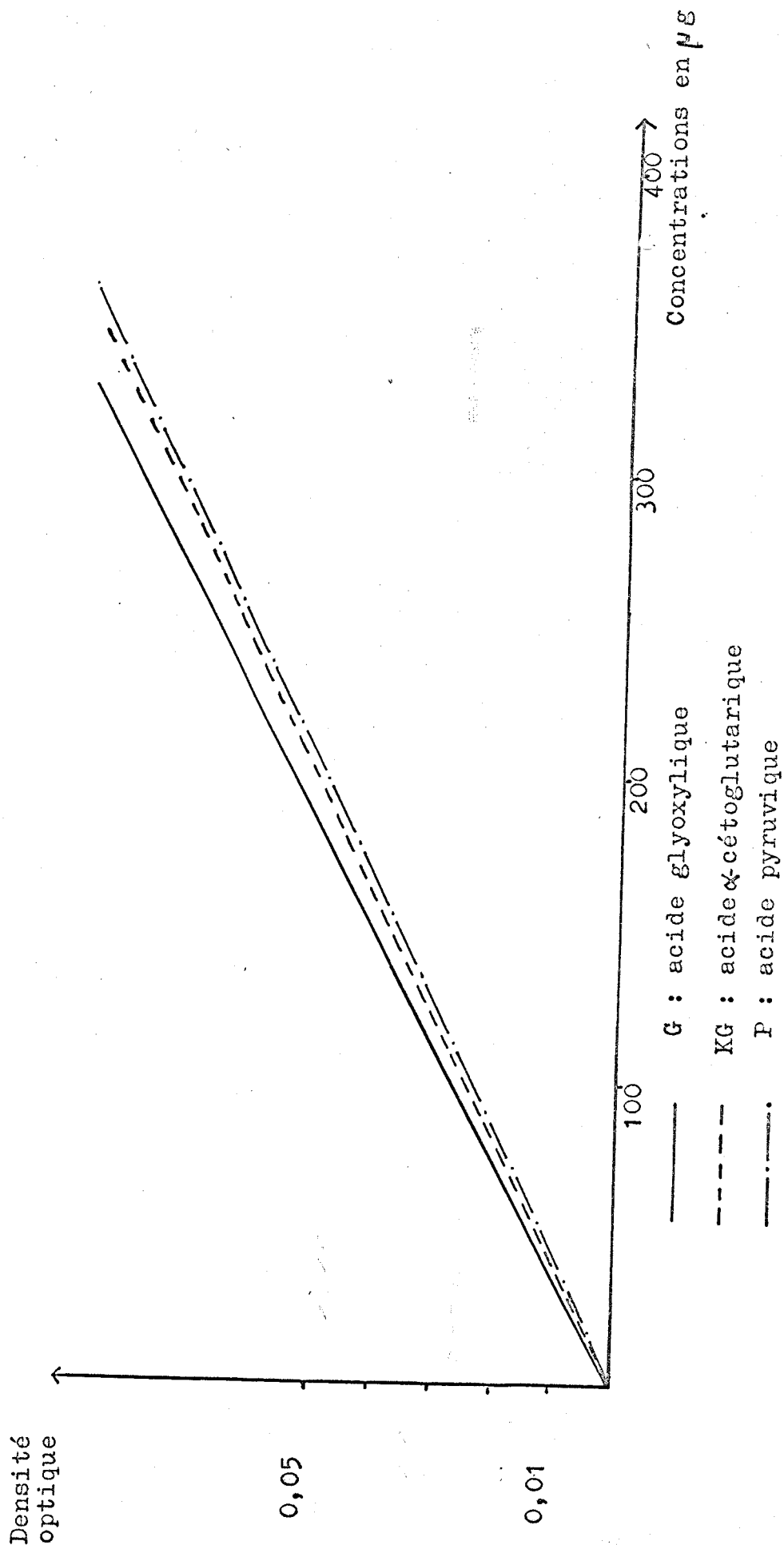
Variations de la quantité de D.N.P.H. réduit
en fonction du temps de réduction.

procédés de densitométrie énoncés par Umheit, Burris et Stauffer (47) pour les adapter à notre technique d'extraction des D.N.P.H. Il s'agit d'une méthode de référence à des courbes moyennes de D.N.P.H. témoins de concentrations déterminées, établies après lecture au spectrophotomètre. Nous effectuons donc une gamme de solutions de concentrations différentes (5 à 10 μ g par tache) pour chacun des D.N.P.H. témoins, et nous les soumettons à une chromatographie ou une électrophorèse. Afin de nous placer dans les conditions de séparation les meilleures, nous chromatographions les acides pyruviques et glyoxyliques et soumettons les acides oxaloacétique et α -cétoglutarique à une électrophorèse. Après séchage, nous délimitons les surfaces colorées aux U.V. ainsi que des surfaces voisines de même dimension. Celles-ci sont découpées dans le papier et éluées dans deux ml. de carbonate de sodium à 10 %. Nous agitons de façon discontinue jusqu'à ce que la coloration jaune soit totalement passée dans la solution carbonatée. Nous éliminons les débris de papier par sédimentation ou par centrifugation, et nous ajoutons à la solution carbonatée, 2 ml de NaOH 2N.

Les colorations sont mesurées immédiatement au spectrophotomètre à 5200 Å, par comparaison avec les témoins.

Plusieurs expérimentations, nous ont permis d'établir des courbes moyennes pour chacun des D.N.P.H. concernés (planche n°4).

Pour déterminer la teneur en acides cétoniques d'un matériel végétal, nous évaluons, selon cette technique, la densité optique pour chacun des D.N.P.H. séparé par chromatographie ou par électrophorèse. Par référence aux courbes moyennes, nous en déduisons la quantité de chacun des acides cétoniques, que nous exprimons définitivement en mg par gramme de poids frais, en micromoles par 100 g de poids frais ainsi qu'en mg par mg d'azote protéique.



Intensité de la coloration d'acides cétoniques témoins
en fonction de leur concentration.



RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. ACTION DE DIFFERENTES SUBSTANCES DE CROISSANCE (A.I.A., 2,4 D. , ET A.N.A.) SUR DES FRAGMENTS DE TUBERCULES DE TOPINAMBOUR, VARIETE "VIOLET DE RENNES", CULTIVES "IN VITRO"

Dans les différents cas étudiés, les fragments de parenchymes vasculaires de taille sensiblement identique, sont cultivés pendant 45 jours.

A. Effet de différentes concentrations d'acide β -indolylacétique

1. Sur la croissance et le métabolisme azoté (planche n°5 - tableau I)

Le choix d'un seul critère de croissance fut longuement critiqué, car chacun d'eux - que ce soit le poids frais (P.F.), le poids sec (P.S.), ou la quantité d'azote protéique (Np) - n'exprime qu'un aspect de la croissance qui est un phénomène complexe.

Aussi, avons-nous utilisé simultanément plusieurs modes d'expression afin de tirer des conclusions valables (thèses de Lance et de Ménoret) (27) (34).

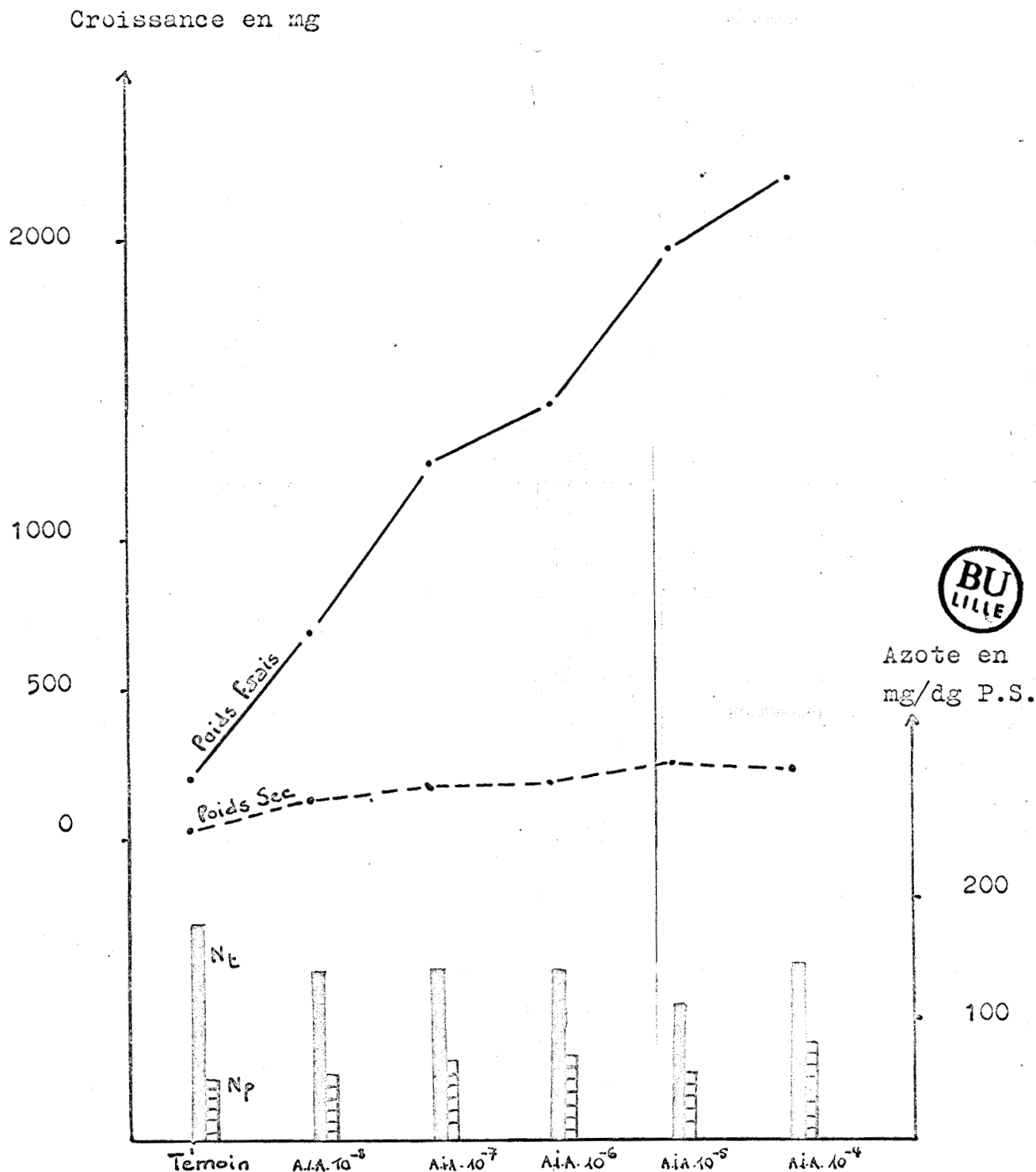
En ce qui concerne les variations en P.F., les résultats de nos expériences montrent une nette augmentation de la croissance pondérale d'autant plus importante que la concentration en A.I.A. est plus forte. (Gautheret) (14).

Les variations en P.S. suivent les précédentes avec néanmoins une légère différence pour 10^{-4} g/ml d'auxine.

Milieux	Eau	N_t mg/ex	N_p mg/ex	$\frac{N_p}{N_t}$
Sans A.I.A.	77 %	4,29	1,25	29 %
A.I.A. 10^{-8} g/ml	80,4%	3,82	1,52	40 %
A.I.A. 10^{-7} g/ml	86 %	3,91	1,78	46 %
A.I.A. 10^{-6} g/ml	87,3%	3,12	1,56	50 %
A.I.A. 10^{-5} g/ml	87,3%	4,25	1,93	45 %
A.I.A. 10^{-4} g/ml	89,6%	3,63	1,94	53 %



Effets de différentes concentrations d'A.I.A.
sur la teneur en eau et le métabolisme azoté
des tissus de Topinambour.



Variations de la croissance pondérale et de la teneur en azote des tissus de Topinambour cultivés pendant 45 jours en présence de différentes concentrations d'A.I.A.

En effet, la teneur en eau s'élève considérablement en présence de concentrations de plus en plus fortes d'A.I.A.

Ceci montre clairement que ce facteur de croissance implique pour des concentrations élevées une importante absorption d'eau. (Ménoret) (34).

Nous observons également une augmentation en N_p pour des concentrations de plus en plus fortes d'auxine sauf à 10^{-5} g/ml lorsque cette quantité d'azote est exprimée en mg par gramme de P.S. et non en mg par explantat, ce qui est lié à une croissance en poids sec moins exaltée que celle en poids frais.

En présence d'A.I.A. la teneur en N_t des tissus diminue, mais cette diminution n'est pas fonction de la concentration d'auxine. Lance (27) a d'ailleurs constaté qu'en présence d'A.I.A., la teneur en azote total diminue d'autant plus rapidement que la croissance est active. Il attribue cette diminution à la dilution dans la masse des tissus de la quantité d'azote apportée par le milieu de culture.

Quant au rapport N_p/N_t , il augmente en présence d'auxine, atteignant 50 % pour les concentrations les plus fortes, ce qui traduit une protéogénèse intense.

2. Sur la respiration (tableau II - planche n°6)

L'intensité respiratoire est d'autant plus importante que la concentration en A.I.A. est plus élevée. La stimulation, dans nos expériences, semble optimale pour 10^{-4} g/ml d'A.I.A. alors que Lachaux (26) ne pouvait distinguer un maximum entre 10^{-8} et 10^{-4} g/ml d'auxine.

Milieux	I.R. ml/g PF/h.	I.R. ml/ex/h.	I.R. ml/mg Np/h.	Q.R.
Sans A.I.A.	25,3	24,1	3,9	1,06
A.I.A. 10^{-8} g/ml	34,5	52,7	5,1	0,95
A.I.A. 10^{-7} g/ml	32,9	55,8	4,2	1
A.I.A. 10^{-6} g/ml	61,6	122,6	7,1	0,9
A.I.A. 10^{-5} g/ml	73,2	180,4	8,9	0,96
A.I.A. 10^{-4} g/ml	100,3	222,7	9,6	0,88



Effets de différentes concentrations d'A.I.A. sur la respiration des tissus de Topinambour.

On peut se demander si cette exaltation respiratoire est en relation avec l'intensité de la croissance. Lance (27) estime que le rôle de l'auxine est d'abord d'agir sur la croissance, et la stimulation respiratoire ne serait qu'une conséquence de cette croissance.

Le quotient respiratoire reste voisin de l'unité, avec toutefois une nette tendance à devenir légèrement inférieur à 1 pour les fortes concentrations d'A.I.A., ce qui suggère que le catabolisme emprunte une autre voie que celle des glucides.

3. Sur la teneur en acides cétoniques (tableau III - planche n°6)

La quantité totale des acides cétoniques diminue très nettement en présence d'auxine, en particulier pour toutes les concentrations supérieures à 10^{-8} g/ml.

Pris séparément, le glyoxylate, le plus abondant des 3 acides identifiés, voit sa teneur baisser considérablement pour les fortes concentrations d'A.I.A., sauf à 10^{-4} g/ml.

Le pyruvate baisse également, mais de façon moins sensible que l'acide cétonique précédent.

L' α -cétoglutarate diminue en teneur par rapport aux témoins pour des concentrations physiologiques d'A.I.A.

