

50376

N° d'ordre 189

1970

91

50.376

1970

91

UNIVERSITE DE LILLE - FACULTE DES SCIENCES

THESE

présentée à la
FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE LILLE
pour obtenir
le titre de Docteur Troisième Cycle
par

LEGRAND Bernard



Activités catalasique et peroxydasique de
tissus végétaux cultivés "in vitro"

Membres du jury : M. R. BOURIQUET, Président
M. J. GUILLAUME, Examineur
M. L. LACOSTE, Examineur
Mlle D. COUSTAUT, Examineur



030 020166 7

Soutenue le 30 Juin 1970

HISTORIQUE

Les peroxydases et les catalases sont des hémoprotéines ferriques qui présentent de grandes analogies spectrales. Elles ont été groupées sous le terme d'hydroperoxydases (105). Toutefois, dans le cadre de ce mémoire, nous les envisagerons successivement.

LES PEROXYDASES (EC. 1. 11. 1. 7.)

Isolées pour la première fois chez les végétaux, les peroxydases sont des hémoprotéines (Kuhn, 1931). Purifiées et cristallisées par Theorell en 1942, nous connaissons depuis peu leur structure. Elles sont formées d'une apoenzyme (glucoprotéine constituée de 287 amino-acides auxquels s'ajoute de l'acide uronique) et d'un groupement prosthétique : la protohématine IX qui est une porphyrine ferrique (Fig. 1).

Il paraît difficile de concevoir que les peroxydases qui existent en abondance dans les tissus ne servent qu'à détruire les traces d'eau oxygénée. Il semble au contraire plus logique d'admettre que ces enzymes ont des fonctions physiologiques plus étendues et en particulier qu'elles jouent un rôle catalytique dans des réactions d'oxygénation ou d'oxydation et par conséquent, participent à des processus métaboliques.

- Bien que le rôle des peroxydases soit encore mal connu, l'abondance des travaux les concernant semble appuyer cette hypothèse.

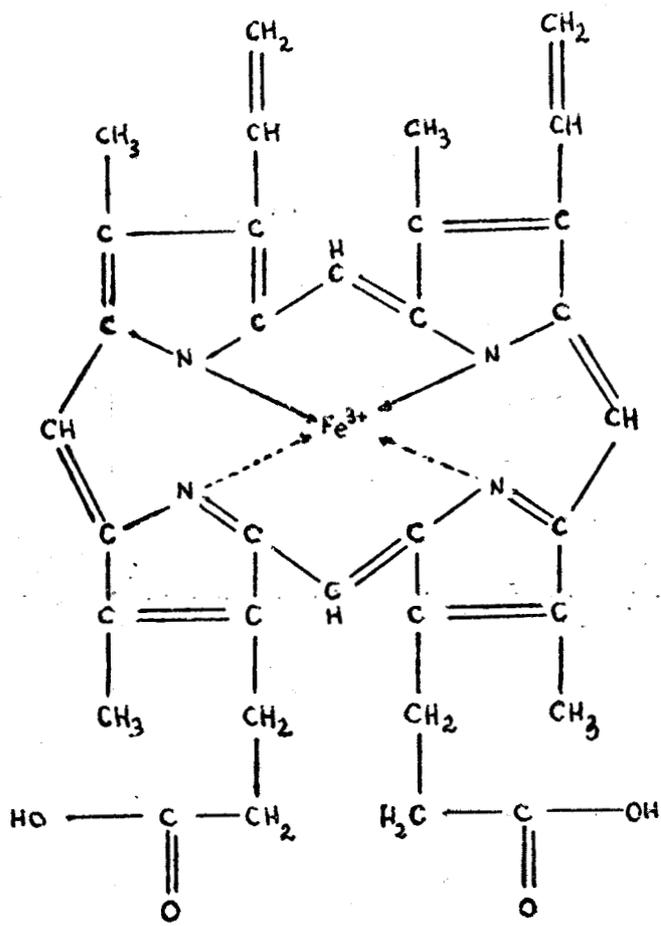


Fig.1: Structure de la protohématine IX .



I DISTRIBUTION - LOCALISATION

Les peroxydases sont très répandues dans le règne végétal. Des études (18.47) portant sur 43 familles et plus de cent espèces, permettent de conclure à la présence générale de ces enzymes dans les racines. Les feuilles vertes ne présentent par contre que de faibles activités peroxydasiques.

On a tout d'abord comparé la teneur en peroxydase des plantes naines et des plantes de taille normale (21.56). Il n'y a pas de différence dans les racines (21), mais les feuilles des plantes naines contiennent plus d'enzymes. La nature de ces enzymes semble toutefois identique, puisque leur pH optimum d'action est le même. Les activités enzymatiques dosées dans les différents organes de *Nicotiana tabacum* (93), montrent que les racines sont plus riches en peroxydases que les tiges qui en renferment encore plus que les nervures des feuilles. La teneur peroxydasique est faible dans les jeunes feuilles et augmente au cours de leur maturité et de leur senescence (93.100).

Dans un organe ou un tissu déterminé, la répartition des peroxydases n'est pas homogène. Dans les racines de *Lens* (35.87), l'extrémité est très riche, le méristème au contraire très pauvre, cette pauvreté s'atténue quand on s'éloigne du méristème. Dans la moelle de la tige de *Tabac* (64), l'activité peroxydasique est faible près du bourgeon terminal, elle augmente jusqu'au 6e noeud et diminue ensuite. Les études histochimiques (14.55.110) ont révélé d'autre part que la peroxydase peut être détectée avant la division cellulaire et qu'elle est inhibée avec l'arrêt de cette dernière. A l'échelle de la cellule, plusieurs faits sont à noter. Dans la région méristématique, la réaction peroxydasique la plus forte se trouve dans l'hypoderme ; les cellules épidermiques montrent

une faible réaction qui est polarisée vers la partie externe de la cellule. Au niveau de l'écorce par contre, les peroxydases sont plus importantes dans les méats.

La localisation intracellulaire des peroxydases a été entreprise récemment (62.75.89.106). Par les différences spectrales obtenues, certains auteurs ont cru mettre en évidence les peroxydases dans les mitochondries végétales, qui auraient donc été très différentes des mitochondries animales en fait, il s'agissait de contaminations membranaires (39). Le problème de la localisation des peroxydases dans le réticulum endoplasmique, dans les lysosomes ou dans les microbodies, reste entier. Tolbert et Coll. (1968) ont isolé les microbodies de feuille d'Epinard et montré que ces corps, souvent appelés peroxysomes à cause de leur contenu enzymatique, ne contiennent pas de peroxydases. Ces enzymes existent néanmoins au niveau des ribosomes végétaux (62).

II LA LIGNIFICATION ET LES PEROXYDASES

Au cours du vieillissement cellulaire, les parois s'épaississent et parfois s'imprègnent de lignine. Freudenberg (1959), pense que la formation de lignine est induite par une réaction de type peroxydasique, la peroxydase fonctionnant comme une lignine-polymérase (67.83.84.95.96.101). De Jong (1967), constate que dans les cellules corticales, la réaction des peroxydases peut être détectée à la surface de la paroi et non à l'intérieur des couches de cellulose. Toutefois, les études histochimiques n'ont pas révélé de relation étroite entre les peroxydases et la lignification.

III LA RESPIRATION

La large distribution des peroxydases dans les plantes, laisse penser qu'elles joueraient un rôle dans la respiration. Mais, peu d'arguments viennent étayer cette hypothèse. Il est expérimentalement difficile de savoir quelle fraction du système enzymatique respiratoire peut intervenir. Rubin (1963), montre que la peroxydase agit comme une oxydase vraie vis-à-vis du phloroglucinol (trihydroxybenzène); s'il ajoute de l'eau oxygénée, la fonction oxydante diminue. Cette découverte de la fonction phloroglucinol de la peroxydase soulignerait le rôle de cette enzyme dans les échanges gazeux respiratoires. En effet, Rubin note que le système peroxydase-phloroglucinol est capable de réaliser l'oxydation des diphosphopyridines nucléotides réduits.

Peroxydase seule + DPNH	----->	pas d'oxydation
" + DPNH + Phloroglucinol	----->	oxydation importante
" " + " + Mn ⁺⁺	----->	" encore plus import

Cette observation prouverait que les processus oxydants réalisés par la peroxydase peuvent être considérés comme un maillon de la chaîne respiratoire. Toutefois, le lieu et le mécanisme de sa participation dans les chaînes respiratoires restent obscurs.

IV VARIATIONS DES PEROXYDASES AU COURS DU DEVELOPPEMENT

Au cours de la germination, l'activité peroxydasique varie considérablement (2.34.53.71.73). Les résultats obtenus par Hori et Nakamura (1951) (Fig. 2), montrent que l'activité peroxydasique des bourgeons et des cotylédons augmente graduellement après absorption d'eau. Dans le bourgeon, elle atteint son maximum après 5 jours et dans le cotylédon après 6 jours,

ensuite, elle diminue rapidement pour atteindre un minimum à 7 jours. L'activité dans les racines augmente pendant 3 jours puis diminue. Au 4ème jour, elle augmente à nouveau vers une valeur constante qui est toujours plus faible que le maximum atteint après 3 jours.

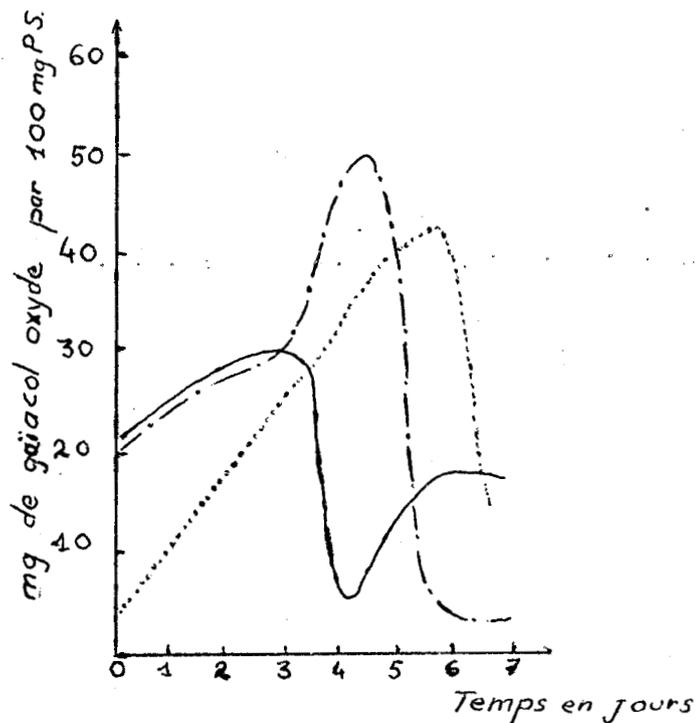


Fig.2 : Activité peroxydasique de la racine (—) du bourgeon (---) et du cotylédon (.....).
(d'après Hori et Nakamura).

Après cette première étape, peu d'auteurs se sont intéressés aux variations des activités peroxydasiques au cours de la vie de la plante, et nous ne possédons que peu de renseignements sur les peroxydases, soit pendant le développement des fruits (3), soit au cours de la senescence des feuilles (7.81. 82.116).

V PEROXYDASES DANS LES TISSUS CULTIVES "IN VITRO"

Les activités peroxydasiques des tissus sains et tumoraux ont été comparées (61.66).

- Lance (1963), s'est intéressé aux tissus de scorsonère et pense que l'activité maximale des peroxydases correspond à la phase de croissance active. L'activité enzymatique évoluerait selon les différentes phases de croissance, sauf pour les tissus anergiés dont la teneur en peroxydase ne varie guère.