En ce qui concerne le glyoxylate, il faut rappeler les travaux de Sarkissian, (44) Selon cet auteur, l'A.I.A., aux fortes concentrations (10^{-4} M.) inhibe la synthèse du malate en agissant sur la malate synthétase. Cette enzyme est nécessaire à la synthèse du malate par condensation d'acétyl CoA sur le glyoxylate.

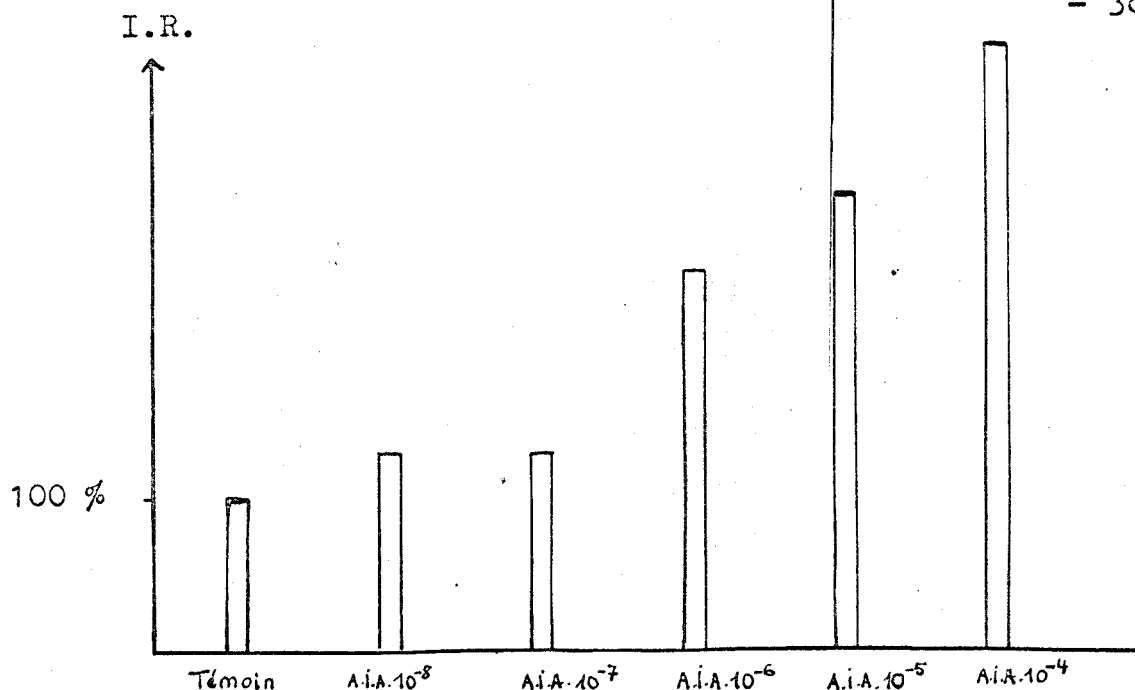
Ainsi pourrait s'expliquer la disparition très nette du glyoxylate pour des concentrations d'A.I.A. de 10^{-8} g/ml à 10^{-5} g/ml, le glyoxylate étant utilisé pour la synthèse du malate. Pour une dose de 10^{-4} g/ml, la voie du cycle glyoxylique étant bloquée

Milieux	PYRUVATE mg/gP.F. μ mole/ 100 g	GLYOXYLATE mg/gP.F. μ mole/ 100 g	ACETOGLUTARATE mg/gP.F. μ mole/ 100 g	TOTAL mg/gP.F. μ mole/ 100 g
Sans A.I.A.	0,544	1,420	0,556	2,520
A.I.A. 10^{-8} g/ml	0,367	1,176	0,346	1,889
A.I.A. 10^{-7} g/ml	0,130	0,292	0,094	0,516
A.I.A. 10^{-6} g/ml	0,200	0,321	0,286	0,807
A.I.A. 10^{-5} g/ml	0,340	0,319	0,388	1,047
A.I.A. 10^{-4} g/ml	0,173	0,684	0,568	1,425

Action de différentes concentrations en A.I.A. sur la teneur en acides cétoniques des tissus de Topinambour.

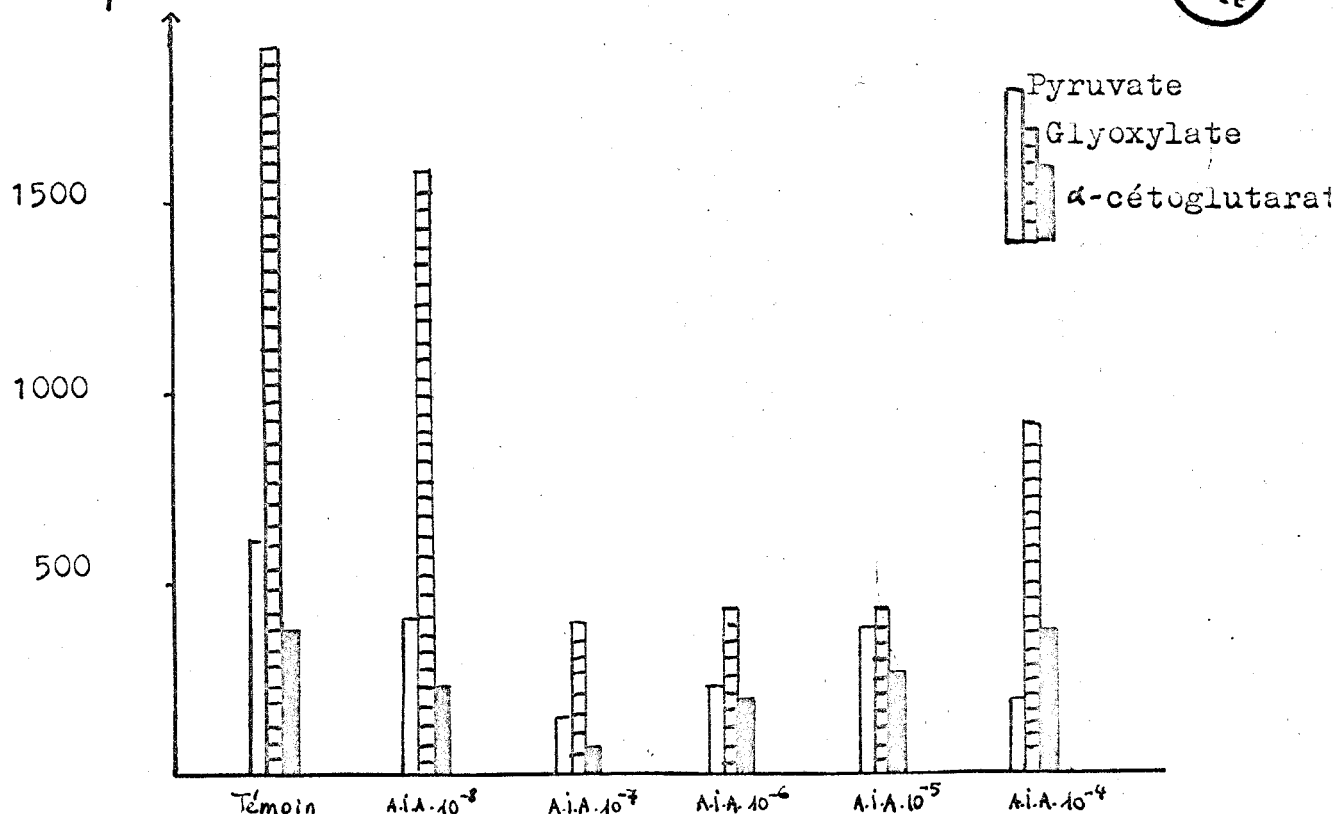


TABLEAU III



I.R. calculée en mg/g P.F. /h et exprimée en %
par rapport au témoin.

μ moles/100 g P.F.



Intensité respiratoire et teneur en acides cétoniques
des tissus de Topinambour cultivés en présence de
différentes concentrations d'A.I.A.

au niveau de la malate synthétase, le glyoxylate commence à s'accumuler.

B. Effet de différentes concentrations d'acide 2,4 Dichlorophénoxyacétique.

1. Sur la croissance et le métabolisme azoté (tableau IV - planche n°7)

Le graphique résumant les variations en P.F. montre une augmentation de celui-ci en fonction des concentrations croissantes en 2,4. D. , avec un seuil de croissance pour 10^{-9} g/ml de 2,4 D. et un maximum pour 10^{-7} g/ml. Au delà de cette concentration le facteur de croissance devient toxique, et une transformation hyperhydrique s'opère au niveau des cellules.

Ces résultats concordent donc avec ceux de Gautheret (14).

Les variations en P.S. sont analogues aux précédentes .

Nous constatons une absorption d'eau d'autant plus grande que la concentration en 2,4 D. est élevée. Ces effets sont intimement liés à l'action de ce facteur de croissance (thèse de Ménoret) (34).

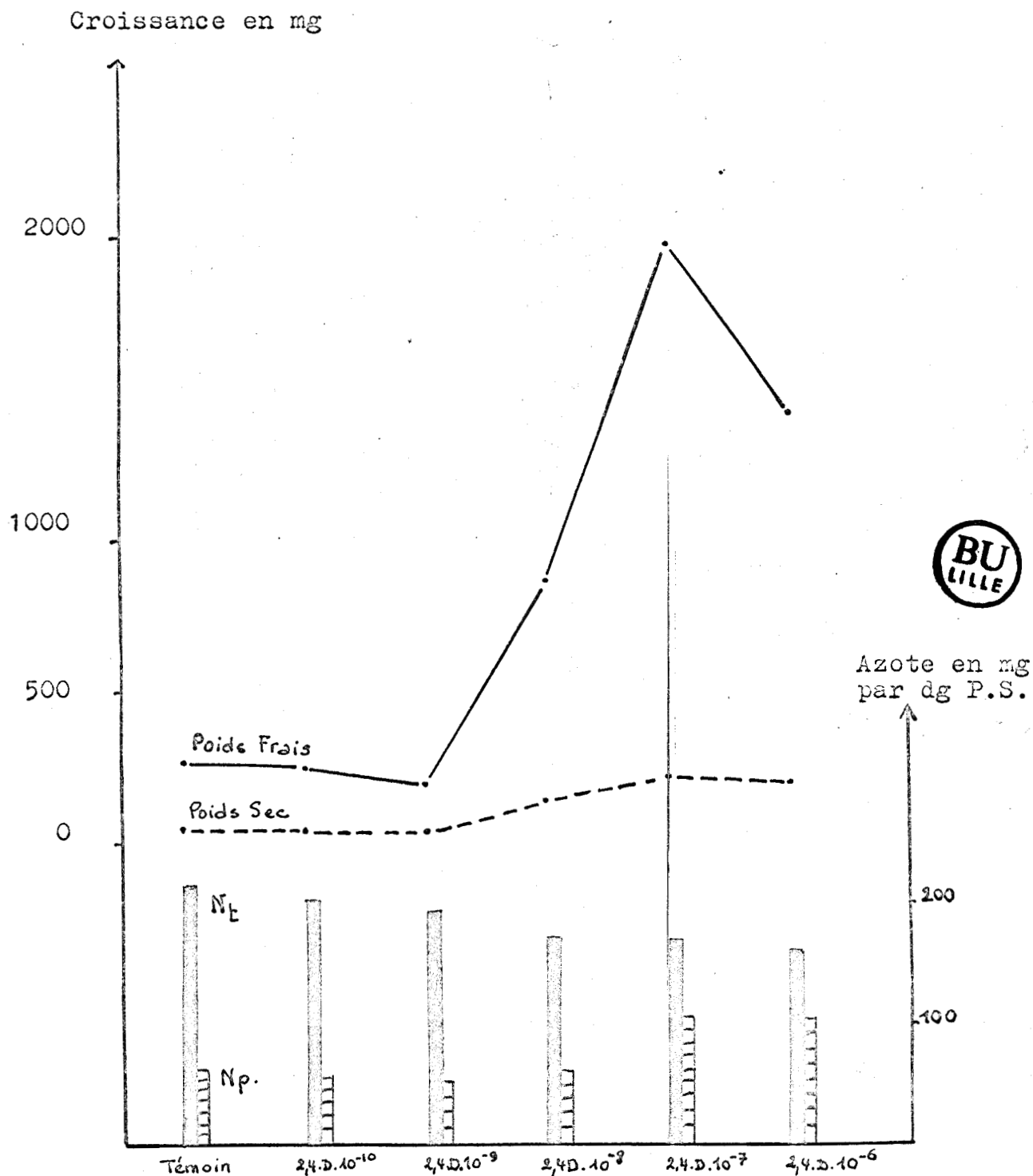
Les variations en Np suivent rigoureusement celles de la croissance pondérale, ce qui traduit un accroissement considérable de la quantité de matière vivante pour les plus fortes concentrations de 2,4 D. :

Nos expériences confirment les conclusions de Ménoret (34) et soulignent que le 2,4 D. provoque toujours une diminution de la teneur en Nt. L'ensemble de ces résultats montre que, cultivés en présence de 2,4 D., les tissus de Topinambour s'enrichissent en Np au détriment de l'azote aminé soluble. Quant au rapport Np/Nt, il augmente considérablement pour des concentrations élevées des facteurs de croissance, ce qui indique que la

Milieux.	H ₂ O	N _t mg/ex.	N _p mg/ex.	$\frac{N_p}{N_t}$
Sans 2,4 D.	79,7 %	4,19	1,25	30 %
2,4 D 10 ⁻¹⁰ g/ml.	83,6 %	3,60	1,02	28 %
2,4 D 10 ⁻⁹ g/ml.	77,9 %	4,10	1,15	28 %
2,4 D 10 ⁻⁸ g/ml.	83,7 %	4,54	1,67	36 %
2,4 D 10 ⁻⁷ g/ml.	89,4 %	5,43	3,45	63 %
2,4 D 10 ⁻⁶ g/ml.	85,4 %	5,54	3,60	65 %

Effet de différentes concentrations de 2,4 D sur
la teneur en eau et le métabolisme azoté des tissus
de Topinambour.

TABLEAU IV



Variations de la croissance pondérale et de la teneur en azote des tissus de Topinambour cultivés pendant 45 jours en présence de différentes concentrations de 2,4 D.

prolifération des tissus s'accompagne d'une protéogénèse accrue. Ainsi, "le 2,4 D. freinerait l'assimilation azotée sans toutefois ralentir la synthèse des protéines" (Ménoret) (34).

2. Sur la respiration (tableau V - planche n° 8)

L'intensité respiratoire augmente considérablement avec des concentrations croissantes en 2,4 D., et nous remarquons que ces variations suivent parallèlement celles de la croissance en P.F., avec une stimulation optimale pour une concentration de 10^{-7} g/ml de 2,4 D. Le quotient respiratoire est toujours légèrement inférieur à 1 comme en présence d'A.I.A. Mais ceci ne nous donne pas d'indications précises sur le substrat respiratoire car le rapport N_p/N_t traduit une protéogénèse très marquée.