- Lavee et Galston (1968), remarquent que le pouvoir de prolifération des fragments de moelle de Tabac est inversement proportionnel à leur teneur initiale en peroxydase.

VI ACTIVITE AUXINES - OXYDASIQUE DE LA PEROXYDASE

La peroxydase a été impliquée dans le processus physiologique du catabolisme auxinique. De nombreux travaux (6.9.19.24.29.31.32.44.52.57.78.90), ont souligné les relations qui existent entre les peroxydases et les auxines-oxydases. Siegel et Galston (1967), en dissociant la molécule de peroxydase en apoenzyme et groupement prosthétique ferrique, montrent que l'hémoprotéine doit être intacte pour oxyder le galacol mais que l'apoperoxydase seule peut catalyser l'oxydation de l'A.I.A. La peroxydase posséderait donc une fonction auxines-oxydasique dans la portion non héminique de la molécule et une seconde fonction dépendante de la soudure hème-protéine capable d'oxyder le galacol.

VII ACTION DES FACTEURS PHYTOHORMONAUX

- L'auxine ne modifie que faiblement l'activité peroxydasique (61), mais agit sur la formation d'isoenzymes (30.63.80).

- L'inhibition de l'élongation radiculaire provoquée par la kinétin serait en relation avec l'augmentation de l'activité peroxydasique (36.37).

Dans les feuilles excisées, la kinétine peut retarder la senescence car elle est capable de maintenir le taux normal de protéines (108). Comme la kinétine augmente l'activité peroxydasique, le maintien pourrait s'expliquer par une action indirecte, en effet, la peroxydase est capable d'hydroxyler la proline (118) en hydroxyproline qui jouerait un rôle dans la synthèse protéinique (82). Mais, les cytokinines inhibent la synthèse des peroxydase et invertase dans les entrenoeuds de la Canne à sucre (41).

- Bon nombre de travaux suggèrent que l'acide gibberellique stimule l'élongation en réprimant l'activité peroxydasique (17.43.50). D'ailleurs, les anti-gibberellines (Amo-1618, Phosphon, Morphactine, C.C.C.) stimulent l'activité peroxydasique (11.33.48.49.59.60). Si l'antagonisme de ces deux groupes de substances donne des résultats variables sur les racines, il est par contre très net pour les organes aériens.

VIII FACTEUR PHYSIQUE : LA TEMPERATURE

Dans les graines avant germination (94.103) ou dans les tiges et les feuilles des plantes (15.42 76.77.91.104), les traitements réfrigérants provoquent une augmentation de l'activité peroxydasique ou font apparaître de nouveaux isoenzymes.

IX FACTEURS BIOLOGIQUES : PATHOLOGIE

Depuis longtemps, on sait que les agents pathogènes (champignons, virus et autres microorganismes) augmentent l'activité oxydasique des cellules. De nombreux travaux (27.69.79.102.114), laissent supposer que la peroxydase jouerait un rôle dans la résistance aux agents pathogènes.

Le rôle physiologique des peroxydases dans la plante n'est pas résolu, mais l'augmentation de l'activité peroxydasique dans les plantes naines (56) et dans les tissus à croissance lente, suggère que la peroxydase peut être un facteur d'inhibition de croissance des plantes. La peroxydase "in vitro" catalyse l'oxydation de l'auxine (29), la formation de lignine à partir de l'alcool coniferique ou de l'eugénol (97), l'oxydation de TPNH, DPNH (1) et de nombreux autres composés (13). Les peroxydases peuvent ralentir la croissance :

- 1°) En agissant sur l'auxine endogène
- 2°) En favorisant la formation d'une paroi lignifiée rigide.

L E S C A T A L A S E S (E.C. 1.11.1.6)

Les catalases décomposent l'eau oxygénée et l'utilisent à la fois comme substrat et donneur d'électrons. Toutes les catalases isolées contiennent 4 molécules d'hématine par protéine (poids moléculaire 240.000). Le groupement prosthétique est la protohématine IX.

I DISTRIBUTION - LOCALISATION

La répartition des catalases est très générale dans le monde vivant (68). Toutefois, les tissus animaux ont généralement une activité plus accusée que les tissus végétaux.

Les jeunes feuilles en sont plus riches que les feuilles âgées (100). D'ailleurs, la répartition n'est pas uniforme, puisque dans les feuilles de Pin (26), il y en a plus dans la région apicale.

La localisation intracellulaire a également été étudiée, les mitochondries de feuilles de Tabac en renferment en grande quantité alors que les chloroplastes purifiés ont une activité catalasique faible (54). Elle a été récemment localisée dans les cristalloïdes des microbodies des cellules végétales (8) alors que dans les microbodies animaux, la catalase se trouve dans la matrix (115).

II LA DETOXICATION

On admet généralement que les catalases protègent l'organisme contre les effets néfastes de l' H_2O_2 .

Le peroxyde d'hydrogène formé dans les tissus peut être dosé par le pyrogallol qui, en présence de peroxydase, sera oxydé en purpurogalline. Celle-ci théoriquement ne se formera pas si on ajoute de grandes quantités de catalase pouvant détruire rapidement l'eau oxygénée tissulaire. On ne trouve pas ce résultat même quand les racines sont prétraitées par 1 mg/ml de catalase. Bjorn (1967) donne trois explications possibles :

- la catalase ne peut pas pénétrer dans le site réactionnel.
- la catalase ne peut pas entrer efficacement en compétition avec la peroxydase.
- la catalase utilise l' H_2O_2 pour la peroxydation du pyrogallol sans libération d' O_2 .

D'autre part, on sait que le KCN est un inhibiteur de l'activité catalasique et en sa présence, on ne constate pas d'accumulation d' H_2O_2 dans les tissus (10).

Toutefois, cet argument est discutable car Siegel et Galston (19) ont montré que le DCP permettait l'accumulation de H_2O_2 dans la plante et Goldacre (1953) avait émis l'hypothèse que le DCP serait un inhibiteur spécifique de la catalase, alors que le KCN employé par Bjorn pourrait ne pas en être un.

III VARIATIONS DES CATALASES AU COURS DU DEVELOPPEMENT

Au cours de la germination, l'activité catalasique augmente rapidement, passe par un maximum puis diminue (2.34.53). Pendant le développement (90), l'activité subit des variations. Les augmentations correspondent en général à un début d'activité physiologique : on a considéré les catalases comme des indicateurs des modifications cytologiques qui se produisent au cours de la croissance des racines (74). Granich (1951), ayant proposé un schéma de la synthèse hème et chlorophylle, les auteurs ont généralement essayé de trouver une relation chlorophylle-catalase, les résultats sont toutefois contradictoires (4.16).

IV CATALASES DANS LES TISSUS CULTIVES "IN VITRO"

Dans les tissus cultivés "in vitro", Galston (1951) a trouvé 4 à 5 fois plus de catalase dans les tissus de Crown-gall que dans les tissus sains : toutefois, selon Lance, cette augmentation ne serait pas en relation avec le caractère tumoral mais, il y aurait un parallélisme entre la vitesse de croissance et l'activité enzymatique des tissus.

V. ACTION DES FACTEURS PHYTOHORMONAUX

L'auxine diminue l'activité catalasique des tissus traités. Les réducteurs de croissance ne la modifient pas (33.60), l'acide gibberellique par contre l'augmente (72). La kinétine stimule l'activité catalasique des coléoptiles d'Orge, alors qu'elle est sans action sur cette enzyme dans les racines de Lentille (34.36).

VI FACTEUR PHYSIQUE : LA LUMIERE

L'activité catalasique varie suivant les différentes radiations lumineuses utilisées (4.5.10), les effets seraient toutefois réversibles.

L'activité catalasique a souvent été liée à la teneur en chlorophylle des végétaux. Mais il n'est pas certain que l'hème des enzymes intervienne dans le métabolisme chlorophyllien. Il est évident que la biosynthèse des porphyrines ferriques a une longue voie commune avec celle de la chlorophylle. On sait également que l'approvisionnement en fer joue un grand rôle dans la teneur en enzymes ferriques. En dépit de très nombreux essais réalisés "in vivo" ou "in vitro", il n'est pas possible de préciser le rôle ni le substrat de la catalase dans la cellule.

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

I T E C H N I Q U E D E C U L T U R E D E S T I S S U S " I N V I T R O "

La technique utilisée s'inspire essentiellement de celle décrite par Gautheret (1959).

Les solutions nutritives employées sont, selon les tissus, la solution minérale de Knop diluée de moitié, ou celle de Heller (1953) à laquelle nous avons ajouté les microéléments de la solution de Berthelot. Ces divers milieux sont solidifiés par de la gélose (0,9 %) et renferment en outre 3 % de glucose. Pour la souche de tissus de Carotte, nous avons ajouté 5.10^{-8} g/ml d'acide indole acétique (A.I.A.).

II M A T E R I E L

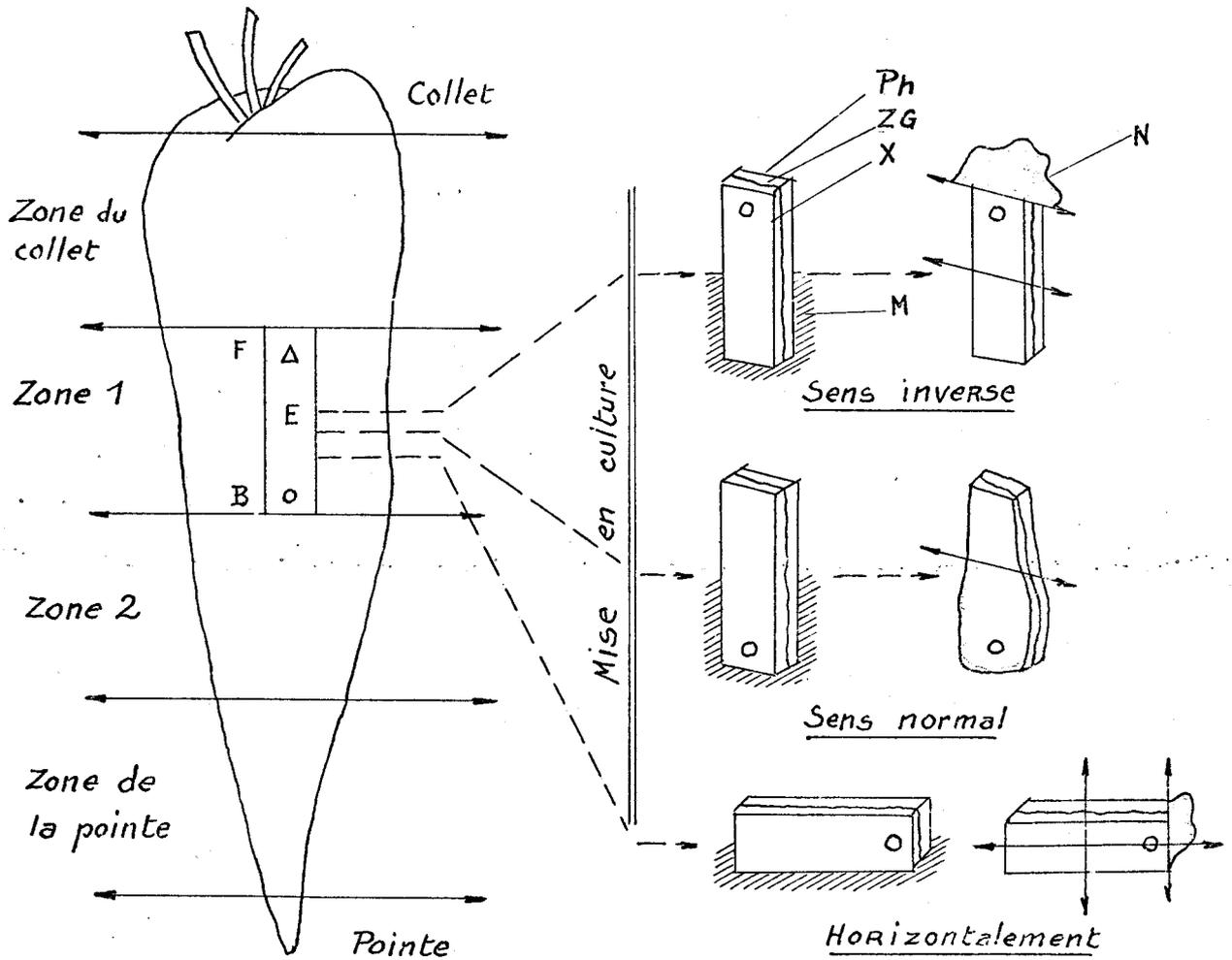
Nous avons utilisé des tissus de feuille d'Endive (*Cichorium intybus* L.) et de racine de Carotte (*Daucus Carota* L.).