3. Sur la teneur en acides cétoniques (tableau VI - planche n°8)

La teneur globale en acides cétoniques, sauf pour 10^{-9} g/ml, diminue régulièrement en fonction des doses croissantes des 2,4 D., ce qui confirme les résultats de Faludi - Daniel (11), qui, pour des concentrations toxiques de 2,4 D., observent une diminution de la teneur en acides cétoniques, et en particulier de l' α -cétoglutarate. L'interprétation de cette baisse en acides cétoniques ne pouvait être précisée qu'en connaissant la teneur en acides aminés des explantats. Le glyoxylate diminue de façon importante avec des doses croissantes de 2,4 D. Le pyruvate décroît légèrement; quant aux variations de la teneur en α -cétoglutarate, elles sont irrégulières : 10^{-8} g/ml de 2,4 D. provoque une augmentation, puis

Milieux	I.R. ml/g PF/ h	I.R. ml/ex/h.	I.R. ml/mg Np/h	Q.R.
Sans 2,4 D	25,3	24,1	3,9	1,06
2,4 D 10^{-10} g/ml	40,3	43,6	7	0,93
2,4 D 10^{-9} g/ml	69	66,2	12,7	0,94
2,4 D 10^{-8} g/ml	95,7	156,5	15,1	0,93
2,4 D 10^{-7} g/ML	177,7	537,1	16,5	0,89
2,4 D 10^{-6} g/ml	171	436,1	16,3	0,92



Effets de différentes concentrations de 2,4 D sur la respiration des tissus de Topinambour.

des doses croissantes de la substance de croissance le font diminuer.

Pour Faludi-Daniel, la désamination des acides aspartique et glutamique, leur transformation en acides cétoniques correspondants, puis l'utilisation de ces acides cétoniques comme substrats de la respiration cellulaire, résulteraient de la transformation induite par le 2,4 D. Cependant, une telle interprétation ne semble pas devoir être retenue pour nos expériences. En effet, les valeurs de Q.R. inférieures à 1, ne permettent pas de penser à l'utilisation des acides cétoniques dans la respiration.

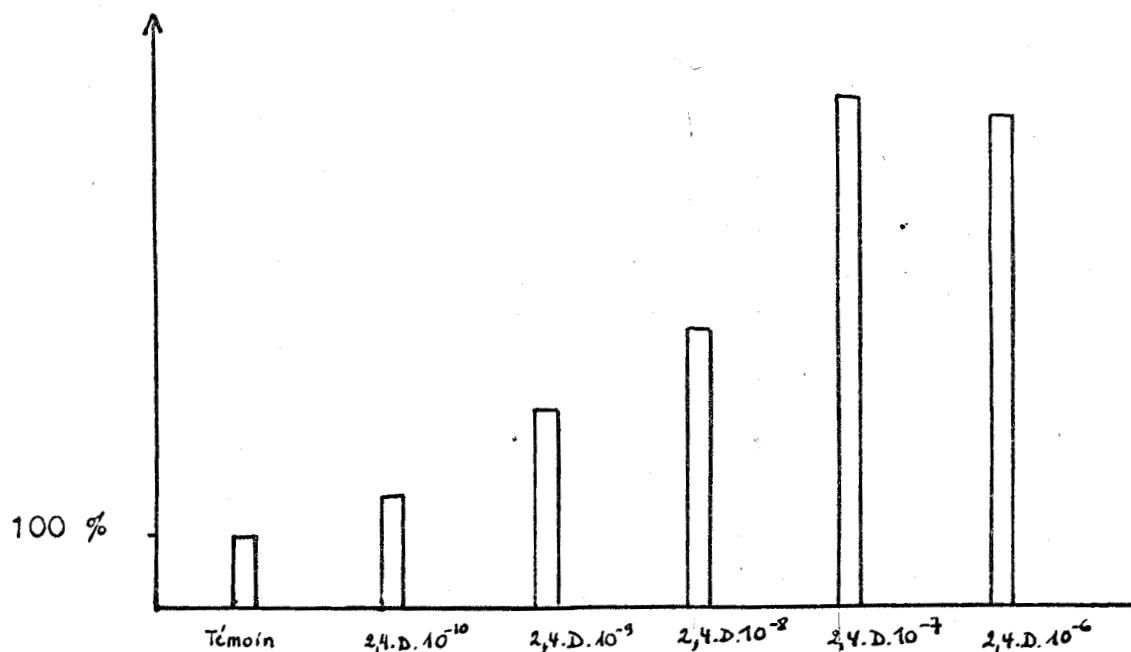
Humphreys et Dugger (20) expliquent la stimulation de la respiration observée chez des graines de Pois cultivées en présence de 2,4 D., par un important catabolisme du glucose par la voie des pentoses - phosphates. Black et Humphreys (6) précisent cette voie préférentielle du catabolisme du glucose en comparant l'activité de différentes enzymes intervenant à ce niveau et en remarquant que l'utilisation du ribose - 5 - phosphate et la formation de l'heptulose sont augmentées. Cette explication peut paraître plus séduisante dans la mesure où le "shunt" des hexoses monophosphates conduit à la formation de ribose - 5 - phosphate, nécessaire à la formation de nucléotides et donc de matière vivante, ce qui expliquerait l'accroissement du rapport Np/Nt.

Milieux	PYRUVATE		GLYOXYLATE		α -CETOGLUTARATE		TOTAL	
	mg/gPF	μ mole/ 100 g	mg/gPF	μ mole/ 100 g	mg/gPF	μ mole/ 100g	mg/gPF	μ mole/ 100 g
Sans 2,4 D.	0,504	570	1,408	1902	0,800	547	2,712	3019
2,4 D. 10^{-10} g/ml	0,201	228	0,795	1074	0,807	552	1,803	1854
2,4 D. 10^{-9} g/ml	0,096	109	0,150	203	0,178	122	0,424	434
2,4 D 10^{-8} g/ml	0,209	237	0,428	578	1,270	870	1,907	1685
2,4 D 10^{-7} g/ml	0,119	135	0,363	490	1,174	803	1,656	1428
2,4 D 10^{-6} g/ml	0,171	194	0,319	430	0,500	342	0,990	966

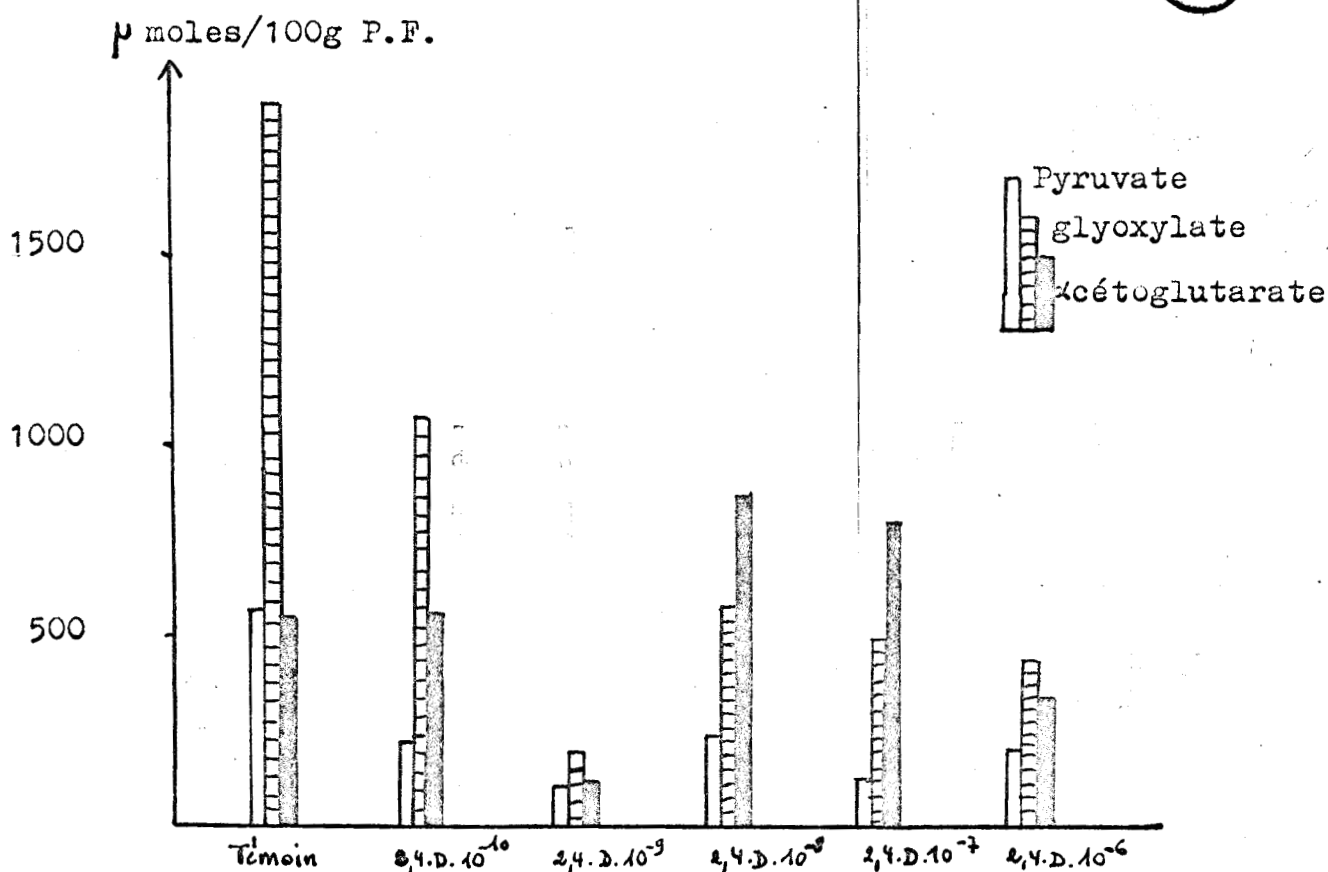
Action de différentes concentrations en 2,4 D. sur la teneur en acides cétoniques des tissus de Topinambour.



TABEAU VI.



I.R. calculée en mg/g P.F./ h et exprimée en % par rapport au témoin.



Intensité respiratoire et teneur en acides cétoniques des tissus de Topinambour cultivés en présence de différentes concentrations de 2,4 D.

C. Effet de différentes concentrations d'acide
 α -naphtylacétique

1. Sur la croissance et le métabolisme
azoté (tableau VII - planche n°9)

L'acide α -naphtylacétique stimule la prolifération des explantats, son action est optimale à 10^{-6} g/ml ; au delà il devient toxique. Les variations du poids frais et du poids sec se font de façon similaire.

Le pourcentage en eau s'élève avec les fortes concentrations d'A.N.A. (environ 90 %), sans toutefois noter de grandes différences pour chacune d'elles.

Ces résultats sont similaires à ceux de Lioret (29) travaillant sur des fragments de racines de Scorsonère cultivés "in-vitro" ; il remarquait des teneurs en eau particulièrement élevées pour des concentrations d'A.N.A. de 10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-4} g/ml.

La quantité de Np varie de la même façon que le P.F. ; donc la croissance pondérale s'accompagne d'une synthèse de matière vivante accrue.

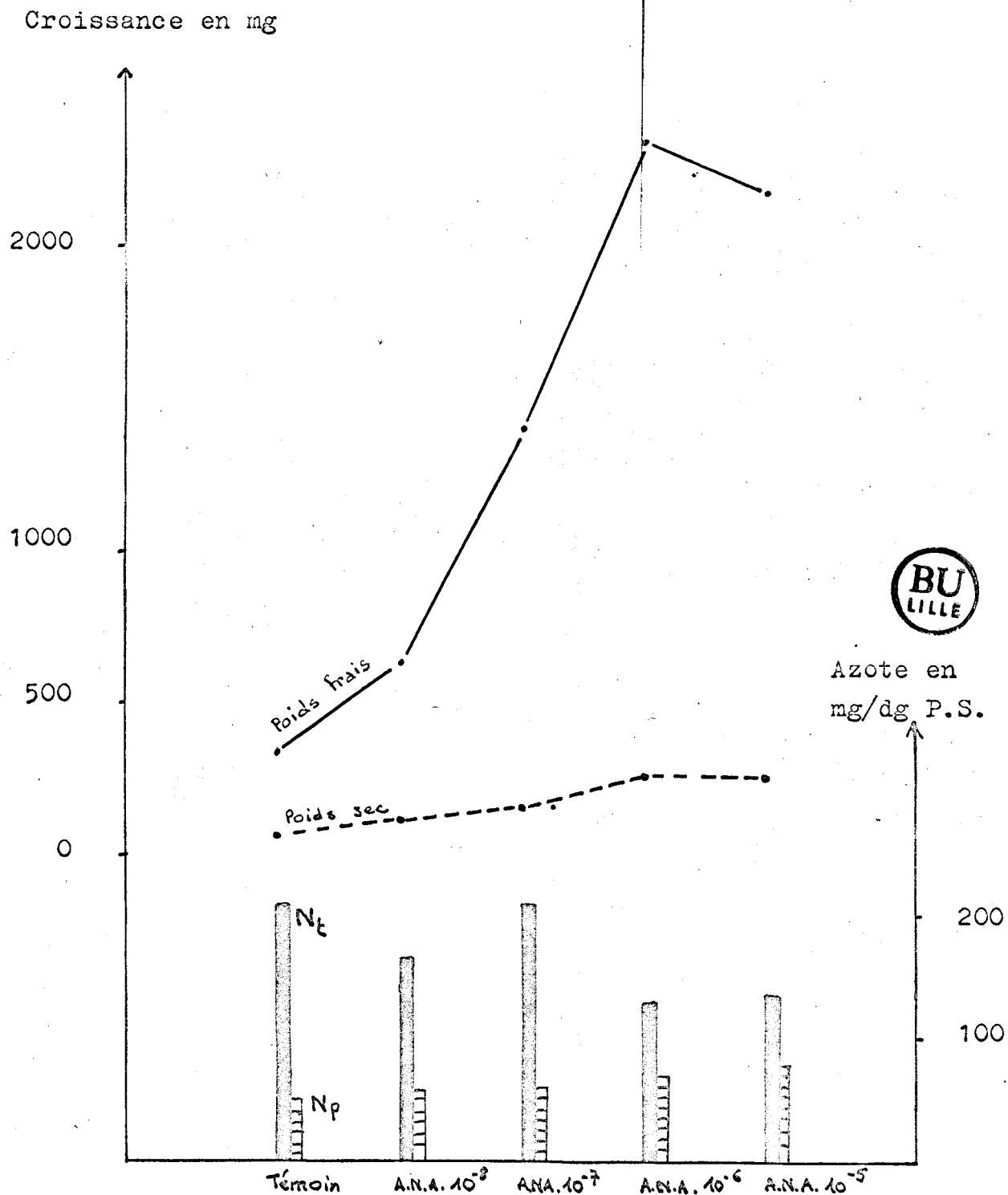
Comme le notait déjà Lioret pour le xylème de racines tubérisées de Scorsonère cultivées in vitro, il y a en présence de fortes concentrations d'A.N.A., une diminution notable en Ns. Cela s'accompagne d'une diminution en Nt qui devient même inférieure à la quantité initiale aux concentrations de 10^{-6} et 10^{-5} g/ml. Lioret explique ce fait par "une excrétion des substances azotées dans le milieu".

Le rapport Np/Nt (qui traduit la proportion d'azote incorporé sous forme protéique), est d'autant plus grand que la concentration en A.N.A. est plus forte. La protéogénèse serait donc plus intense en présence de 10^{-6} et 10^{-5} g/ml d'A.N.A.

Milieux	Eau	N_t mg/ex	N_p mg/ex	$\frac{N_p}{N_t}$
Sans A.N.A.	81,7%	6,38	1,3	32 %
A.N.A. 10^{-8} g/ml	82,2%	4,72	1,6	34 %
A.N.A. 10^{-7} g/ml	89 %	5,43	1,54	28 %
A.N.A. 10^{-6} g/ml	88,7%	4,18	2,33	56 %
A.N.A. 10^{-5} g/ml	88,3%	4,39	2,5	57 %



Effets de différentes concentrations d'A.N.A. sur
la teneur en eau et le métabolisme azoté des tissus
de Topinambour.



Variations de la croissance pondérale et de la teneur en azote des tissus de Topinambour cultivés pendant 45 jours en présence de différentes concentrations d'A.N.A.

2. Sur la respiration (tableau VIII -
planche N° 10)

Comme le préconise Lioret (30), nous exprimons dans chacun des tableaux, l'intensité respiratoire, de différentes façons. Ainsi, l'I.R. rapportée à un explantat traduit les échanges gazeux globaux, l'I.R. rapportée à 1 g de P.F. ne tient pas compte de variations relatives dans la composition de la matière végétale. Lioret exprime de plus l'I.R. rapportée à la teneur en azote protéique, pour laquelle il accorde le plus d'intérêt. Nous considérons toujours ces résultats globalement, ceux-ci variant dans les mêmes proportions dans la plupart des cas. Les graphiques sont établis en n'utilisant que l'I.R. /g de P.F. en référence aux témoins de chaque série.

Dans le cas présent, l'I.R. augmente d'autant plus que la concentration en A.N.A. est élevée. Selon Bonner, l'action des auxines s'exerce indirectement sur les échanges respiratoires. (Pilet) (39).

Quant à la valeur du Q.R., elle est toujours inférieure à 1, ce qui semble indiquer qu'après 45 jours de culture, le catabolisme emprunte une autre voie que celle des glucides (protides par exemple). Une légère protéolyse est possible, puisqu'à ce stade les explantats sont déjà sénescents. Toutefois, les valeurs du rapport N_p/N_t ne permettent pas d'appuyer cette hypothèse.

3. Sur la teneur en acides cétoniques
(tableau IX - planche n°10)

La teneur globale en acides cétoniques des tissus cultivés en présence d'A.N.A. présente de nombreuses fluctuations, et il est difficile d'en tirer des conclusions simples sur l'influence des différentes doses de ce

Milieux.	I.R. ml/g PF/h.	I.R. ml/ex/h.	I.R. ml/mgNp/h.	Q.R.
Sans A.N.A.	37,78	52,66	6,05	0,88
A.N.A. 10^{-8} g/ml.	41,62	66,30	7,36	0,95
A.N.A. 10^{-7} g/ml.	47,39	111,55	7,98	0,92
A.N.A. 10^{-6} g/ml.	97,86	282,13	13,70	0,89
A.N.A. 10^{-5} g/ml.	105,83	291,24	13,69	0,96



Effets de différentes concentrations d'A.N.A.
sur la respiration de tissus de Topinambour.

TABLEAU VIII.

Milieux	PYRUVATE mg/g PF μ mole/100 g	GLYOXYLATE mg/g PF μ mole/100 g	α CETOGLUTARATE mg/g PF μ mole/100 g	TOTAL mg/g PF μ mole/100 g
Sans A.N.A.	0,084	0,303	traces	0,387
A.N.A. 10^{-8} g/ml	0,074	0,373	0,277	0,724
A.N.A. 10^{-7} g/ml	traces	0,110	traces	0,110
A.N.A. 10^{-6} g/ml	0,043	0,216	0,325	0,584
A.N.A. 10^{-5} g/ml	traces	0,160	traces	0,160

Effets de différentes concentrations d'A.N.A. sur la teneur en acides cétoniques des tissus de Topinambour.



facteur de croissance.

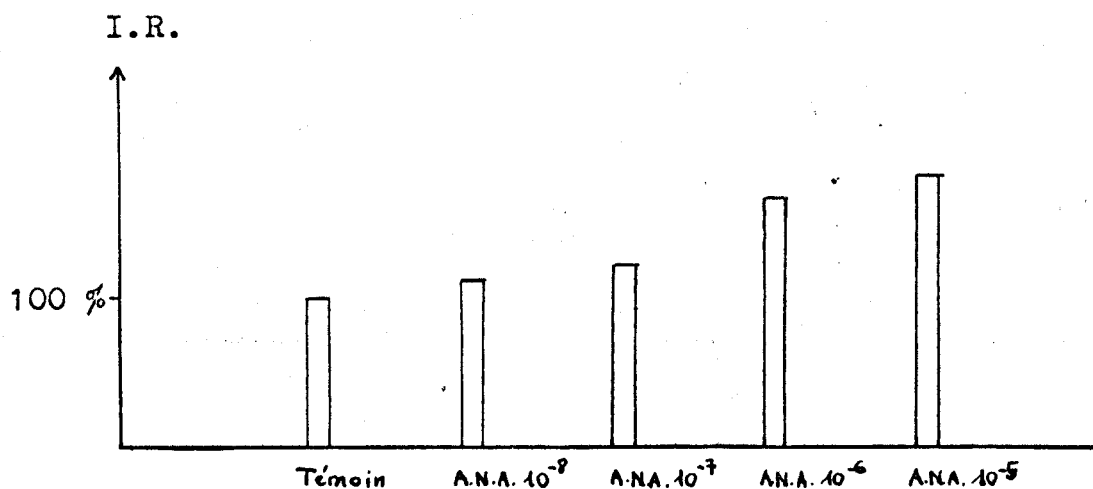
Si nous considérons séparément ces acides, nous constatons que le glyoxylate diminue pour des concentrations élevées d'A.N.A., la valeur optimale étant observée à 10^{-8} g/ml. Il en est de même pour le pyruvate, qui disparaît même à certaines concentrations. Quant à l' α -cétoglutarate, nous ne pouvons expliquer les fluctuations diverses. Toutefois, là où le pyruvate et l' α -cétoglutarate disparaissent, nous pourrions penser que les transaminations sont augmentées ; l'augmentation en Ns pour 10^{-7} g/ml d'A.N.A. appuierait cette hypothèse. Mais ce n'est plus le cas en présence de 10^{-5} g/ml d'A.N.A., concentration pour laquelle ces acides cétoniques ne sont qu'à l'état de traces. Toutefois, les acides aminés formés peuvent déjà être utilisés pour la synthèse des protéines, l'augmentation en Np, à cette concentration, en serait une preuve.

D. Conclusion sur l'action des différents facteurs de croissance.

D'une façon générale, les facteurs de croissance, en même temps qu'ils stimulent la prolifération cellulaire, augmentent l'intensité respiratoire.

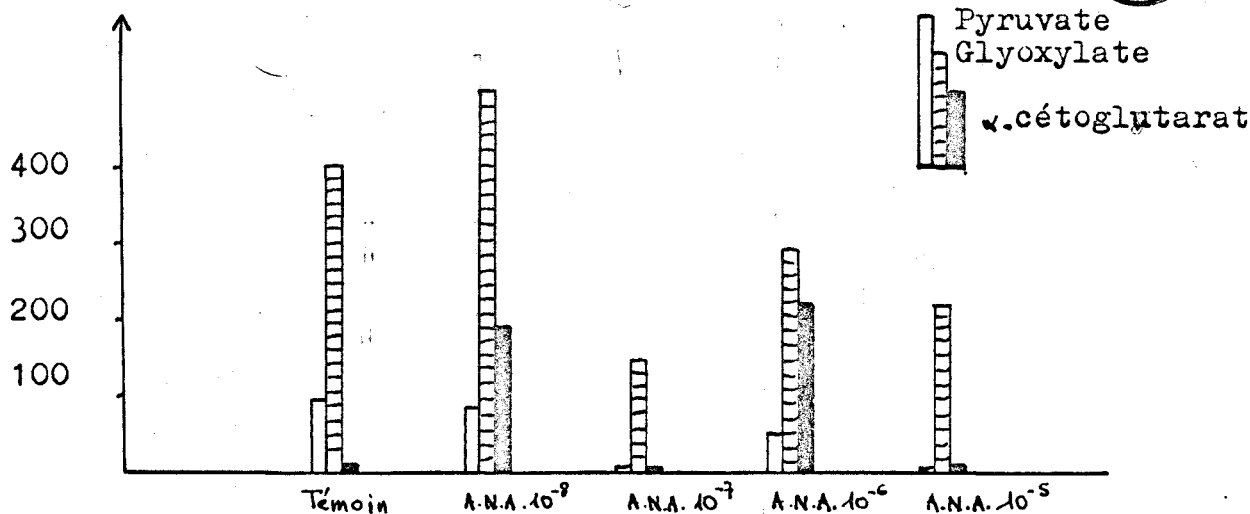
Les valeurs de Q.R. souvent légèrement inférieures à 1, pourraient indiquer après 45 jours de culture, l'utilisation des substances azotées comme substrats respiratoires.

Les fortes concentrations d'auxine provoquent un accroissement du rapport Np/Nt, qui traduit l'incorporation de matière vivante. Il faut cependant rappeler que Durantou (10) a montré qu'en présence d'auxine l'arginine des tubercules de Topinambour était rapidement transformée en proline, puis en hydroxyproline, constituant important d'une protéine des parois cellulaires végétales. L'hydroxyproline ainsi formée, est incorporée dans la membrane au fur et à mesure de la sénescence.



I.R. calculée en mg/g P.F./h et exprimée en % par rapport au témoin.

μ moles/100g P.F.



Intensité respiratoire et teneur en acides cétoniques des tissus de Topinambour cultivés en présence de différentes concentrations d'A.N.A.

L'A.I.A. et le 2,4 D. agissent de façon assez comparable sur la teneur en acides cétoniques, les fortes concentrations en font diminuer la teneur globale. L'action de l'A.N.A. est moins nette.

D'une façon générale, la quantité d'acide glyoxylique est réduite par les doses élevées de substance de croissance. Deux explications s'offrent à nous : - ou les explantats possèdent des enzymes nécessaires au fonctionnement du cycle glyoxylique et la disparition du glyoxylate s'expliquerait par une mise en route ou une accélération de ce cycle, - ou l'auxine provoque la réduction du glyoxylate en glycolate.

L'acide pyruvique décroît également avec les doses croissantes des facteurs de croissance. Nous pouvons alors penser que cette disparition est liée à l'accélération du cycle de Krebs, qui se traduit par un accroissement de l'intensité respiratoire.

L'acide α -cétoglutarique ne subit pas de variations régulières selon les diverses substances de croissance employées. Les résultats que nous possédons sont trop fragmentaires pour que nous puissions donner une interprétation valable. Retenons cependant que l' α -cétoglutarate est impliqué dans la synthèse de l'acide glutamique, et que cet acide participe assez curieusement à des phénomènes de cyclisation qui conduisent à la formation d'hydroxyproline. (Duranton) (10). D'autre part, les auxines interviennent sur les phénomènes de décarboxylation de l' α -cétoglutarate, semblables d'ailleurs à ceux du pyruvate. (Kim et Bidwell) (25).

II. ACTION DE L'ACIDE MALONIQUE, PUIS REVERSION DE L'INHIBITION PAR L'ACIDE SUCCINIQUE.

A. Résultats montrant les effets du malonate additionné au milieu de culture.

Inhibant spécifiquement une étape du cycle de Krebs - la déshydrogénation du succinate - l'acide malonique a joué un rôle déterminant dans la découverte du fonctionnement de ce cycle, et de son importance dans les oxydations respiratoires.

L'acide malonique n'est actif que dans des limites très précises, car seule la forme non dissociée est inhibitrice. (Beevers) (1) Celle-ci n'existe qu'à des pH inférieurs à 5, et de plus, Lance a remarqué que l'I.R. des tissus diminue rapidement dès que le pH du milieu réactionnel tombe en dessous de 3,5. Aussi faut-il étudier l'inhibition respiratoire dans des conditions très précises de pH.

L'action du malonate sur les tissus de Topinambour fut étudiée par Lance (27) à 3 concentrations: $3 \cdot 10^{-3}$, 10^{-2} et $3 \cdot 10^{-2}$ M. au seul pH 4.

Nous avons expérimenté en milieu liquide à pH 4, l'inhibition du malonate sur des explantats témoins, des explantats cultivés en présence de 10^{-5} g/ml d'A.I.A. et de 10^{-7} g/ml de 2,4D or, les concentrations molaires les plus fortes employées par Lance, se sont révélées inactives vis à vis de l'inhibition respiratoire.

Plusieurs possibilités peuvent être envisagées:

- ou bien l'acide malonique se trouve dissocié ou dégradé au cours de l'autoclavage, et par conséquent inactif.
- ou bien la durée de l'expérience (7 jours) est trop longue et permet au malonate d'être métabolisé.
- ou bien les concentrations employées ne sont pas suffisantes.

Les conditions expérimentales dans lesquelles nous avons opéré, sont différentes de celles de Lance (27). Nous mettons en culture des explantats plus gros pesant environ 750 mg, constitués de cylindres de 7 mm de diamètre et 9 mm de hauteur, en particulier.

La première hypothèse est à éliminer : en effet, si on introduit le malonate de façon aseptique, après autoclavage du milieu, il n'y a aucun changement.

De même, la seconde hypothèse doit être rejetée, car en effectuant les mesures 24 heures après la répartition du malonate, le résultat est encore négatif. L'inactivité n'est donc pas due au fait que le malonate puisse être métabolisé par les explantats.

La troisième possibilité paraît alors la plus probable, d'autant plus que Beevers, Stiller et Butt (2) considèrent que des concentrations très élevées sont requises pour obtenir le maximum d'effet sur des cultures de tissus, bien que dans ces conditions le malonate puisse ne plus être un inhibiteur spécifique de la succino-déshydrogénase. A des pH bas, les effets les plus importants sont obtenus pour une concentration supérieure à 10^{-2} M. Nous avons donc repris notre expérience après 7 jours de culture avec une concentration plus importante, (10^{-1} M.), puisque nous désirons déterminer l'action d'une auxine et d'un composé auxino-mimétique sur la croissance et observer s'il y a formation d'acide citramalique. Ceci doit nous renseigner sur le blocage du cycle de Krebs, et éventuellement nous indiquer si le catabolisme de l'acide glutamique n'emprunte pas la voie de l' α -cétoglutarate

1. L'inhibition de la respiration et les valeurs de Q.R. (tableau X - planche n°11)

L'inhibition de la respiration par le malonate est nette pour les témoins, spectaculaire en présence de 10^{-5} g/ml d'A.I.A., mais plus modérée lorsqu'il s'agit de 2,4 D. (10^{-7} g/ml). Ainsi, le malonate réduit la respiration de 23 % pour les explantats témoins, de 45 % pour les explantats cultivés en présence d'A.I.A. et de 18 % environ pour ceux cultivés en présence de 2,4 D., ce qui indique que l'augmentation respiratoire causée par les auxines, en particulier l'A.I.A., n'a pas d'influence sur l'effet inhibiteur de l'acide malonique qui est prépondérant et confirme les expériences de Bonner.(7)

En absence de malonate, les valeurs de Q.R. restent voisines de l'unité (légèrement supérieure avec l'A.I.A., légèrement inférieure avec le 2,4 D.) ; alors qu'en présence de malonate elles augmentent nettement. Ce fait fut observé par Beevers (1) sur la maïs et par Hanly et al. (16) sur la carotte. Cette augmentation de Q.R. induite par le malonate serait due, selon Beevers, à un début de fermentation, bien qu'en conditions aérobies.