A/ T I S S U S D' E N D I V E

Selon la technique décrite par Vasseur (1965), les disques de feuilles sont prélevés au trocard (\varnothing 16 mm) et ensemencés, la face interne au contact du milieu de culture. Dans certains cas, les tissus sont éclairés 12 heures/jour, dans d'autres, ils sont placés à l'obscurité totale.

B/ T I S S U S D E C A R O T T E

Le mode de prélèvement et d'ensemencement des explantats est résumé sur la planche I. Un explantat est dit ensemencé dans le sens normal (N) lorsque son orientation est la même que sur la plante entière, c'est-à-dire que la région foliaire (F) la plus proche du collet est hors



DIFFERENTES ZONES DE PRELEVEMENTS SUR

LA RACINE DE CAROTTE



E: explantat, F: région foliaire, B: région basale, Ph: phloème, ZG: cambium, X: xylème, N: cal, M: milieu de culture

Planche I

du milieu de culture et que la région basale ou radiculaire (B) plonge dans ce milieu. Lorsque l'ensemencement a lieu dans l'autre sens, on dit qu'il est inversé (I).

A la suite de nos premiers résultats, nous avons été amené à utiliser une méthode particulière de découpage des explantats, nous la décrirons ultérieurement.

Par suite de leur polarité, les tissus prolifèrent en donnant un cal qui apparaît toujours à la partie radiculaire du fragment, ce cal est plus développé lorsqu'il croît hors du milieu (34.95.96).

Les tissus néoformés peuvent être isolés aseptiquement et repiqués sur un milieu neuf auquel on ajoute 5.10^{-8} mg/ml d'auxine. Les colonies tissulaires sont ensuite repiquées toutes les huit semaines, on obtient ainsi une souche chlorophyllienne identique à celle de Gautheret (1939). Nous avons également utilisé cette souche ayant subi de nombreux repiquages depuis 1939.

III TECHNIQUES EXPERIMENTALES

A/ MESURE DE LA CROISSANCE

La mesure de la croissance a été effectuée par différents critères

1°) Poids de substance fraîche (PF)

2°) Poids de matière sèche (PS) déterminé après congélation des explantats dans un mélange neige carbonique-acétone et lyophilisation pendant 48 heures.

Connaissant le PS, nous pouvons déterminer le pourcentage en eau des fragments en appliquant la formule :

$$\% \text{ en eau} = \frac{\text{PF} - \text{PS}}{\text{PF}} \times 100$$

3°) Teneur en protéines, mesurée selon la méthode de Lowry et Coll. (1951).

B/ MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

1°) Technique d'extraction

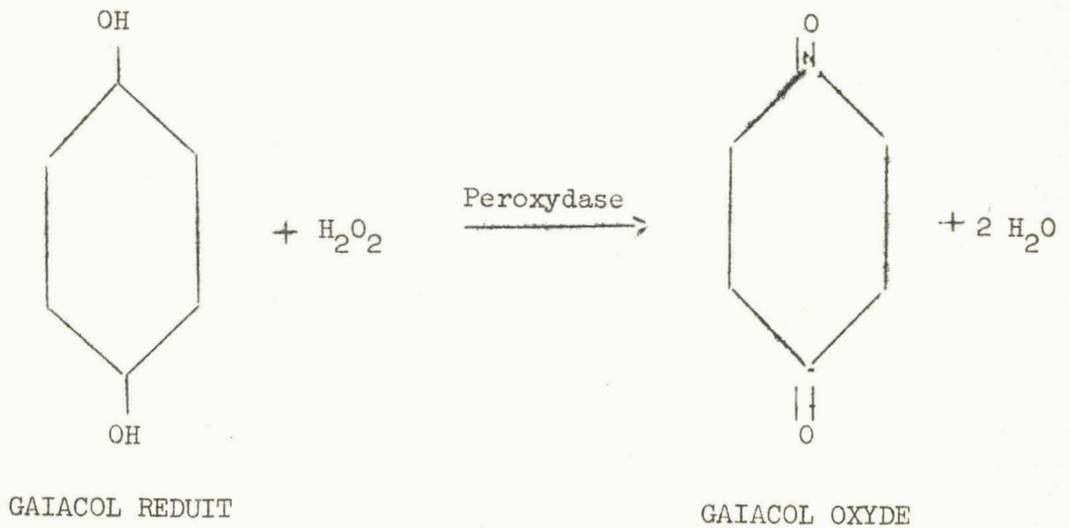
Les tissus sont essuyés, pesés puis broyés dans un mortier, en présence de sable lavé aux acides (0,5 g/g de tissu frais) jusqu'à obtention d'une pâte homogène. Une certaine quantité de la solution tampon (phosphate monopotassique et disodique de pH 6,8 et de molarité 0,066) est mélangée soigneusement au broyat, le tout est recueilli dans un tube à centrifugation. Le mortier et le pistil sont ensuite rincés, le volume final de tampon étant fonction du poids de substance fraîche utilisée. Toutes ces manipulations se déroulent à 4°C. Le broyat est alors centrifugé à 0°, à 10.000 g pendant 10 mn pour les tissus d'Endive, ou à 3000 g pendant 20 mn pour les tissus de Carotte, ce qui permet l'élimination du sable et des débris cellulaires. Le surnageant qui renferme les protéines cytoplasmiques et les mitochondries, constitue la préparation enzymatique. Les extraits placés en chambre froide et à l'obscurité sont utilisés immédiatement. En effet, contrairement aux solutions de peroxydases pures qui peuvent être conservées à 2°⁺ pendant plusieurs jours, l'activité des extraits bruts varie en vieillissant ; elle augmente sensiblement pour les extraits concentrés, mais diminue pour les solutions diluées.

2°) Mesure des activités enzymatiques

a) Dosage de la peroxydase -

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les peroxydases sont capables de catalyser l'oxydation de nombreuses substances par le peroxyde d'hydrogène. L'oxydation des phénols et des amines aromatiques

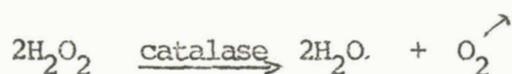
aboutit à la formation de produits colorés qui permettent par des mesures photocolorimétriques, d'apprécier l'activité de cette enzyme. Les donneurs d'électrons les plus usités sont le pyrogallol (Willstater et Stoll, 1918), le gaïacol (Lance, 1963), la benzidine (Van Duijn, 1955). Toutefois, les extraits renferment toutes les enzymes cellulaires, il faut donc éviter les interférences avec des enzymes de nature différente. En effet, l'emploi du pyrogallol comme donneur d'électron n'exclut pas la possibilité d'une oxydation de ce réactif par les polyphénol-oxydases, lorsqu'elles sont hydrosolubles. Afin d'éliminer au maximum l'action perturbatrice de ces enzymes, Lance préconise l'usage du gaïacol, selon la réaction :



On mesure donc colorimétriquement l'intensité de la coloration brune due à la formation de tétragaïcoquinone à l'obscurité, à 25°C. La variation de densité optique lue à 420 nm. après 5 minutes d'incubation, permet d'évaluer l'activité de la préparation enzymatique. L'accroissement de densité optique est ensuite rapporté à différents critères : PF, PS, azote protéique des extraits (ENP) ou des tissus (NP). L'étude de ces critères sera envisagée ultérieurement.

b) Dosage de la catalase -

La méthode généralement utilisée pour mesurer l'activité catalasique est basée sur la détermination de la constante de vitesse de réaction du 1er ordre de la décomposition de l'eau oxygénée (Euler, 1927). La réaction est la suivante :



Toutefois, les fortes concentrations d'eau oxygénée peuvent inactiver l'enzyme aussi, Feinstein (1949), remplace le peroxyde d'hydrogène par du perborate de sodium ($\text{NaBO}_2, \text{H}_2\text{O}_2, 3\text{H}_2\text{O}$) et suit le taux de disparition de ce substrat par le titrage au permanganate de potassium, comme dans la méthode d'Euler. Il est évident que le substrat (H_2O_2) provient de la destruction du perborate et que le maintien de très basses concentrations d'eau oxygénée durant la réaction, réduit l'inactivation de l'enzyme.

C/ CRITIQUES METHODOLOGIQUES

1°) L'extraction

a) Le volume du tampon d'extraction

Les extraits enzymatiques, comme nous l'avons dit précédemment, sont obtenus par broyage au mortier des tissus végétaux, en présence d'une certaine quantité de tampon. Des essais réalisés sur des fragments de feuille d'Endive avant leur mise en culture, ont montré que suivant le volume de tampon utilisé, les activités enzymatiques absolues pouvaient varier (Fig. 3). Ces variations sont dues à différents phénomènes : les volumes faibles, (1 ou 2 ml par g de PF) ne permettent pas une homogénéisation parfaite, les tissus contiennent beaucoup d'eau (90%) qui peut diluer les