2. La croissance en présence de malonate (tableau XI - planche n°12).

La croissance exprimée en poids de substance fraîche se trouve ^{peu} affectée, par le malonate, dans le cas des explantats témoins. Par contre, elle est inhibée, fortement lorsque les explantats sont cultivés en présence d'A.I.A., légèrement en présence de 2,4 D.

Milieux	I.R. ml/g PF/h	I.R. ml/ex/h	I.R. ml/mg Np/h	Q.R.
Sans auxine	122,6	117,3	20,7	1
Malonate seul	93,7	90,8	13,9	1,07
A.I.A. 10^{-5} g/ml	205,1	271,7	24,3	1,05
A.I.A. + Malonate	112,7	118,9	14,2	1,28
2,4 D. 10^{-7} g/ml	90,6	87,5	13,8	0,95
2,4 D. + Malonate	126,1	106,6	20,2	1,1



Action inhibitrice du Malonate (10^{-1} M.) sur la respiration des tissus de Topinambour après 7 jours de culture.

TABLEAU X

Milieux	Eau	N_t mg/ex	N_p mg/ex	$\frac{N_p}{N_t}$
Sans auxine	83,2%	3,04	0,95	31,5 %
Malonate seul	84,5%	3,18	1	31,6 %
A.I.A. 10^{-5} g/ml	87,6%	3,11	1,38	44,4 %
A.I.A. + Malonate	86,1%	2,96	1,16	39,5 %
2,4 D. 10^{-7} g/ml	85,8%	3,02	0,91	30 %
2,4 D. + Malonate	85,5%	2,52	0,77	30,5 %



Effets du Malonate (10^{-1} M.) sur la teneur en eau
et le métabolisme azoté des tissus de Topinambour
après 7 jours de culture.

TABLEAU XI

L'addition de malonate au milieu de culture modifie peu Nt ou Np. Quant au rapport Np/Nt, il reste également constant. Remarquons seulement, qu'en présence de 10^{-5} g/ml d'A.I.A. seul, la synthèse de matière vivante semble accrue par rapport aux explantats cultivés sur un milieu sans substance de croissance ; mais, on constate une légère inhibition de cette synthèse par le malonate.

3. La teneur en acides cétoniques (tableau XII - planche n°13)

La teneur globale en acides cétoniques décroît lorsque du malonate est ajouté au milieu de culture, sauf lorsque les explantats sont cultivés en présence de 2,4 D. L'addition de malonate provoque chez les explantats témoins un accroissement du taux du pyruvate, mais un abaissement notable des taux en glyoxylate et en α -cétoglutarate. L'accumulation du pyruvate peut être due à une consommation moindre de celui-ci, l'approvisionnement en oxalo-acétate étant réduit par blocage du cycle de Krebs en amont. La légère diminution du glyoxylate peut laisser supposer que - la voie respiratoire classique du cycle de Krebs étant interrompue - le tissu supplée la déficience respiratoire par d'autres voies, en particulier le cycle glyoxylique. Mais on ne remarque pas d'augmentation de la teneur en malate, ce qui va à l'encontre d'une production amoindrie de l'oxalo-acétate. En effet, l'oxalo-acétate, ainsi produit, permettrait un déroulement normal du cycle à son début. Le blocage du cycle tricarboxylique entre le succinate et le fumarate empêche une déshydrogénation peu différente de celle existant entre l'acide malique et l'oxalo-acétate. Cét excès d' H_2 pourrait donc servir à la réduction du glyoxylate en glycolate. Cependant, la formation du glycolate n'est pas observée, ni celle d'oxalate (dérivé d'oxydation du glycolate).

Milieux	PYRUVATE mg/g PF	μ moles /100g PF	GLYOXYLATE mg/g PF	μ moles/ 100g PF	ACETOGLUTARATE mg/g PF	μ moles/ 100g PF	TOTAL mg/g PF	μ moles/ 100g PF
Sans auxine	0,096	109	1,024	1380	0,811	550	1,931	2039
Malonate seul	0,216	245	0,649	876	0,333	228	1,198	1349
A.I.A. 10^{-5} g/ml	0,215	244	0,463	625	1,557	1065	2,235	1934
A.I.A. + Malonate	0,134	152	0,631	852	0,478	327	1,243	1331
2,4 D. 10^{-7} g/ml	0,180	204	0,662	894	0,883	604	1,725	1702
2,4 D. + Malonate	0,087	98	1,035	1397	0,403	276	1,525	1771

Effets du Malonate (10^{-1} M.) sur la teneur en acides cétoniques
des tissus de Topinambour après 7 jours de culture.



TABLEAU XII

Aussi, pourrions-nous penser que la diminution en glyoxylate serait le fait d'une stimulation de la transamination. Seul, un dosage du glyco-colle ou de la sérine pourrait nous renseigner.

De l'acide succinique s'accumule en présence de malonate, puisqu'à l'état de traces chez le témoin, il peut atteindre 4,3 % de l'acidité totale lors de l'adjonction du malonate. Cette constatation est en accord avec le principe même de l'inhibition qui doit bloquer la succino-déshydrogénase et de plus, la production de glyoxylate s'accompagne toujours de la formation de succinate, qui ne peut être catabolisé normalement. D'autre part, le début du cycle de Krebs semble se réaliser normalement, puisque l'addition de malonate provoque un abaissement du taux d'acide citrique, qui de 21 % passe à 14 % de l'acidité totale.

La respiration est inhibée par le malonate, l' α -cétoglutarate disparaît car le cycle est interrompu et la synthèse de glutamate qui continue peut-être, utilise l' α -cétoglutarate. La quantité de phosphates libres augmente et stimule la glycolyse; en même temps il se produit une augmentation du glucose par la voie des pentoses et un accroissement de la fermentation aérobie. (Polonovski) (40).

L'exaltation du taux en pyruvate s'expliquerait alors par le fonctionnement du "shunt" des pentoses - phosphates.

Lorsque les explantats sont cultivés en présence d'A.I.A. seul, nous observons une augmentation du pyruvate, de l' α -cétoglutarate et une diminution de glyoxylate, par rapport aux témoins. Il paraît difficile d'expliquer cette action. Peut-être l'A.I.A. à cette dose, accélère-t-il le catabolisme par différents moyens : cycle tricarboxylique, voie des pentoses-phosphates, cycle glutamique ...

La diminution en acide glyoxylique pourrait s'expliquer par une mise en route du cycle glyoxylique, mais il se trouve que de l'acide pyruvique s'accumule. Or, cet acide pyruvique serait un facteur réprimant la synthèse de l'isocitratase (enzyme nécessaire à l'éclatement de l'isocitrate en succinate et glyoxylate) (Polonovski) (40). Il faudrait donc admettre que, si le cycle glyoxylique fonctionne, il est bloqué ensuite. Peut-être la diminution en glyoxylate est-elle simplement liée à une transamination accrue en glycocolle.

Selon Kim et Bidwell (25), l'A.I.A. inhibe la carboxylation du pyruvate conduisant à la production d'oxalo-acétate, mais n'influe en rien sur la décarboxylation du pyruvate. Cette explication serait suffisante pour interpréter l'accumulation du pyruvate.

Quant à l'augmentation en α -cétoglutarate, on peut se demander si elle est due à un effet spécifique de l'auxine, ou à une désamination accrue du glutamate.

L'addition de malonate à l'auxine diminue le pyruvate et l' α -cétoglutarate alors que le taux de glyoxylate est accru. Le pourcentage de succinate étant élevé (8,5 %), le blocage du cycle de Krebs au niveau de la succino-déhydrogénase apparaît une fois de plus, évident.

La diminution de l' α -cétoglutarate ainsi que le faible taux de citrate (10,7 %) peuvent être interprétés comme dans le cas précédent. (Témoin + malonate).

L'accumulation du glyoxylate laisserait supposer que le cycle glyoxylique ne fonctionne plus du tout.

Quant au pyruvate, il serait normalement catabolisé, mais il faut supposer qu'il y a suffisamment d'oxaloacétate pour permettre son entrée dans le cycle de Krebs.

Le 2,4 D employé seul, a des effets identiques à ceux de l'A.I.A., mais plus atténués. Le cycle tricarboxylique s'effectue sans doute, mais très lentement, ce qui expliquerait une moindre augmentation de l'I.R. Le pourcentage en citrate reste de l'ordre de 14 %, celui du succinate de 5,5 %.

L'adjonction de malonate au milieu contenant du 2,4 D. provoque des phénomènes identiques à ceux observés en présence d'A.I.A., mais de façon plus atténuée, sauf pour le glyoxylate dont le taux s'accroît considérablement.

Ainsi, l'addition de malonate dans le milieu de culture a des effets différents selon qu'il s'agit d'explantats cultivés en présence ou non de facteurs de croissance.

B. Réversion de l'inhibition respiratoire du malonate par le succinate.

Nous avons tenté de lever l'inhibition causée par le malonate en transportant les explantats sur milieu contenant de l'acide succinique 3.10^{-2} M. pendant 7 jours encore. L'activité du malonate sur la succino-déshydrogénase dépend en effet, du rapport des concentrations malonate-succinate.

Les résultats (tableau XIII, planche n° 11) montrent que l'addition de succinate à des milieux contenant des concentrations de malonate capables d'inhiber de 20 à 45 % l'I.R. des tissus de Topinambour, est effectivement susceptible de lever l'effet dépressif.

Bien qu'après 14 jours d'expérience, les valeurs d'I.R. deviennent inférieures à celles obtenues au bout de 7 jours en présence ou non d'auxine seule, non seulement l'inhibition est levée par effet du succinate, mais la respiration semble subir une légère stimulation, qui est plus importante pour les explantats témoins.

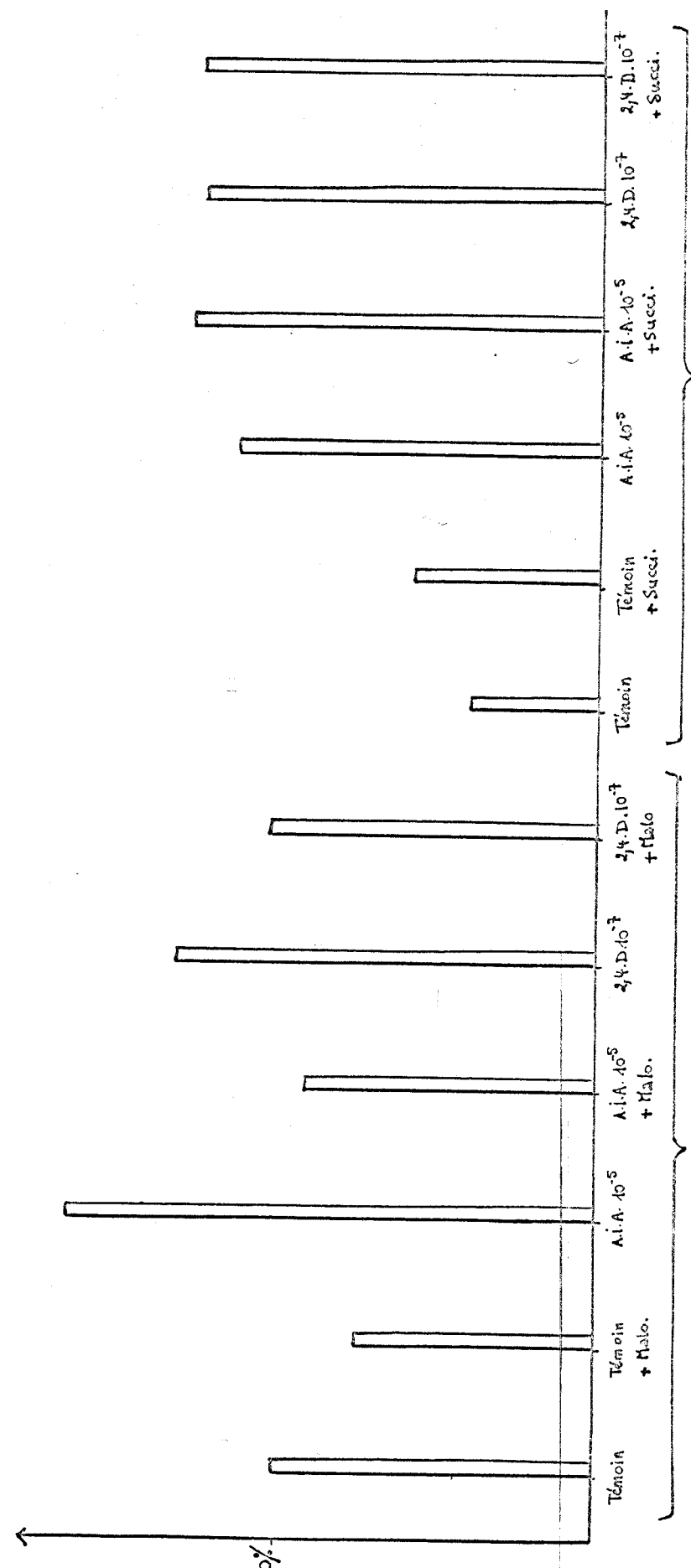
Milieux	I.R. ml/g PF/h	I.R. ml/ex/h	I.R. ml/mg Np/h	Q.R.
Sans auxine	48,9	49,8	9,64	0,87
Succinate seul	81,9	91,9	9,03	0,99
A.I.A. 10^{-5} g/ml	140,81	200,65	16,94	0,99
A.I.A. + succinate	157,3	211,4	24,42	1,03
2,4 D. 10^{-7} g/ml	151,3	257,9	19,85	0,98
2,4 D. + succinate	152,1	209,9	19,25	1



Action réversible du malonate par le succinate
($3 \cdot 10^{-2}$ M.) sur la respiration des tissus de
Topinambour après 14 jours de culture.

TABLEAU XIII

I.R.



1^{er} au 7^e jour : Inhibition par le Malonate 40^{-1} M. 7^e au 14^e jour : Réversion par le Succinate $3 \cdot 10^{-2}$ M.
 Action antagoniste du malonate-succinate sur l'I.R. (calculée en ng/g P.F./h et exprimée en % par rapport au témoin initial) de tissus de Topinambour cultivés en présence de facteurs de croissance.

Les valeurs de Q.R. sont voisines de l'unité, sauf pour les explantats cultivés sans facteur de croissance (Q.R. = 0,87), ce qui indiquerait un début de protéolyse. Cette explication est d'ailleurs confirmée par le rapport $\frac{N_p}{N_t}$, qui, dans ces conditions, a baissé. (tableau XIV).

Parallèlement à ces résultats, le tableau XIV et la planche n°12 montrent que, dans tous les cas, l'acide succinique stimule la croissance pondérale. Remarquons d'autre part, que cette expérience en deux temps met en évidence un fait supplémentaire. Les explantats cultivés pendant 7 jours en présence de 10^{-7} g/ml de 2,4 D. seul, ont un poids de substance fraîche qui augmente de façon moins intense que sur 10^{-5} g/ml d'A.I.A., alors que 7 jours plus tard, les effets de la croissance sont plus importants en présence de 2,4 D. Peut-être cela exprime-t-il que la pénétration du 2,4 D. dans les tissus de Topinambour est plus lente et que ses effets sont donc retardés, comme le montrent encore les valeurs de l'I.R.