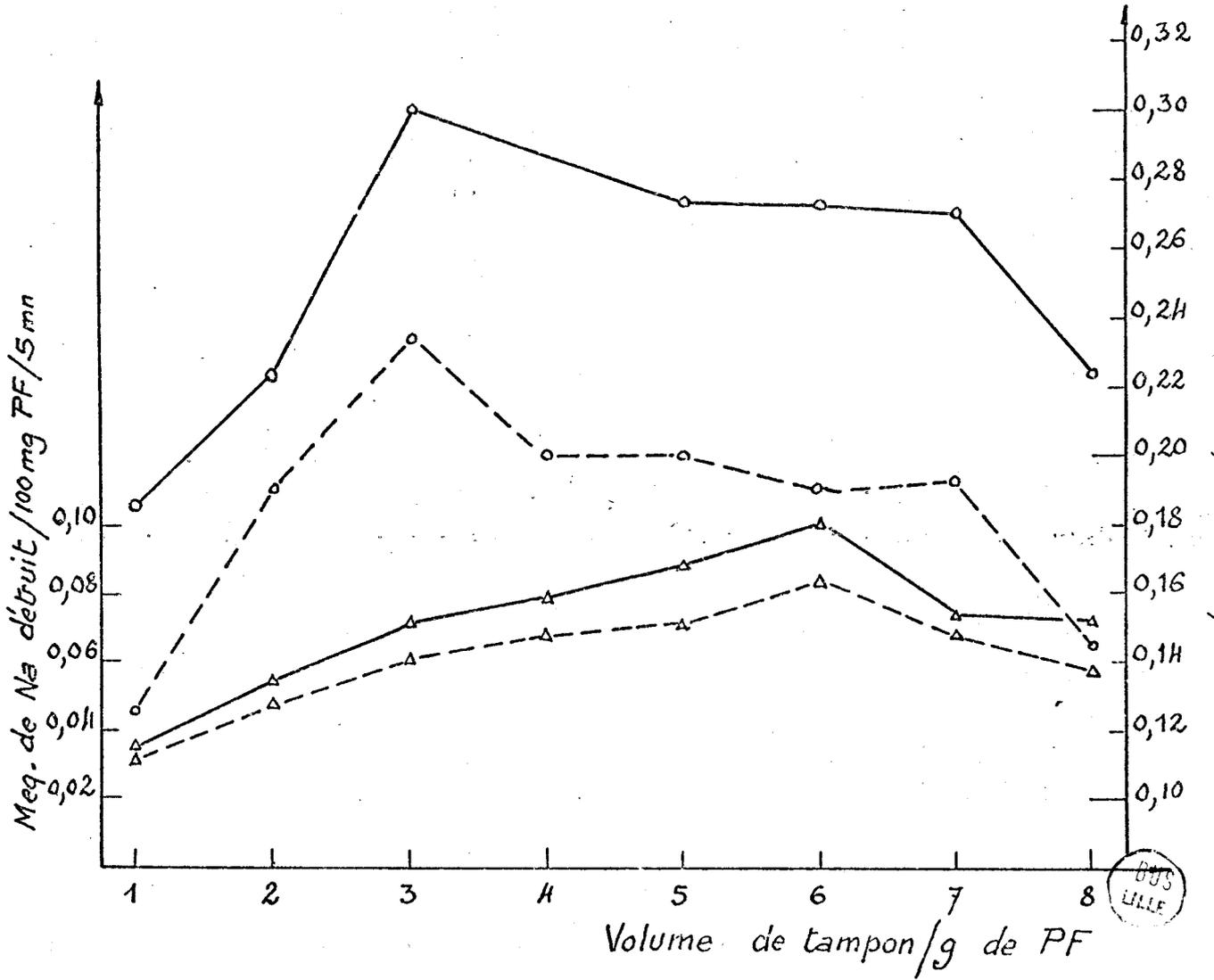


Fig. 3 : Activités catalasique (Δ) et peroxydasique (\circ) d'extraits de feuille externe (----) et de feuille centrale (—) du bourgeon d'Endive en fonction du volume de tampon d'extraction.

enzymes sans que l'on puisse en tenir compte pour l'activité calculée par rapport au poids de substance fraîche. On peut également invoquer la présence d'inhibiteurs de ces enzymes qui se trouveraient plus concentrés pour les faibles volumes. Enfin, pour les volumes plus importants, 7 ou 8 ml, il semble que l'enzyme, moins concentrée, soit inactivée par le substrat.

Il est toutefois intéressant de noter que les activités enzymatiques relatives ne varient pas ; elles sont toujours supérieures dans les feuilles centrales quels que soient les volumes de tampon utilisés. Aussi, afin d'éviter l'effet de dilution des extraits, nous avons choisi de prendre 5 ml de tampon/g PF quand l'activité enzymatique est faible, et 10 ml/g PF quand elle est forte et, au cours d'une même expérience, les extractions sont faites avec des volumes identiques, afin de pouvoir comparer les résultats.

b) Le pH du tampon d'extraction

Pilet (1967) a montré que la valeur du pH d'extraction avait une importance considérable pour la mesure des activités auxines-oxydasiques. Nous avons donc réalisé des extraits avec des solutions tamponnées à Ph 5, 6, 7 et 8. Après extraction, les variations de pH des extraits sont les suivantes :

+	0,4	pour	pH	5,0
-	0,1	"	"	6,0
-	0,1	"	"	7,0
-	0,55	"	"	8.

L'activité peroxydasique mesurée dans chacun de ces extraits (Fig. 4) est toujours supérieure pour les pH d'extraction 6 et 7, mais les différences trouvées pour ces deux pH ne permettent pas de considérer

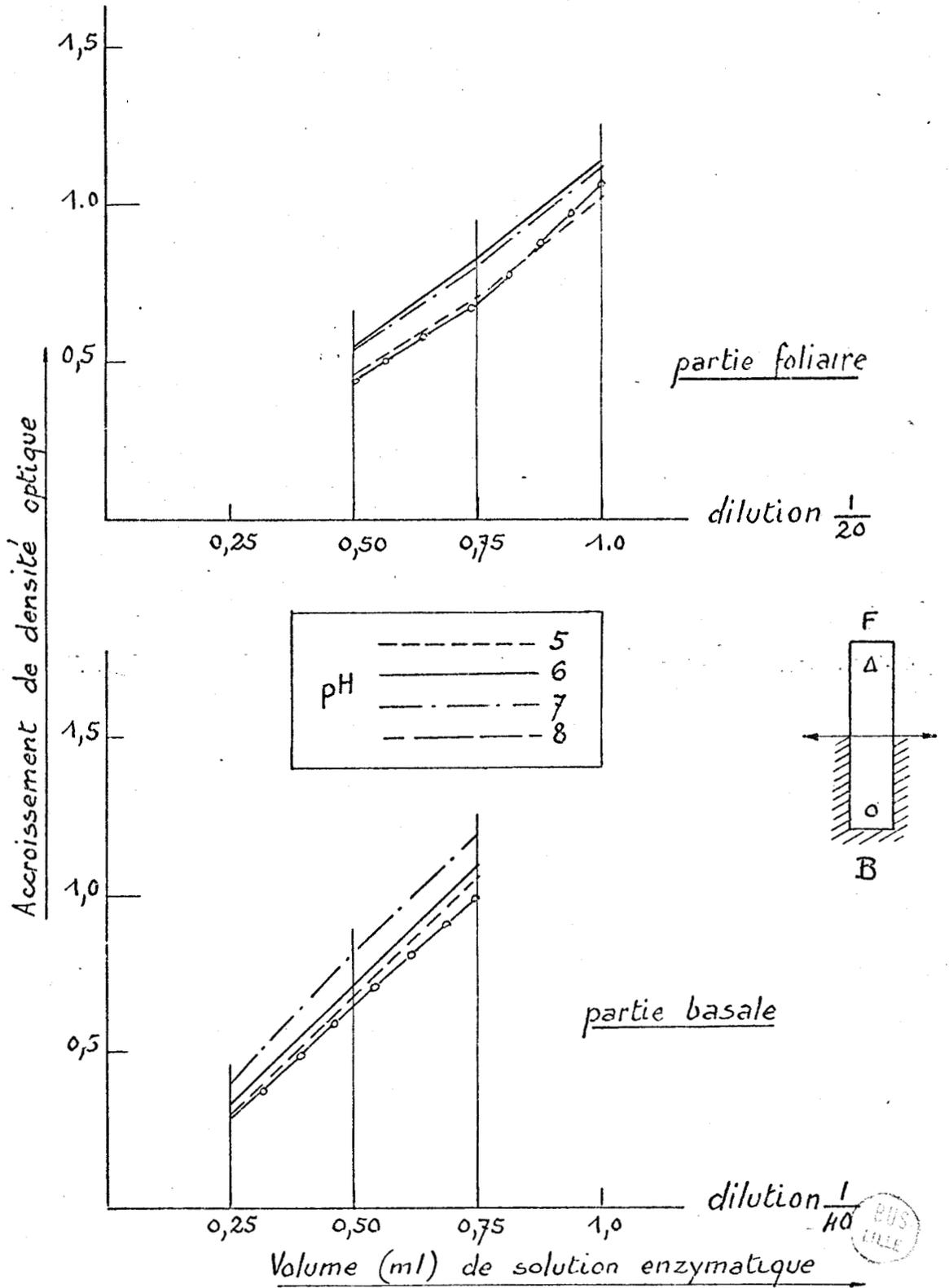


Fig A Influence du pH d'extraction sur l'activité peroxydasiqye des parties basale et foliaire de fragments de racine de carotte ensemencés dans le sens normal

un pH optimum. Nous avons donc finalement conservé le pH 6,8 qui est celui le plus généralement utilisé pour l'extraction de ces enzymes.

2°) L'activité peroxydasique

a) Le pH de la solution active

Afin de toujours obtenir un volume final de 10 ml dans la cuve colorimétrique (Planche II), il faut ajouter (2 - x) ml d'eau distillée comme l'indique Lance. (x étant le volume d'extrait utilisé). On pouvait se demander si le pH 5,3 de l'eau distillée utilisée ne modifiait pas le déroulement de l'action enzymatique en agissant sur le milieu réactionnel.

Nous avons remplacé l'eau par deux solutions tamponnées, l'une à pH 6, l'autre à pH 6,8. Les pH à l'intérieur de la cuve sont alors respectivement 5,98 pour l'eau, 6 et 6,32. L'examen de la figure 5 montre que les résultats sont pratiquement identiques avec les différentes solutions utilisées.

b) Le pH du milieu réactionnel

pH	5,0	5,2	5,4	5,6	5,8	6,0	6,2	6,4	6,6	6,8	7,0	8,
Activ.pero. p/100 mg,PF	10,03	10,10	10,71	10,81	11,12	11,50	11,97	11,86	11,67	11,09	9,24	6.

TABLEAU I : ACTIVITE PEROXYDASIQUE EN FONCTION DU pH DU MILIEU REACTIONNEL.

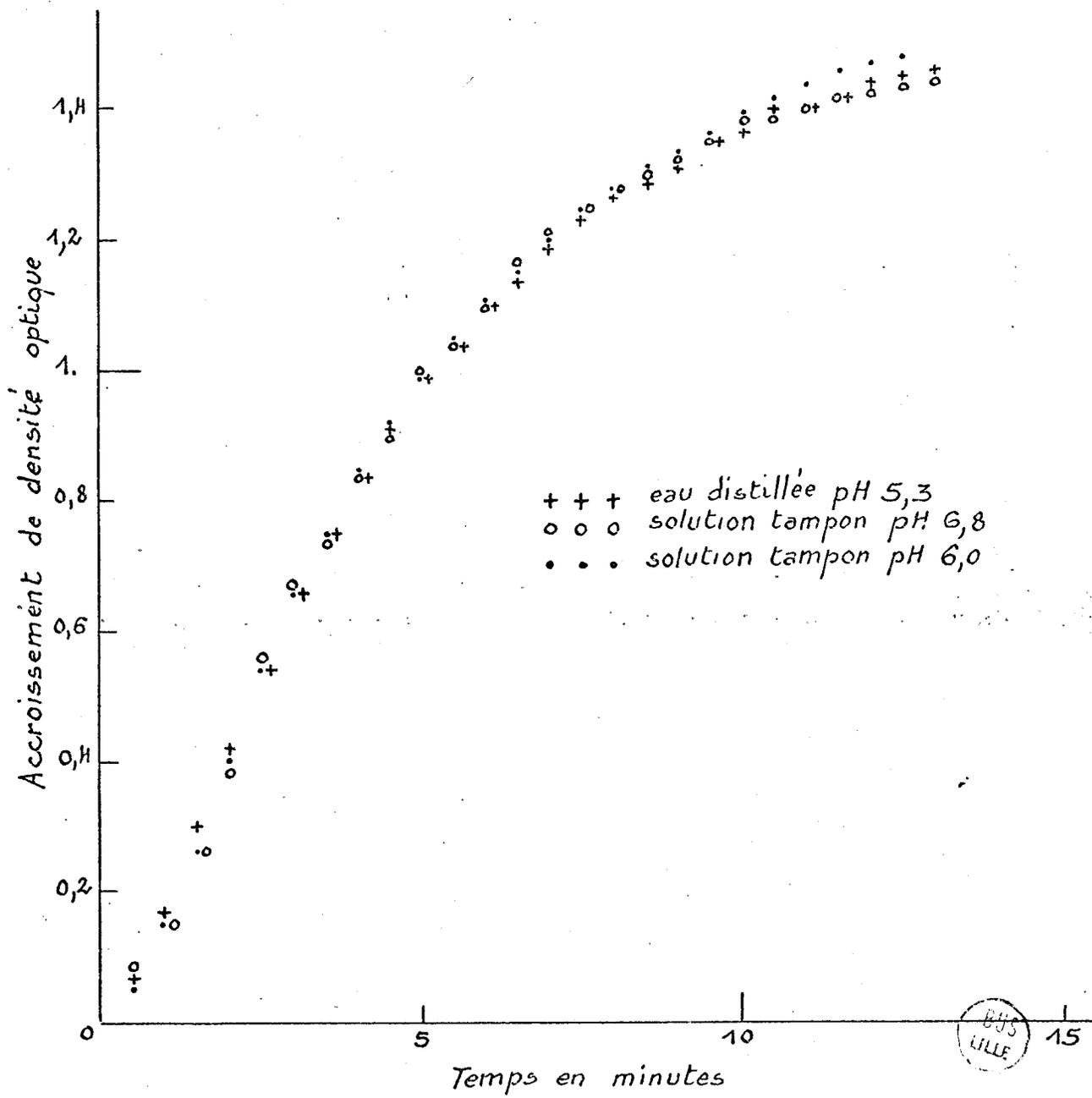


Fig 5 Influence du pH de la solution active

BUS LILLE

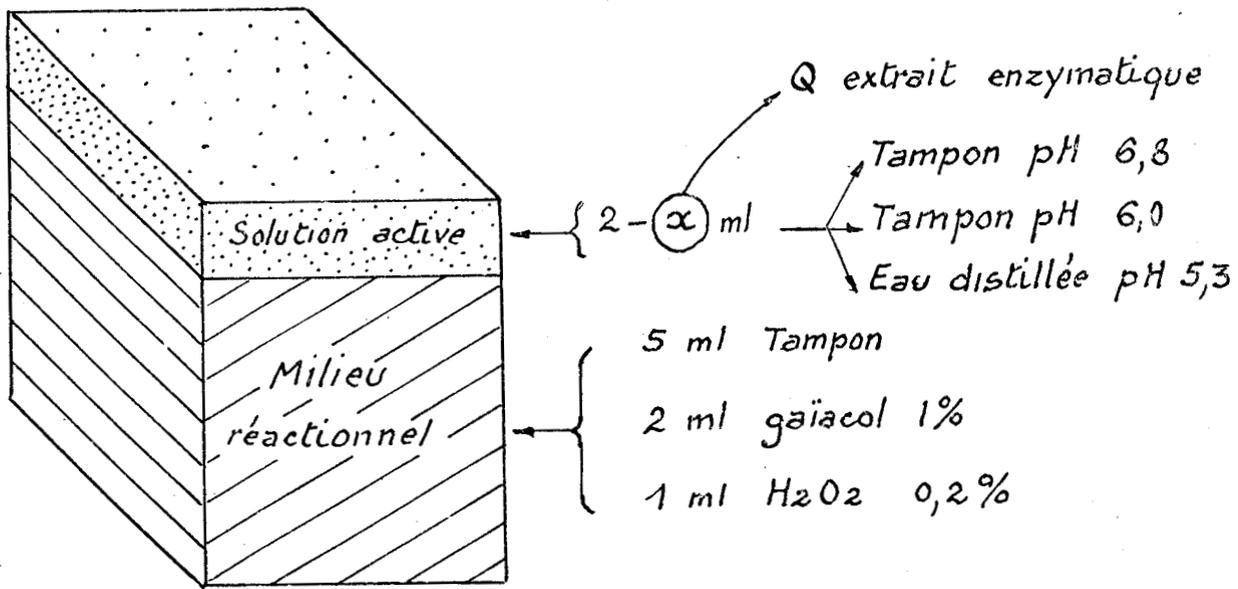


Planche II

Nous avons fait varier le pH du milieu réactionnel en prenant 2 ml de gaïacol et 1 ml d' H_2O_2 et en ajoutant des solutions de tampon phosphate de 5 à 8 unités pH (Planche II). L'extraction de la solution enzymatique est faite à pH 6,8. L'extrait est alors dilué au 1/20ème et l'activité peroxydasique pour $x = 1$ ml de la solution diluée est ensuite dosée pour chaque pH.

L'activité peroxydasique est optimale à pH 6,2 puis décroît sensiblement pour les pH 7 et 8 (Tableau I).

Dans la suite de nos essais, nous avons utilisé une solution de tampon pH 6.

c) Le temps d'incubation

Quatre solutions ont été préparées à partir d'un extrait d'explants primaires de Carotte cultivés "in vitro" pendant 40 jours.

Solution A 1 ml de solution mère + 20 ml tampon pH 6,8

" B " " " " + 40 ml " "

" C " " " " + 60 ml " "

" D " " " " " " "

Pour chaque dilution, le processus expérimental est le suivant :

- dans la cuve colorimétrique contenant le mélange réactionnel plus 1 ml d'eau distillée, on ajoute rapidement 1 ml de solution enzymatique. Les variations de densité optique sont mesurées toutes les 30 secondes. Entre chaque lecture, le contenu de la cuve est agité avec une baguette de verre.

Pour les solutions trop concentrées (Fig. 6), la vitesse d'oxydation du gaïacol diminue progressivement en fonction du temps, mais les valeurs trouvées restent proportionnelles pour les dilutions B et C. Cinq minutes suffisent pour le déroulement de la réaction. Pour des temps trop courts, il n'y a pas proportionnalité entre la variation de densité optique et la dilution employée.

Enfin, pour une dilution donnée et pour une durée de réaction de 5 mn, l'accroissement de densité optique est proportionnel au volume, donc à la concentration (Fig. 7).

3°) L'activité catalasique

a) La concentration enzymatique

Selon Feinstein, l'activité catalasique doit se traduire graphiquement par une droite, lors du dosage, elle est donc proportionnelle à la quantité d'enzyme ou au volume d'extrait utilisé. Pour obtenir ces conditions idéales, nous avons constaté qu'il fallait souvent diluer les extraits dans de fortes proportions, ce qui risquait de dénaturer les protéines. De plus, il s'agit d'extraits bruts, dont la composition est inconnue et à fortiori la teneur en enzymes. Pour chaque extrait, il aurait fallu par des essais successifs, chercher la concentration donnant l'activité strictement proportionnelle au volume d'extrait utilisé, ce qui est incompatible avec de nombreux dosages. Rappelons d'une part que de trop