La teneur en acides cétoniques. (tableau XV - planche n°13)

Après 14 jours de culture, le pyruvate et le glyoxylate varient peu, seul l' α -cétoglutarate diminue, chez les explantats témoins.

En présence de substances de croissance, la teneur globale en acides cétoniques diminue considérablement, quoique la teneur en pyruvate soit peu modifiée. Peut-être est-ce le résultat d'une glycolyse accrue et d'une accélération du déroulement du cycle de Krebs.

MILIEUX	Eau	N_t mg/ex	N_p mg/ex	$\frac{N_p}{N_t}$
Sans auxine	86,4%	2,80	0,70	25,2 %
Succinate seul	83,4%	3,50	1,70	48,4 %
A.I.A. 10^{-5} g/ml	89,3 %	3,45	1,27	36,7 %
A.I.A. + succinate	88,8%	2,90	0,97	33,5 %
2,4 D. 10^{-7} g/ml	88,1%	3,73	1,54	41,4 %
2,4 D. + succinate	87,4%	3,16	1,37	43,4 %



Action réversible du Malonate par le succinate ($3 \cdot 10^{-2}$ M) sur la teneur en eau et le métabolisme azoté des tissus de Topinambour après 14 jours de culture.

TABLEAU XIV

Croissance en mg

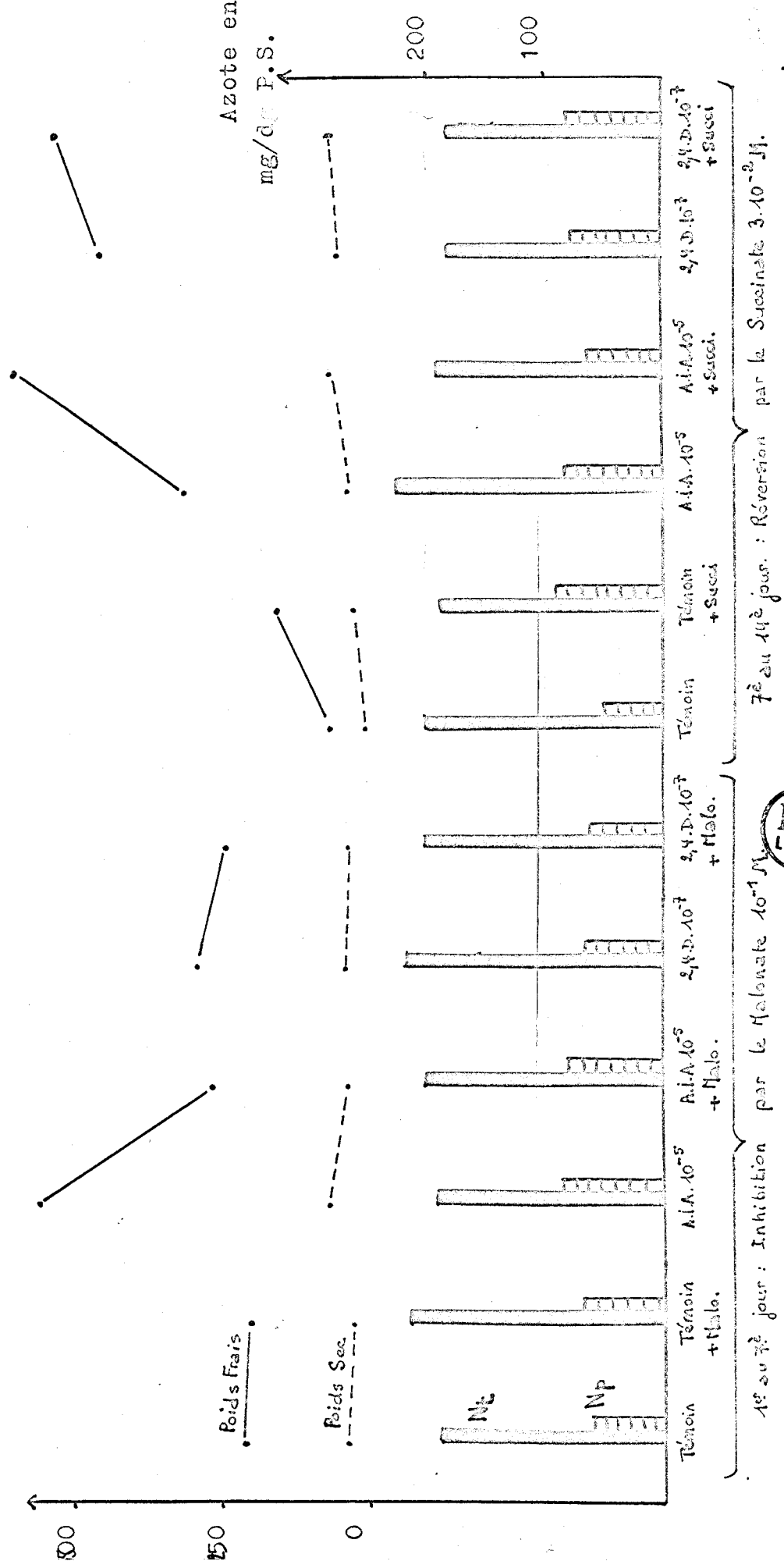


PLANCHE N°12 Action antagoniste du malonate - succinate sur la croissance pondérale et la teneur en azote des tissus de Topinambour cultivés en présence de facteurs de croissance.

L'adjonction de succinate augmente la teneur en pyruvate quelque soit le milieu considéré. Le glyoxylate a tendance à croître considérablement, sauf pour les explantats cultivés en absence d'auxine. De plus, les variations en α -cétoglutarate sont contradictoires selon que l'action du succinate s'exerce dans un milieu dépourvu ou non de facteur de croissance. L'analyse des acides organiques montre que l'acide malonique reste important après 14 jours de culture. D'autre part, l'acide succinique atteint des taux élevés : 10 % avec l'A.I.A. et le 2,4 D. et 7,5 % chez les explantats témoins. Mais nous ne pouvons en tirer de conclusion, car le succinate introduit dans le milieu, est vraisemblablement rapidement métabolisé. Certes, nous pourrions expliquer les augmentations d' α -cétoglutarate et de pyruvate par le fait qu'un excès de succinate est fourni au milieu, ce qui entraînerait la remise en route d'un cycle de Krebs un peu déséquilibré. Cette hypothèse suffit pour admettre la baisse en glyoxylate.

Cette double expérience confirme que l'effet inhibiteur du malonate est susceptible d'être levé par l'acide succinique.

Ce fait vérifie que l'inhibition de la respiration s'effectue au niveau de la succino-déshydrogénase. Quant aux variations de la teneur en acides organiques, elles ne sont pas identiques selon que les milieux contiennent ou non des facteurs de croissance (A.I.A. ou 2,4 D.), ce qui semble lié aux effets exercés par les auxines sur le déroulement du cycle de Krebs.

Milieux	PYRUVATE mg/g PF : μ moles/ 100g PF	GLYOXYLATE mg/g PF : μ moles/ 100g PF	α -CETOGLUTARATE mg/g PF : μ moles/ 100g PF	TOTAL μ moles/ 100g PF
Sans auxine	0,104	1,102	0,484	1,690
Succinate seul	0,207	0,483	0,11	0,800
A.I.A. 10^{-5} g/ml	0,173	0,254	traces	0,427
A.I.A. + succinate	0,308	0,411	0,734	1,453
$2,4$ D. 10^{-7} g/ml	0,160	traces	traces	0,160
$2,4$ D. + succinate	0,402	0,469	0,503	1,374

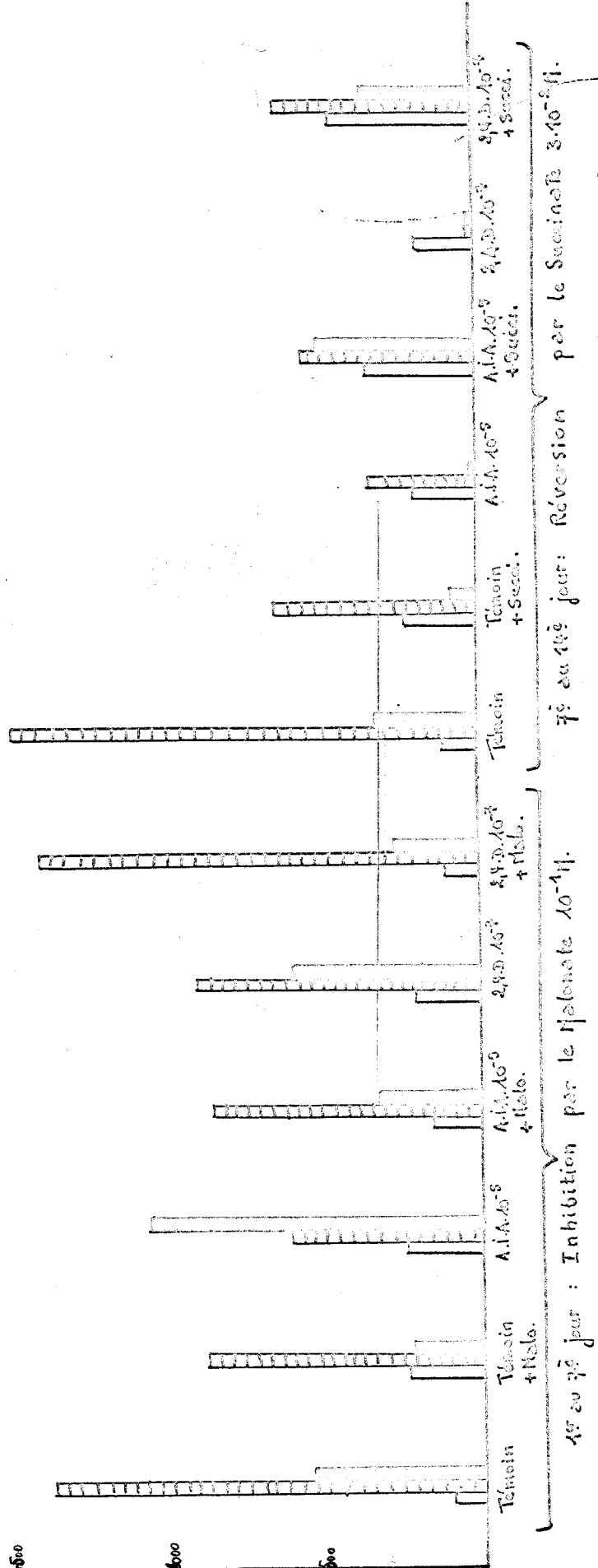
Action réversible du malonate par le succinate (3.10^{-2} M.) sur la teneur en acides cétoniques des tissus de Topinambour après 14 jours de culture.

TABLEAU XV



Pyruvate
glyoxylate
α-cétoglutarate

mg/100g P.F.



Action réversible du malonate par le succinate sur la teneur en acides cétoniques des tissus de Topinambour cultivés en présence de facteurs de croissance.



III. ACTION DU FLUOROACÉTATE DE SODIUM

Le fluoroacétate fut utilisé par Lance (27) comme un indicateur spécifique du cycle de Krebs.

Peters et autres (38) ont montré que la toxicité du fluoroacétate était due à la synthèse enzymatique du fluorocitrate. En effet, après conversion en fluoroacétyl CoA, et condensation avec l'oxaloacétate, il forme un acide tricarboxylique : le fluorocitrate, qui s'accumule et sur lequel l'aconitase est sans action ; il y a alors interférence avec l'utilisation du citrate. Le cycle tricarboxylique est ainsi bloqué. C'est ainsi que Lance a observé une inhibition de la respiration sur différents tissus de Scorsonère, en notant toutefois des différences de sensibilité par rapport à l'inhibition provoquée par le malonate.

Le fluoroacétate exigeant des pH assez bas pour être actif, nous l'avons additionné au milieu liquide à pH 4,5 et à la concentration de 10^{-2} M.

L'expérience a duré 7 jours : à partir du 10^e jour, les explantats brunissent et meurent. Cette période de 7 jours est cependant suffisante pour permettre à la prolifération cellulaire de s'installer. (Gautheret) (13).

1. Sur la croissance et le métabolisme azoté (tableau XVI - planche n° 14)

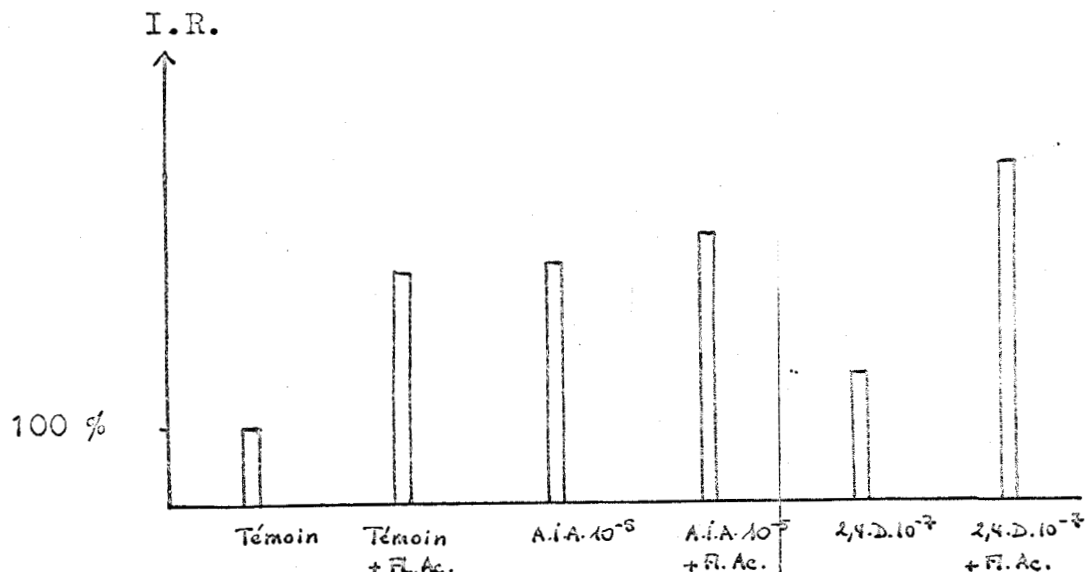
La croissance en P.F., importante en présence de 10^{-5} g/ml d'A.I.A., plus faible avec 10^{-7} g/ml de 2,4 D., va de pair avec l'hydratation du tissu. Bien qu'incapables de proliférer sans auxine, les explantats témoins subissent une légère augmentation en P.F. et en P.S. par formation de substances inertes (Gautheret - Lance) (13-27).