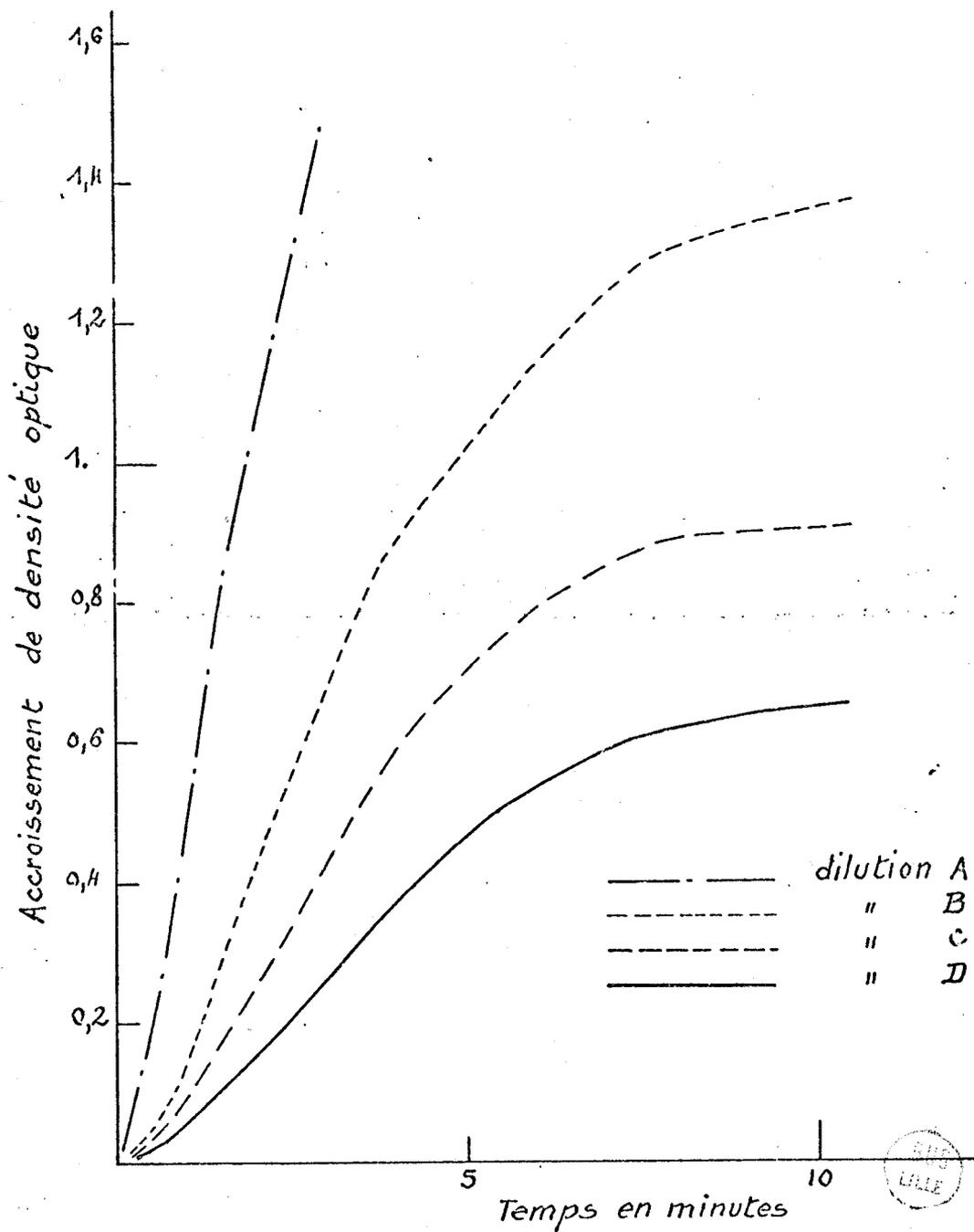


Fig 6 Influence de la durée de la réaction sur la vitesse d'oxydation du gaïacol

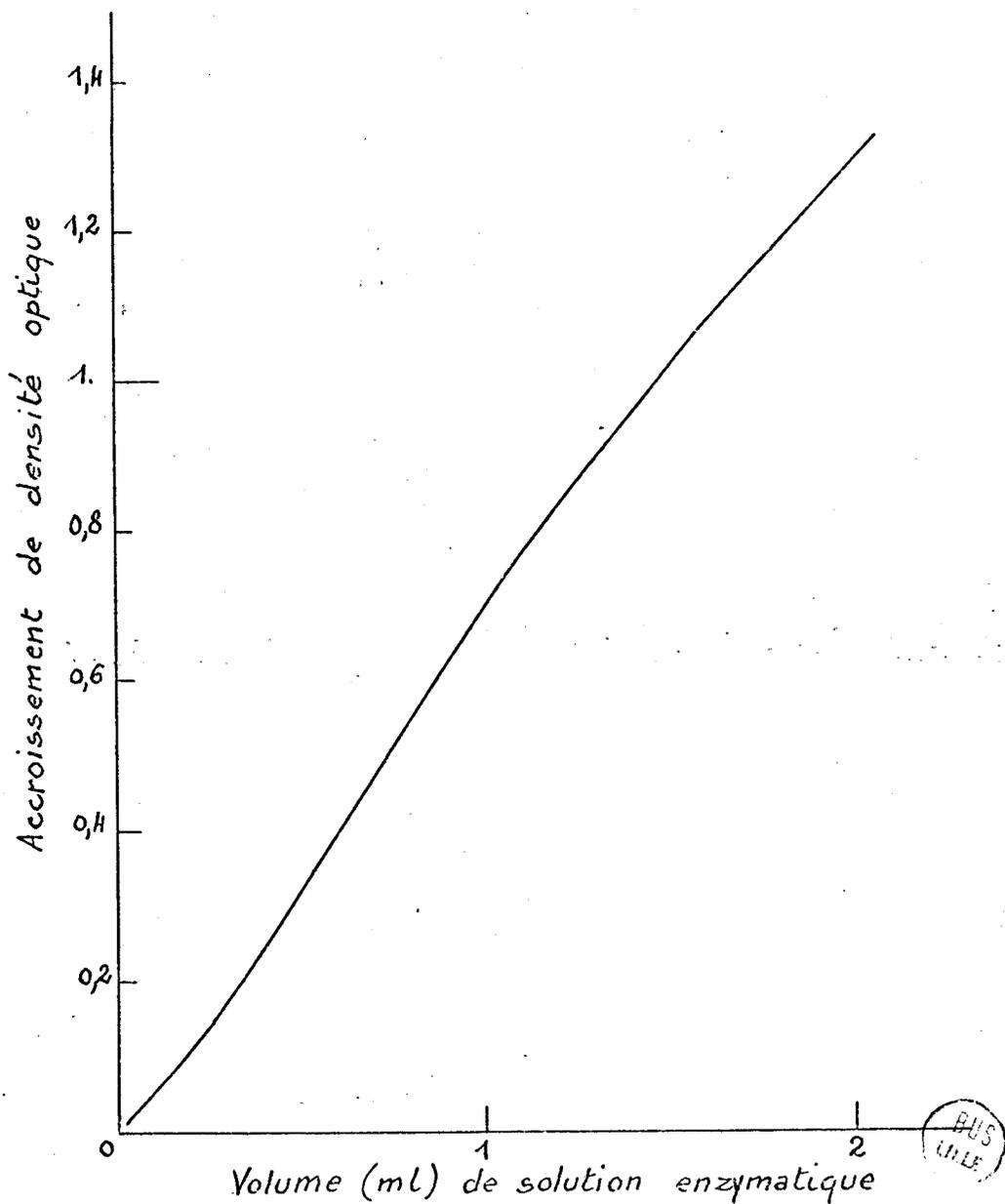


Fig 7 Mesure de l'activité peroxydasique en fonction de la concentration enzymatique
(solution mère diluée à $\frac{1}{60}$)

fortes concentrations d' H_2O_2 risquent d'inactiver l'enzyme ce qui peut intervenir pour des extraits trop dilués et d'autre part que le substrat peut jouer un rôle limitant pour les solutions enzymatiques concentrées. Aussi, nous avons tenté de voir si le rapport d'activité de deux extraits dont l'un a une activité catalasique supérieure à l'autre pour des volumes d'extraits faibles, ne pouvait se trouver inversé pour des volumes plus importants (Fig. 8). Nous constatons qu'il n'en est rien et si l'effet limitant du substrat est plus sensible pour l'extrait concentré, cette action s'exerce également sur l'extrait dont l'activité catalasique est plus faible.

Afin d'éviter toute erreur possible, nous avons choisi de prendre 0,5, 1 et 1,5 ml de chaque extrait et d'établir une moyenne sur les trois valeurs obtenues.

b) La température d'incubation

Feinstein précise également que la réaction doit se dérouler à la température de 37° , ce qui semble évident puisqu'il utilise des extraits provenant de tissus animaux. Les catalases extraites des tissus végétaux pouvaient ne pas avoir les mêmes caractéristiques que celles du Rat. Nous avons donc fait varier la température d'incubation de 5° en 5° (Fig. 9). La décomposition du perborate de Na par la catalase croît régulièrement pendant l'augmentation de température de 5 à $40^\circ C$, elle chute ensuite jusqu'à 60° (température de coagulation des protéines). L'optimum d'activité se situe aux alentours de $42, 43^\circ$, donc, la température d'incubation utilisée dans nos essais peut sans inconvénient être celle préconisée par Feinstein, c'est-à-dire 37° . Parallèlement à l'activité catalasique, nous avons suivi l'activité réductrice du perborate de sodium sur le permanganate de potassium au cours de l'élévation de température et nous avons constaté qu'elle ne variait pas. Feinstein signale

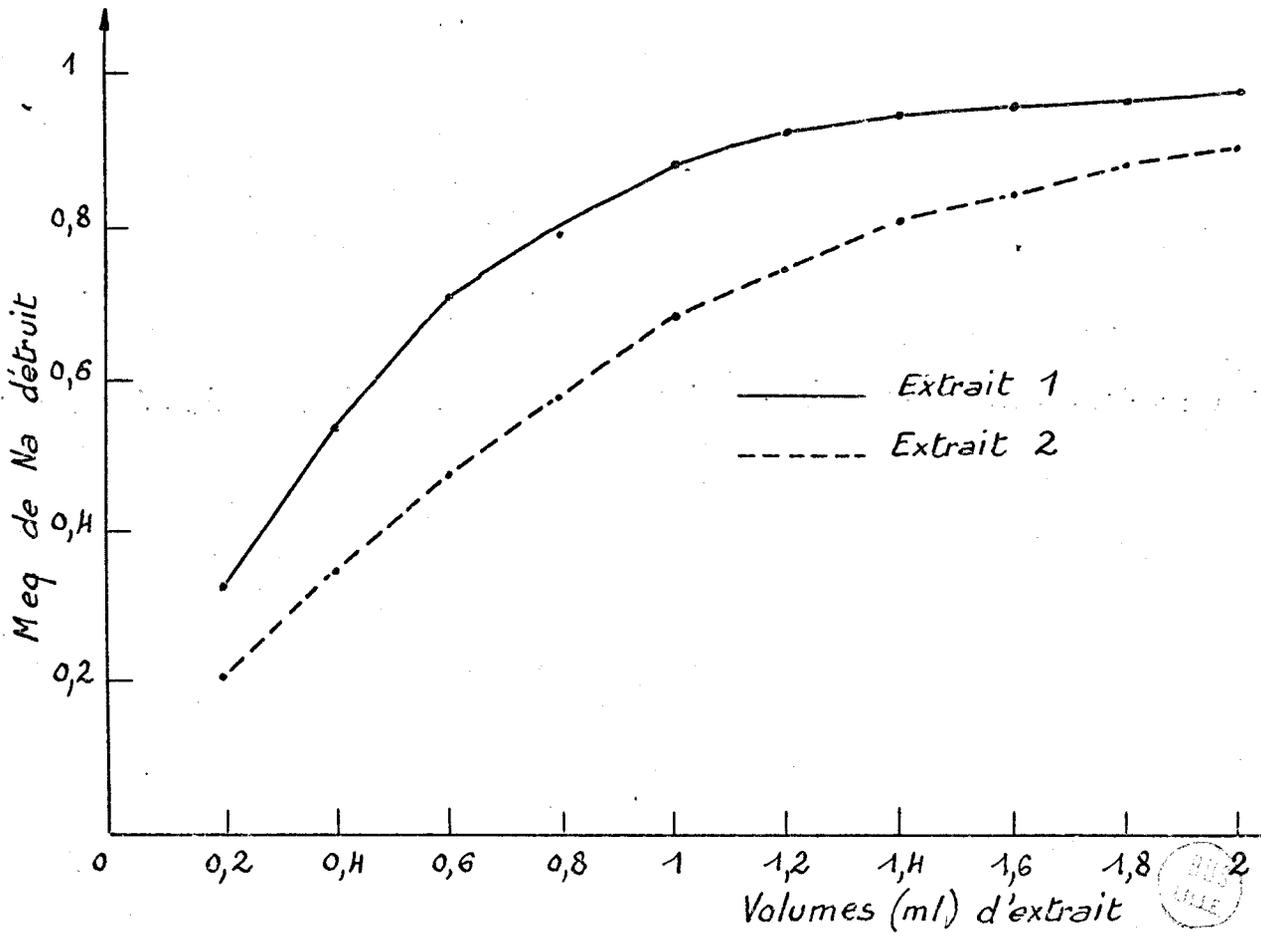


Fig. 8 : Mesure de l'activité catalasique en fonction de la concentration enzymatique.

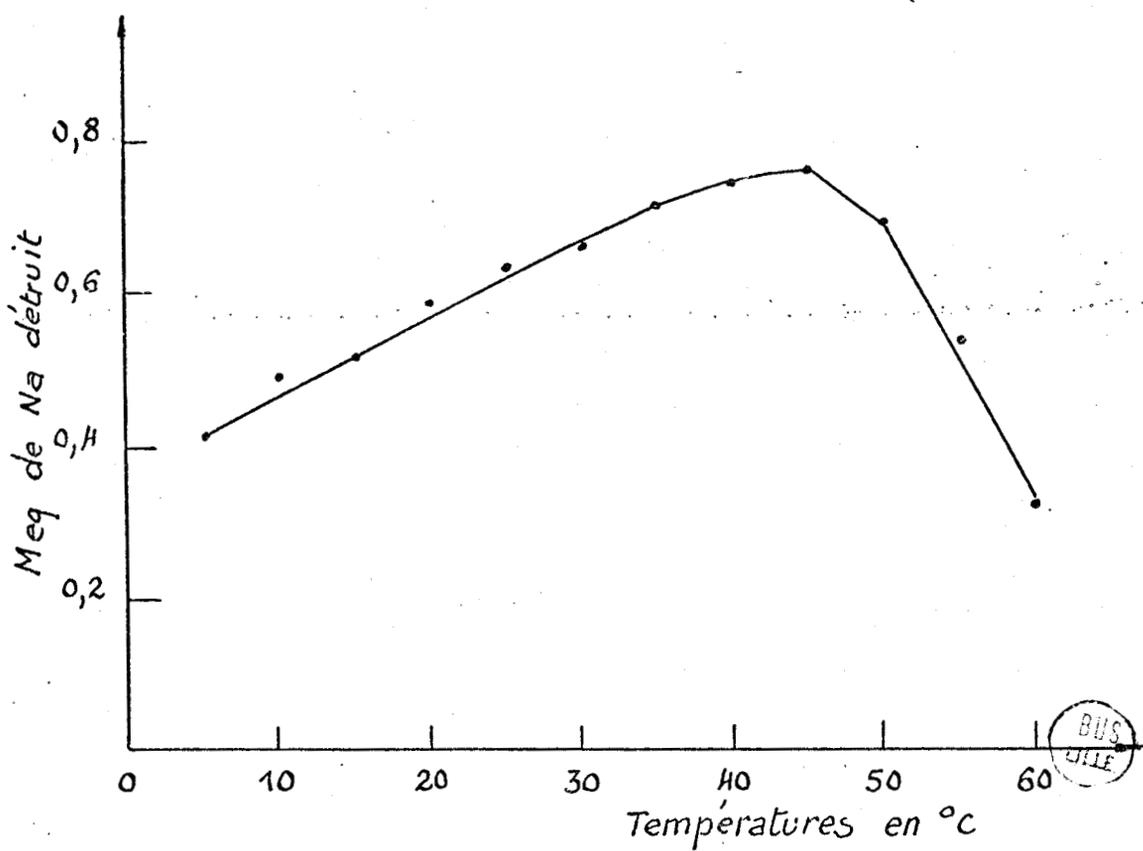


Fig. 9 : Influence de la température d'incubation sur la vitesse de décomposition du perborate de sodium par la catalase de fragments de racine de Carotte.

d'ailleurs que le perborate ne perd que 0,9 % de ses capacités réductrices quand il est maintenu pendant deux heures à la température ambiante, or, nos essais ne durent que 5 minutes.

c) Description de la technique

A la suite de ces essais, l'activité catalasique est mesurée de la façon suivante :

- Dans cinq tubes à essais, placés dans un bain marie à 37°, sont ajoutés 10 ml d'une solution de $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ à 1,5 % dont le pH est ajusté à 6,8 par de l'acide chlorhydrique. Les tubes étant numérotés de 1 à 5, on ajoute dans le premier et le cinquième 2 ml de tampon pH 6,8. Les autres tubes reçoivent (2 - x) ml de tampon, x étant des volumes d'extraits égaux à 0,5, 1, 1,5 ml. Après 5 mn, 5 ml d'acide sulfurique (1/10) sont versés, afin de détruire l'enzyme. Le perborate résiduel est dosé par le MnO_4K (N/10). Le nombre de milliéquivalents de Na détruit pour chaque volume d'extrait est donné par la formule :

$$\frac{0,974}{y} (y - z) = \text{Nb meq. Na détruit pour } x \text{ ml d'extrait}$$

ou

0,974 = nb de meqNa dans la prise d'essai (10 ml)

y = Volume de MnO_4K versé dans le tube 1 ou 5

z = Volume de MnO_4K versé dans le tube 2 par exemple

y - z = Donne le volume de NaBO_3 détruit

Notons que les tubes 1 et 5 doivent donner des valeurs identiques.

4°) Choix d'un critère de référence

Le critère choisi pour témoigner de l'activité enzymatique a fait l'objet de nombreuses controverses. En prenant l'exemple des peroxydases nous avons rapporté l'activité à différents critères et analysé les résultats (Fig. 10). Lorsque les extraits sont réalisés à partir de matériel frais ou de matériel lyophilisé, on constate que l'activité enzymatique augmente lorsqu'on passe des feuilles externes (E) aux feuilles internes (C) de l'Endive.

Il en est de même lorsque les résultats sont exprimés par rapport aux protéines de l'extrait. Par contre, si les protéines totales sont choisies comme unité de référence, on note que la courbe d'activité est inversée. Cette inversion s'explique par un accroissement important du taux des protéines alors que les différences d'activités enzymatiques des fragments sont plus nuancées. Pour la même raison, si l'activité peroxydase trouvée pour 100 mg de poids frais est ramenée à l'unité de poids sec correspondant, on n'observe plus de variations.

Donc, qu'il s'agisse de matériel frais, de matériel lyophilisé ou d'activité spécifique, les variations d'activités enzymatiques sont comparables. Pour plus de commodité, nous ne considérerons que les résultats exprimés par rapport au poids frais.

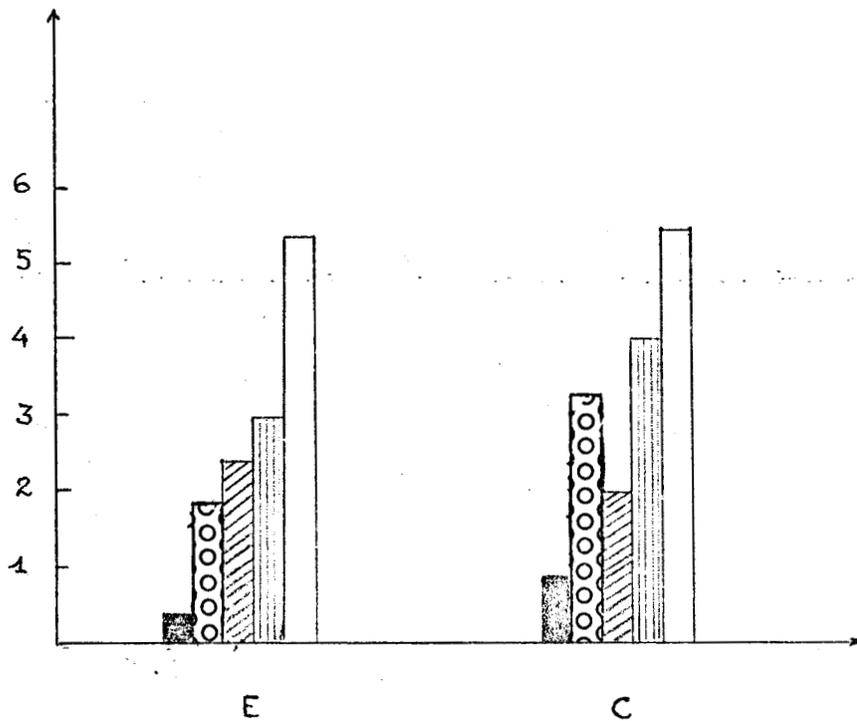
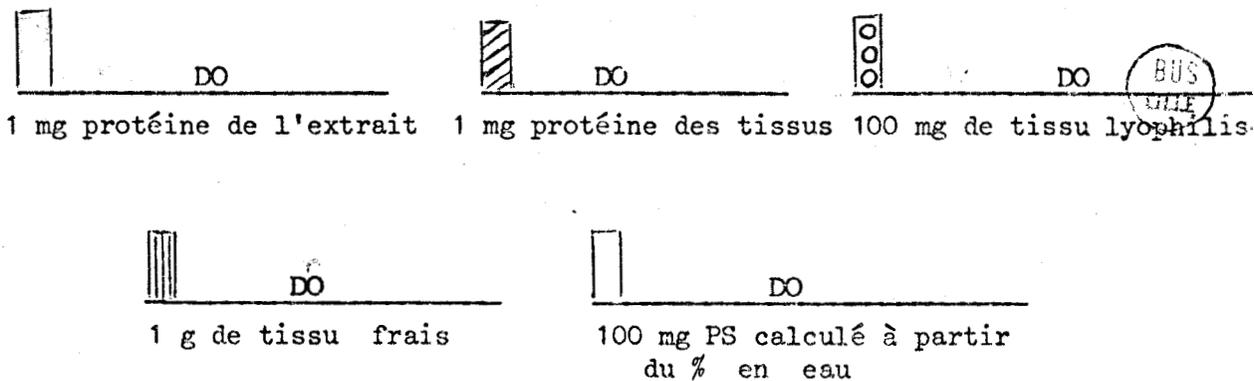


Fig. 10 : Etude de l'activité peroxydasique selon différents critères dans des fragments prélevés sur des feuilles Externes (E) et Centrales (C).



RESULTATS EXPERIMENTAUX

I TISSUS DE CAROTTE

Des fragments de racine de Carotte ont été cultivés sur le milieu de Heller, additionné dans certains cas d'acide 3-indolyl-acétique (A.I.A). Les tissus néoformés par les explantats ont été repiqués à plusieurs reprises et leur comportement a été comparé à celui de la souche isolée par Gautheret. Nous avons également utilisé cette souche pour étudier l'influence de diverses substances de croissance sur les activités catalasique et peroxydasique.

A/ REPARTITION DES PEROXYDASES ET DES CATALASES DANS LES DIFFERENTS TISSUS DE LA RACINE DE CAROTTE -

La zone génératrice étant généralement bien visible, il est facile d'isoler le phloème, le xylème et la zone cambiale. Une tranche de 1 cm est éliminée à chaque extrémité de la racine ; sur des fragments de 3 cm prélevés dans la région proche du collet, ou vers la pointe, les différents tissus sont séparés et les activités enzymatiques dosées (Tableau II).

Quel que soit le niveau de prélèvement, les activités catalasique et peroxydasique du phloème sont supérieures à celles des autres tissus. La pointe de la racine est moins riche en catalase et en peroxydase que le collet.

	ACTIVITES			
	Peroxydasique		Catalasique	
	Collet	Pointe	Collet	Pointe
Phloème	2,56	1,76	0,306	0,266
Zone génératrice	1,08	0,86	0,294	0,236
Xylème	0,60	0,56	0,204	0,158

TABLEAU II : ACTIVITES ENZYMATIQUES DES DIFFERENTS TISSUS DE LA RACINE DE CAROTTE.

Les tissus ont donc des activités enzymatiques différentes. Les enzymes sont réparties selon un gradient transversal, les régions externes étant les plus riches. On pourrait toutefois s'étonner que le tissu ligneux possède moins de peroxydase qu'un tissu cellulosique, puisque cette enzyme intervient dans le phénomène de lignification. La pauvreté relative en enzymes de la pointe de la racine par rapport à la région du collet témoigne également de l'existence d'un gradient axial. Ces différentes constatations nous ont amené à ne prélever les explantats que dans la région médiane de la racine, afin d'obtenir un matériel suffisamment homogène.

B/ CULTURE "IN VITRO" DE FRAGMENTS DE RACINE DE CAROTTE

1°) Evolution des activités peroxydasique et catalasique

Nous avons réalisé des ensemencements dans le "sens normal" (N) et dans le "sens inverse" (I), les fragments étant enfoncés à moitié dans le milieu de culture. Les activités enzymatiques ont été dosées dans la partie immergée, dans la partie hors du milieu ainsi que dans le cal.

Dès les premiers jours de culture, l'activité peroxydasique de la partie immergée augmente considérablement, que le fragment soit en position inverse ou normale. Dans la région située hors du milieu, l'augmentation est quatre fois plus faible. Elle atteint sa valeur maximale vers le 21^e jour, décroît ensuite jusqu'au 35^e jour, puis croît à nouveau. Le cal qui ne se développe bien qu'hors du milieu de culture, à la région basale des fragments ensemencés en position inverse (I), a une activité peroxydasique sensiblement identique à celle des tissus sous-jacents (Fig. 11). L'activité catalasique augmente pendant les sept premiers jours puis décroît ensuite (Fig. 12). Les différences d'activité catalasique entre les deux régions d'un explantat sont plus nuancées que celles trouvées pour les peroxydases. Elles se traduisent par une activité prédominante dans la région immergée jusqu'au 14^e jour ; ensuite, l'activité est plus forte dans la région hors du milieu.

Lorsque le cal apparaît, il a une activité catalasique nettement supérieure à celle des tissus sous-jacents, cette différence s'estompe par la suite.