Milieux	Eau	N _t mg / ex	N _p mg / ex	$\frac{N_p}{N_t}$
Sans auxine	84,8%	2,97	0,81	27 %
Fluoroacétate seul	86,3%	3,25	0,96	30 %
A.I.A. 10 ⁻⁵ g/ml	89,1%	3,17	1,31	41 %
A.I.A. + Fluoroacétate	86,8%	3,03	1,20	40 %
2,4 D. 10 ⁻⁷ g/ml	84,6%	2,32	0,71	30 %
2,4 D + Fluoroacétate	86,2%	2,83	0,87	31 %

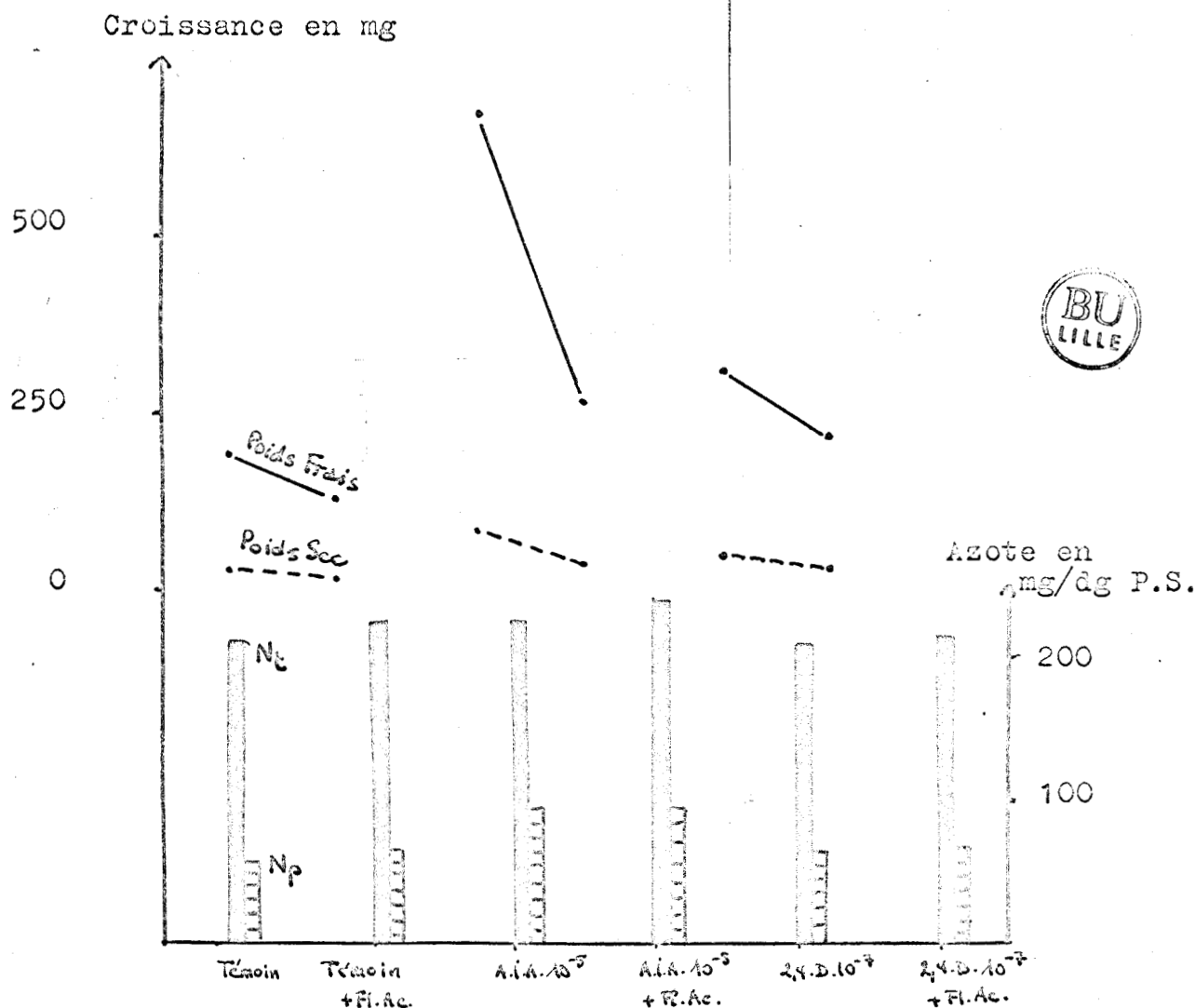


Action conjuguée du fluoroacétate de sodium
(10⁻² M.) et de facteurs de croissance sur
la teneur en eau et le métabolisme azoté des
tissus de Topinambour.

TABLEAU XVI



Action du fluoroacétate de sodium sur l'I.R.
(calculée en ml/g P.F./h et exprimée en % par
rapport au témoin) des tissus de Topinambour.



Action du Fluoroacétate sur la croissance et la
teneur en azote des tissus de Topinambour.

Dans tous les cas, le fluoroacétate diminue le P.F. des explantats. Cette diminution est particulièrement nette en présence d'A.I.A. Le fluoroacétate ne semble guère intervenir de façon très nette sur l'absorption d'eau, les résultats variant peu. Toutefois, on peut observer une certaine inhibition lorsque les explantats sont cultivés en présence d'A.I.A. Ces résultats sont moins nets que ceux qu'obtenaient Hackett et Thimann (15) sur la Pomme de terre ; ils concluaient à un antagonisme auxine-fluoroacétate sur l'entrée d'eau. Le fluoroacétate n'intervient nullement sur la teneur en azote et la protéogénèse des tissus de Topinambour.

2. Sur la respiration (tableau XVII - planche n° 14)

Après un test préalable, la respiration des tissus de Topinambour est stimulée par l'acétate $3. 10^{-2}$ M.

Quant à l'action même du fluoroacétate, il exerce une stimulation plus ou moins importante selon le milieu de culture, mais toujours très nette. Ceci est donc différent des résultats obtenus par Lance sur les tissus de Scorsonère (27).

La stimulation de la respiration observée chez les témoins est de l'ordre de 200 % et chez les explantats cultivés en présence de 2,4 D. d'environ 165 % ; elle est de moindre importance pour ceux qui se développent en présence d'A.I.A.

Les valeurs de Q.R. toutes voisines de 1, peuvent amener à douter dans le cas des tissus de Topinambour, de l'effet inhibiteur du fluoroacétate sur le cycle de Krebs. On peut aussi penser que ces tissus sont capables de rompre la liaison carbone-fluor comme cela a été observé chez certains végétaux. (Preuss, Peter W. Arnelidina, G. Lonmanes et Weinstein) (41).

Milieux	I.R. ml/g PF/h.	I.R. ml/ex / h	I.R. ml/mg Np/h	Q.R.
Sans auxine	76,96	71,11	13,31	0,98
Fluoroacé- te seul	230,52	243,65	34,61	1,08
A.I.A. 10^{-5} g/ml	252,06	322,63	26,78	1,05
A.I.A. + Fluoroac.	274,09	263,12	28,97	1,10
2,4 D. 10^{-7} g/ml	131	125,90	20,56	1,02
2,4 D. + Fluoroac.	348,44	331,36	52,50	1,08



Action du fluoroacétate de sodium (10^{-2} M.) sur la respiration des tissus de Topinambour cultivés en présence de substances de croissance.

TABLEAU XVII

Signalons aussi que le maintien d'une respiration intense a déjà été noté dans certains types de muscles striés empoisonnés au fluoroacétate, ce qui laisse supposer que le fonctionnement du cycle tricarboxylique peut être remplacé par d'autres voies métaboliques : le cycle α -glycérophosphorique, ou le catabolisme du glutamate. (Margreth et Azzone) (32) - (Polonovski) (40).

3. Sur la teneur en acides cétoniques
(tableau XVIII - planche n° 15)

Le dosage des acides cétoniques montre que d'une façon générale, le fluoroacétate provoque un accroissement du taux en pyruvate. Quant au glyoxylate et à l' α -cétoglutarate, leur taux varie tout à fait inégalement. L'accumulation de l'acide pyruvique est tout à fait compatible avec un blocage du cycle de Krebs. De plus, l'analyse des acides organiques hydrosolubles révèle un accroissement considérable de la teneur en citrate et une diminution du malate, ce qui ne fait que confirmer le pouvoir inhibiteur du fluoroacétate sur le fonctionnement du cycle de Krebs. L'acide citramalique ne se forme pas alors qu'il est présent après 60 jours de culture, en présence de 10^{-5} g/ml d'A.I.A. (Rambour) (42)

La respiration n'étant pas inhibée, et le blocage du cycle de Krebs au niveau du citrate vérifié, il faut admettre que sous l'influence du fluoroacétate, la plante emprunte d'autres voies métaboliques.

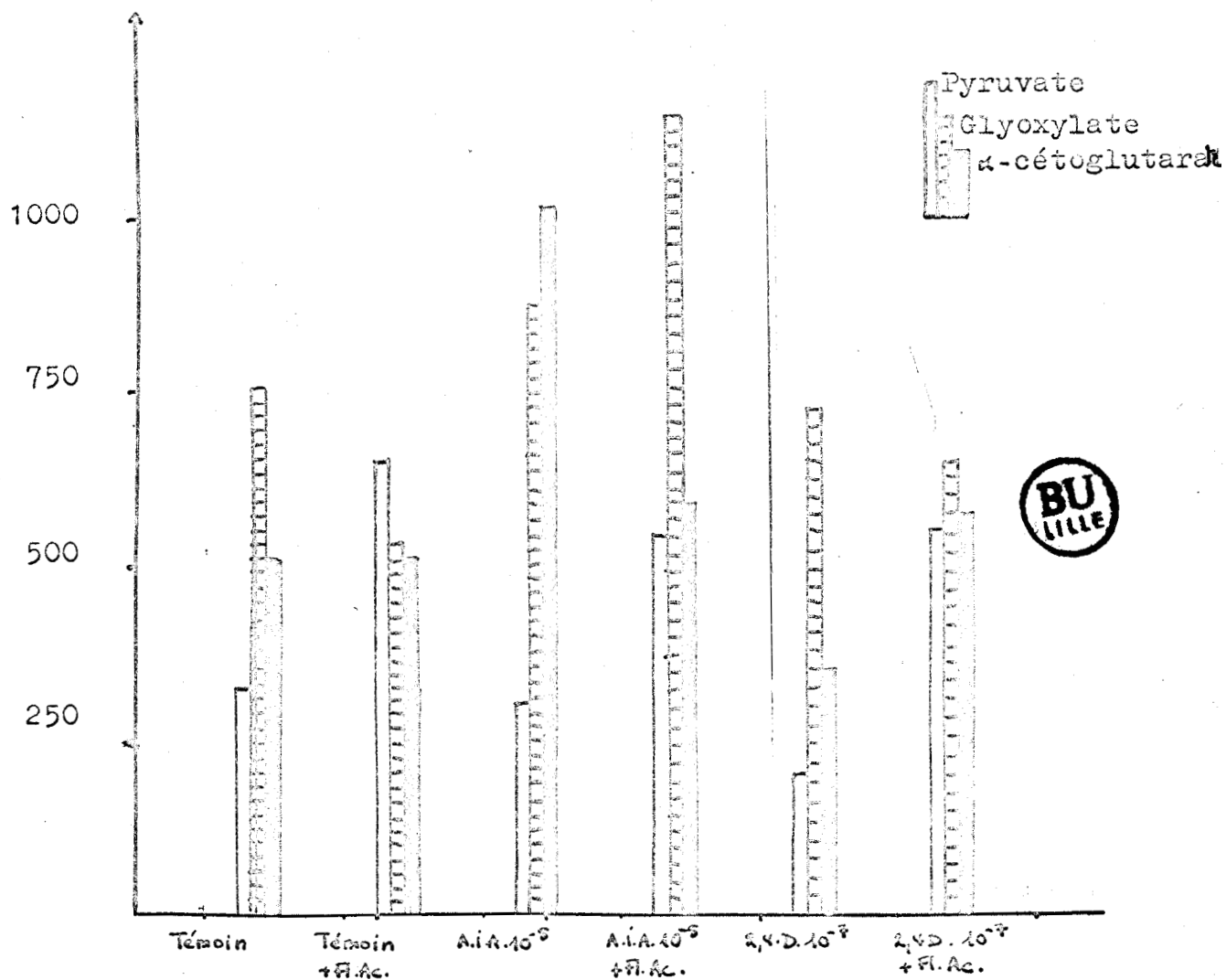
En particulier, le maintien d'une respiration intense peut être le fait d'une glycolyse se réalisant non par la voie de Embden Meyerhof, mais le "shunt" des phosphopentoses.

Milieux	PYRUVATE mg/g PF, μ moles/ 100g PF	GLYOXYLATE mg/g PF, μ moles/ 100g PF	α CETOGLUTARATE mg/g PF, μ moles/ 100g PF	TOTAL mg/g PF, μ moles/ 100g PF
Sans auxine	0,290	0,565	0,749	1,604
	329	763	512	1605
Fluoroacétate seul	0,574	0,394	0,754	1,722
	652	532	516	1700
A.I.A. 10^{-5} g/ml	0,263	0,650	1,485	2,398
	298	878	1016	2193
A.I.A. + Fluoroac.	0,528	0,856	0,856	2,240
	539	1156	586	2281
2,4 D. 10^{-7} g/ml	0,179	0,530	0,516	1,225
	203	715	353	1271
2,4 D. + Fluoroac.	0,490	0,478	0,833	1,801
	556	645	507	1772

Action du Fluoroacétate de sodium (10^{-2} M.) sur la teneur en acides cétoniques des tissus de Topinambour cultivés en présence des substances de croissance.



μ moles/100gP.F.



Action du Fluoroacétate de sodium sur la teneur en acides cétoniques des Tissus de Topinambour cultivés en présence de facteurs de croissance.

A ce propos, il faut signaler les remarques de Garland et coll. (12) selon lesquelles une accumulation intracellulaire de citrate, provoque l'inhibition de la phosphofructokinase, ce qui indiquerait que le cycle de Krebs exerce un contrôle sur la glycolyse et induirait dans ce cas la voie préférentielle de la glycolyse aérobie.

Le "shunt" des pentoses phosphates aboutit à la formation de trioses phosphates qui sont catabolisés en pyruvate qui s'accumule. Cette voie a cependant un rendement énergétique moindre puisqu'il n'y a qu'une décarboxylation au lieu de trois dans le cycle tricarboxylique. Le blocage du cycle de Krebs arrête également les réactions de phosphorylation, aussi le rapport ATP/ADP est modifié, et c'est un argument supplémentaire pour supposer que la voie des pentoses phosphates est alors utilisée.

Une faible augmentation en ADP entraîne une stimulation de la respiration. C'est l'ADP, qui selon Chance (Polonovski) (40), serait le véritable régulateur de la respiration mitochondriale.

Il faut également tenir compte qu'en présence de fluoroacétate la valeur du Q.R. tend à augmenter. Il est donc possible qu'en plus du catabolisme glucidique, intervienne en partie le catabolisme de certains acides organiques, qui normalement accumulés, se trouvent alors utilisés. Le blocage du cycle de Krebs à son entrée n'empêche pas l'utilisation des produits accumulés précédemment.

Margreth et Azzone (32) ont signalé que la glycolyse peut être augmentée par le fluoroacétate, mais l'oxydation de l'acide glutamique représenterait également une voie métabolique possible du surplus en hydrogène dans les systèmes où intervient l'empoisonnement par le fluoroacétate. On observe alors une baisse en aspartate et en glutamate.

Une chromatographie bidimensionnelle de ces acides aminés, n'a pas montré de différences notables dans la teneur en glutamate et aspartate, appréciables à l'oeil nu. Toutefois, cette estimation n'est pas suffisante pour conclure si le cycle glutamique est possible ou non. Même s'il intervient, il ne peut cependant pas tout expliquer. Il est possible qu'intervienne aussi en partie un phénomène de fermentation aérobie qui pourrait expliquer le léger accroissement de la valeur du Q.R.

CONCLUSIONS

Les expériences qui montrent l'action d'inhibiteurs métaboliques tels que l'acide malonique et le fluoroacétate, sont celles qui nous permettent le mieux d'exploiter au maximum les résultats concernant la teneur en acides cétoniques des fragments de tubercules de Topinambour.

Les deux séries d'expériences de 7 jours à des époques très voisines, nous assurent de l'efficacité de la technique de dosage mise au point. En effet, nous retrouvons successivement pour des fragments cultivés "in vitro" sans facteur de croissance dans le milieu de culture, ou en présence d'A.I.A. ou de 2,4 D., chacun des acides cétoniques en même proportion dans l'une ou l'autre série, ce qui confirme la valeur de la technique d'appréciation semi-quantitative.

Après 7 jours de culture, nous remarquons que l'intensité respiratoire est stimulée lorsqu'une substance de croissance est ajoutée au milieu, stimulation plus importante avec l'A.I.A. qu'avec le 2,4 D., ce qui confirme les résultats obtenus après 45 jours de culture.

Quant au quotient respiratoire, sa valeur nettement inférieure à l'unité au bout de 45 jours de culture, est très voisine de 1 après 7 jours. Et l'addition d'un inhibiteur métabolique - que ce soit le malonate ou le fluoroacétate - élève ce Q.R. à une valeur supérieure à 1.

Ces inhibiteurs, s'ils entraînent une diminution en croissance pondérale, ne modifient que peu la teneur en azote des explantats. Cela signifierait qu'ils freinent l'absorption d'eau. Par contre, ils ont des effets contradictoires quant à la respiration des tissus de Topinambour. En effet, si le malonate à concentration élevée, provoque une inhibition de la respiration comme de nombreux travaux l'avaient déjà montré sur d'au-

tres tissus végétaux cultivés "in vitro", le fluoroacétate stimule intensément celle-ci, puisque l'augmentation peut atteindre 200 % lorsque les explantats sont cultivés en absence d'auxine et 165 % en présence de 2,4 D. Cette stimulation par le fluoroacétate n'élimine pas l'hypothèse que le cycle de Krebs participe aux oxydations respiratoires des tissus de Topinambour. Non seulement l'expérience de l'inhibition par le malonate, levée par le succinate, en est une preuve, mais les dosages d'acides cétoniques et d'acides organiques hydrosolubles ont montré que la plante supplée simplement à cette possibilité en empruntant d'autres voies. Ainsi, l'augmentation de la teneur globale en acides cétoniques lors de l'adjonction du malonate au milieu peut être un argument en faveur du fait que les acides organiques servent de substrats respiratoires.

Toutefois, ces teneurs en acides cétoniques en fonction de la constitution du milieu de culture, nous permettent d'interpréter le processus métabolique dans ses grandes lignes, des précisions pourraient être apportées par des dosages simultanés d'acides aminés et de glucides.

Mais, si l'on veut étudier avec précision la voie métabolique empruntée par un acide déterminé, et déterminer la raison exacte de la diminution de l' α -cétoglutarate en présence de fluoroacétate par exemple, il serait intéressant d'employer des éléments marqués tels que le 14 C.

D'autre part, l'existence des diverses voies métaboliques possibles devrait être confirmée par une mise en évidence de l'existence ou de l'efficacité des enzymes impliquées dans ces processus.



- BIBLIOGRAPHIE -

- (1) BEEVERS (H.) - 1952 -
Malonic acid as an inhibitor of Maize root respiration.
(Plant. Physiol., 27, p. 725-735)
- (2) BEEVERS (H.), STILLER (M.L.) et BUTT (V.S.) - 1966 -
Metabolism of the organic acids.
in Plant Physiology, IV B, p. 159-163. Acad. Press,
N.Y. London.
- (3) BELL (P.H.) et coll. - 1956 -
(J. amer. chem. Soc., 78, 5051)
- (4) BISERTE (G.) et coll. - 1960 -
Séparation des acides aminés des milieux biologiques
complexes. V. Description d'un couplage de méthodes
chromatographiques et électrophorétiques.
(J. chromat., 3, p. 25)
- (5) BISERTE (G.), DAUTREVAUX (M.) et BOULANGER (P.) - 1963 -
La chromato-électrophorèse des acides aminés et des
peptides.
(Bull. Soc. Chim., p. 2954 - 2959)
- (6) BLACK (C.C.) et HUMPHREYS (T.E.) - 1962 -
Effects of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid on enzymes
of glycolysis and pentose phosphate cycle.
(Plant. Physiol., 37, n°1, p. 66-73)
- (7) BONNER (J.) - 1949 -
a) Limiting factors and growth inhibitors in the
growth of Avena coleoptile.
(Amer. J. Bot., 36, p. 323-332)
- 1949 -
b) Relations of respiration and growth in the Avena
coleoptile
(Amer. J. Bot., 36, p. 429-436)
- 1950 -
Arsenate as a selective inhibitor of growth substance
action.
(Plant. Physiol., 25, p. 181-184)

- (8) CARLES (J.), TALIEU ROUSSEAU (M.) et MONTANT (C.) - 1967 -
Contribution à l'étude des acides organiques de
la fermentation.
(Comptes Rendus, 265, Série D, 1183-1186)
- (9) DENTI (E.) et LUBOZ (M.P.) - 1965 -
Dinitrophenylhydrazones of carbonyl compounds by
thin-layer chromatography.
(J. Chromat., 18, p. 325-330)
- (10) DURANTON (H.) - 1959 -
Etude du métabolisme de l'arginine libre dans les
tissus du Topinambour cultivés "in vitro".
Thèse Paris.
- (11) FALUDI (B.) et DANIEL (A.F.) - 1958 -
The effect of different concentrations of 2,4 dichlo-
rophenoxyacetic acid on the growth, amino-acid and
-ketoacid content of potato tissue cultures.
(Acta Biol.Ac.Sc.Hungaricae, 8, p. 273-282)
- (12) GARLAND (P.F.), RANDLE (P.J.) et NEWSHOLME (E.A.) - 1963 -
Citrate as an intermediary in the inhibition of phos-
phofructokinase in rat heart muscle by fatty acids
Ketone bodies, Pyruvate, Diabetes and Starvation.
(Nature, 200, p. 169)
- (13) GAUTHERET (R.J.) - 1964 -
Colloque sur la culture des tissus.
(Revue de cytologie et de biologie végétale - tome
XXVII - Fasc. 2-3-4)
- (14) GAUTHERET (R.J.) - 1959 -
La culture des tissus végétaux - Techniques et réalis-
tions.
(Masson et Cie Editeurs, Paris)
- (15) HACKETT (D.P.) et THIMANN (K.V.) - 1950 - 1952 - 1953 -
Handbuch der Pflanzenphysiologie-XII/II, P.27, pp.
370 - 371.

- (16) HANLY (V.F.), ROWAN (K.S.) et TURNER (J.S.) - 1952 -
Malonate and carrot root respiration.
(Australian J. Sci. Res., B5, p. 64-95)
- (17) HELLER (R.) - 1953 -
Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés "in vitro".
(Thèse, Paris, 233 p. et Ann.Sc.Nat.Bot.Biol.Vég., 14, 1-223)
- (18) HILDEBRANDT (A.C.) et RIKER (A.J.) - 1949 -
The influence of various carbon compounds on the growth of marigold, paris-daisy, periwinkle, sunflower and tobacco tissue "in vitro".
(Amer.J.Bot., 36, p. 74-85)
- (19) HULME (A.C.) - 1954 -
The isolation of L Citramalic acid from the peel of the apple fruit.
(Biochim. Biophys. Acta, 14, p. 36)
- (20) HUMPHREYS (T.E.) et DUGGER (J.R.) - 1957 -
The effect of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid on the respiration of etiolated pea seedlings.
(Plant. Physiol., 32, n°6, p. 530-536)
- (21) ISHERWOOD (F.A.) et NIAVIS (C.A.) - 1956 -
Estimation of Keto acids in plant tissue : a critical study of various methods of extraction as applied to strawberry leaves, washed potato slices and peas.
(Biochem.J., 64, p. 549)
- (22) JANETTA SCHOONOVER DOHAN et GLADYS E. WOODWARD - 1939 -
Electrolytic Reduction and determination of oxydized glutathione.
(Bioch. R. Found., May, 13, p. 393)
- (23) JEREBZOFF-QUITIN (S.) - 1967 -
Rôle des acides cétoniques dans l'inhibition de croissance due à l'acide indolylacétique exogène chez "Nectria galligena Bres".
(Comptes Rendus, 264, Série D, p. 2003-2006)

(24) JOLCHINE (G.) - 1962 -

Le métabolisme de l'acide acétique dans les feuilles de "*Bryophyllum daigremontianum* berger". La genèse des acides organiques par différentes réactions de condensation du radical acétyle dans les chloroplaste et dans la fraction cellulaire non chloroplastique.

(Bull.Soc.Chim.Biol., 44, n°4, p. 337-363)

(25) KIM (W.K.) et BIDWELL (R.G.S.) - 1967 -

The effects of indoleacetic and 2,4 dichlorophenoxyacetic acid on intermediary metabolism of ¹⁴C-labelled organic acids by pea root tips.

(Can.J.Bot., 45, p. 1789-1795)

(26) LACHAUX (B.) - 1944 -

Respiration des tissus de tubercules de Carotte et de Topinambour. Influence du glucose et de l'acide indole-3-acétique.

(C.R.Acad.Sc., 219, pp. 218, 244, 258 et 291)

(27) LANCE (C.) - 1963 -

Recherches sur la croissance et le métabolisme respiratoire de tissus végétaux normaux et tumoraux cultivés "in vitro".

(Thèse, Masson et Cie, éditeurs - Paris).

(28) LEOPOLD (A.C.) et GUERNSEY (F.S.) - 1953 -

A theory of auxin action involving coenzyme A.

(Proc.Amer.Soc.Hort.Sci., 61, 222-338)

(29) LIORET, (C.) - 1963 -

Quelques aspects du métabolisme des acides aminés chez les tissus de crown-gall de Scorsonère cultivés "in vitro".

(Bull.Soc.Fr.Physiol.vég., 9, n°3, 113-121)

(30) LIORET (C.) - 1960 -

Recherches sur le métabolisme de deux tissus végétaux cultivés "in vitro".

(Thèse, Librairie générale de l'Enseignement, Paris)

- (31) LOSADA, (M.), CANOVAS (J.L.) et RUIZ AMIL (M.) - 1964 -
Oxaloacetate, citramalate and glutamate formation
from pyruvate in ~~barker's~~ yeast.
(Biochem. Zeitschrift, 340, 60-74)
- (32) MARGRETH, (A.) et AZZONE (G.F.) - 1964 -
A study of respiration in Fluoroacetate-poisoned
Muscle respiration.
(Biochem., J., 92, p; 73)
- (33) MEISTER (A.) et ABENDSCHEIM (P.W.) - 1956 -
Chromatography of alpha-keto acid 2,4 dinitrophenyl-
hydrazones and their hydrogenation products.
(Anal.Chem., 28, p. 171-173)
- (34) MENORET (Y.) - 1960 -
Action de l'acide 2,4 dichlorophenoxyacétique sur le
métabolisme azoté des tissus de carotte cultivés
"in vitro".
(Thèse, imprimerie alençonnaise, Alençon)
- (35) MOREL (Q.) - 1963 -
Régulation du métabolisme azoté.
(Bull. Soc. Fr. Physiol. vég., 9, n°3, p. 107-113)
- (36) MUNCH PETERSEN (A.) et BARKER (H.A.) - 1958 -
The origin of the methyl group in mesaconate formed
from glutamate by extracts of clostridium tetacro-
morphum.
(J. Biol. Chem., 230, p. 649)
- (37) NEISH (W.J.P.) - 1953 -
On the separation of α keto-acid dinitrophenylhydra-
zones by ionophoresis and their polarographic es-
timation.
(Rec. Trav. Chim., 72, n°2, pp. 97-184, Amsterdam)
- (38) PETERS (R.A.) - 1954 -
Biochemical light on an ancient poison : a lethal
synthesis.
(Endeavour 13, p. 147-154)

- (39) PILET (P.E.) - 1961 -

Les Phytohormones de croissance.

(Masson et Cie éditeurs, Paris)

- (40) POLONOVSKI (J.) et BOULANGER (P.) - 1967 -

Traité de Biochimie Générale, III, n°1

Energétique biochimique et cycles des éléments.

(Masson et Cie éditeurs, Paris)

- (41) PREUSS, PETER. W. ARNELDINA, G. LOMMANES et LEONARD (H.)

WEINSTEIN - 1968 -

Studies on fluoro-organic compounds in plants I-metabolism of 2 ¹⁴C fluoroacetate.

(Contrib. Boyce Thompson Inst. 24 (2), p. 25-31)

- (42) RAMBOUR (S.) - 1968 -

Action de l'acide indolylacétique sur la teneur en acides organiques de fragments de tissus de Topinambour cultivés "in vitro".

(Comptes rendus, 266, Série D, p. 1120-1122)

- (43) SAPP (R.W.) - 1952 -

Metabolism and content of organic acids in sunflower crown-gall tissue.

(Doctoral thesis, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin).

- (44) SARKISSIAN, (I.V.) - 1966 -

Enhancement of Enzymatic Synthesis of citrate "in vitro" by indole-3-acetic acid.

(Plant Physiol., 19, 328-334)

- (45) SCOTT (R.W.), BURRIS (R.H.) et RIKER (A.J.) - 1955 -

Non volatile organic acids of crown gall, crown gall tissue cultures and normal stem tissue.

(Plant. Physiol., 30, 355-360)

- (46) SMITH et SMITH (M.J.) - 1960 -

Chromatographic and electrophoretic techniques.

(vol. 1, p. 262, édité par Ivor Smith - Meinemann - London).

- (47) UMBREIT , BURRIS et STAUFFER - 1959 -
Manometric Techniques.
(Burgess Publishing Co - Minneapolis 15. Minn.
p. 239-240)
- (48) VIRTAMEN (A.I.) et coll. - 1953 -
Ketoacids in green plants.
(Acta Chem. Scandinavica, 7, n°1, 38-44)

S O M M A I R E

INTRODUCTION	Page 1
TECHNIQUES	4
I. Cultures de tissus de Topinambour	4
II. Mesure de l'intensité et du quotient respiratoires	6
III. Analyse des composés azotés	8
IV. Méthodes d'identification des acides cétoniques	10
V. Extraction des D.N.P.H. d'acides cétoniques à partir du matériel végétal	20
VI. Appréciation quantitative des acides cétoniques contenus dans le matériel végétal	22

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

I. Action de différentes substances de croissance (A.I.A., 2,4 D., et A.N.A.) sur des fragments de tubercules de topinambour, variété "violet de Rennes", cultivés "in vitro"	31
A-Effets de différentes concentrations d'A.I.A.	31
B-Effets de différentes concentrations de 2,4 D.	39
C-Effets de différentes concentrations d'A.N.A.	47
D-Conclusions sur l'action des diffé- rents facteurs de croissance	53

II. Action de l'acide malonique, puis réversion de l'inhibition par l'a- cide succinique	Page 56
A - Résultats montrant les effets du malonate additionné au mi- lieu de culture	56
B - Réversion de l'inhibition res- piratoire du malonate par le succinate	65
III. Action du fluoroacétate de sodium	74
CONCLUSIONS	84
BIBLIOGRAPHIE	86