2°) Répartition des peroxydases et des catalases dans des fragments de racine de Carotte après 35 jours de culture

L'activité peroxydasique des régions immergées étant deux fois plus importante que celle des régions placées hors du milieu, nous avons ensemencé les explantats de différentes manières. Les uns, étaient placés simplement à la surface du milieu, d'autres, enfoncés à moitié dans le milieu (comme précédemment), d'autres enfin, étaient complètement immergés et placés, soit dans le "sens normal" (N), soit en "sens inverse" (I). Après 35 jours de culture, les activités enzymatiques ont été dosées,

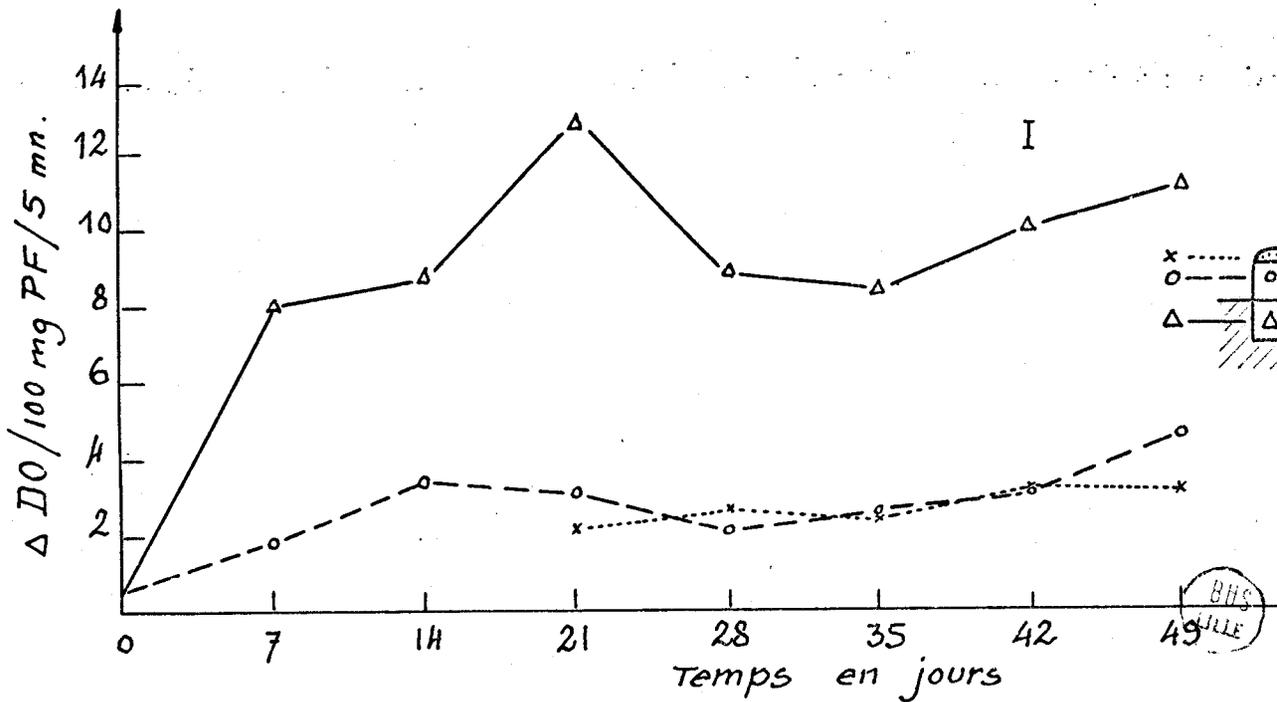
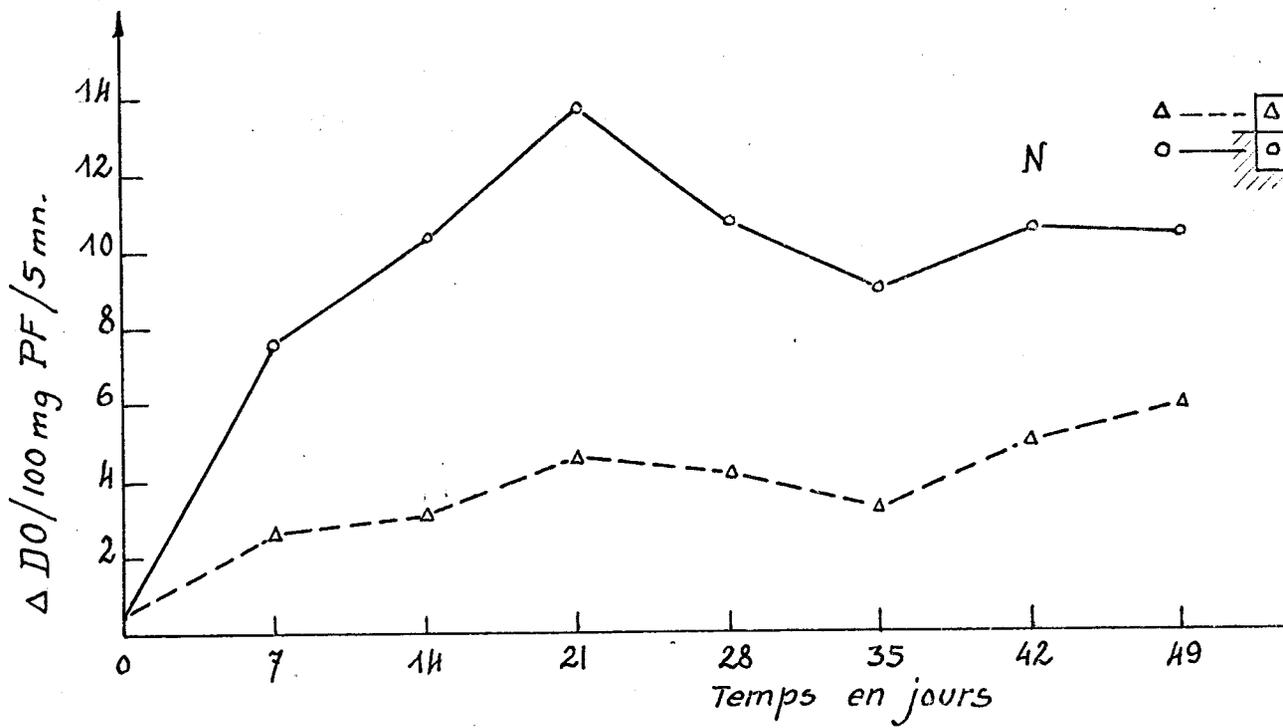


Fig. 11 : Evolution de l'activité peroxydasique de fragments de racine de Carotte, selon leur orientation par rapport au milieu de culture.

N = Fragment ensemencé "sens normal"

I = Fragment ensemencé "sens inverse".

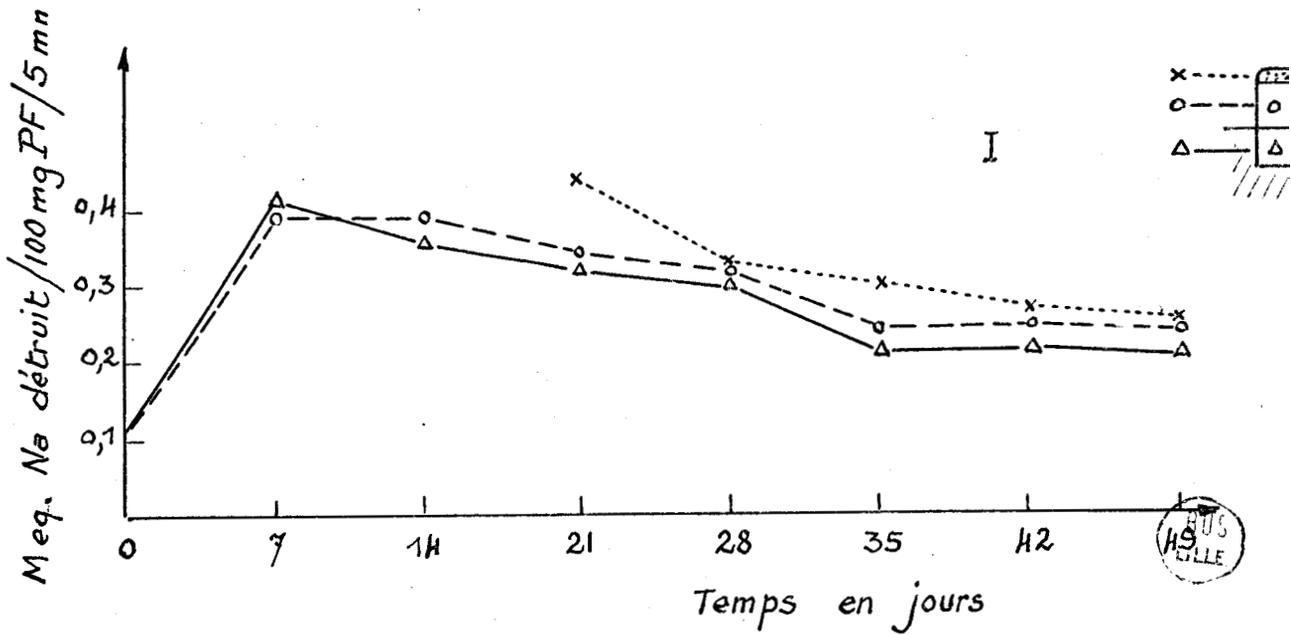
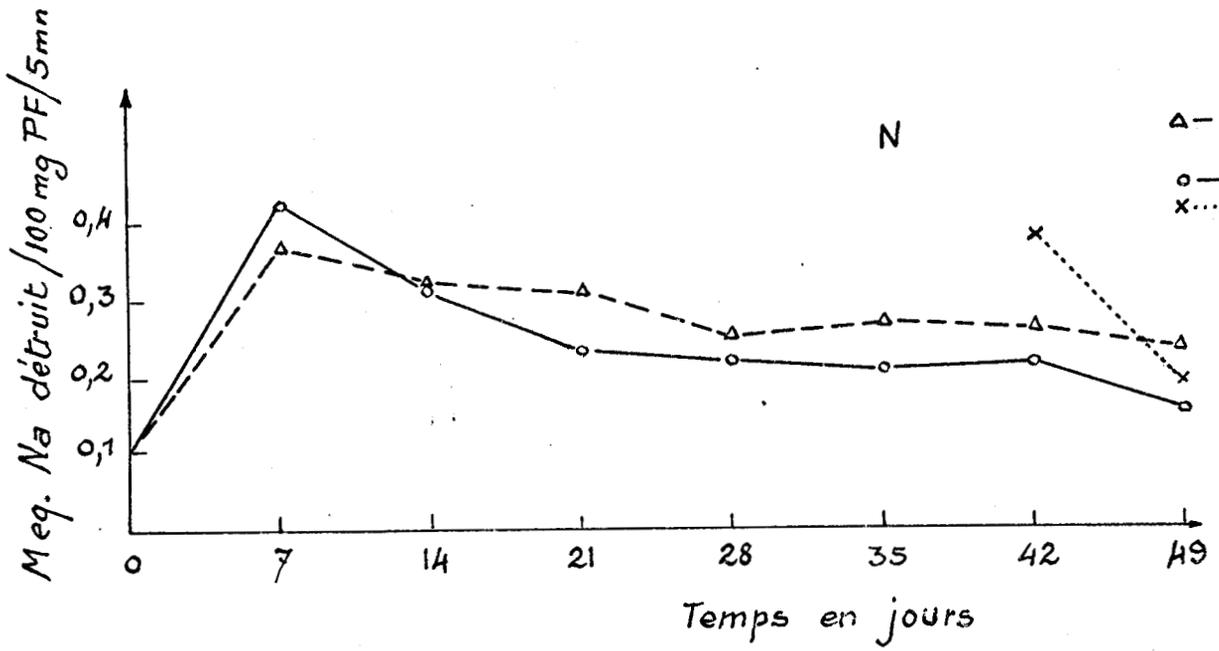


Fig. 12 : Evolution de l'activité catalasique de fragments de racine de Carotte, selon leur orientation par rapport au milieu de culture.

N = Fragment ensemençé "sens normal"

I = Fragment ensemençé "sens inverse".

dans la région en contact avec le milieu, puis dans les régions proximale et distale par rapport à ce dernier ainsi que dans les tissus néoformés pour les explantats placés en surface. Pour les explantats à demi enfoncés, nous avons considéré les mêmes régions que précédemment (§ 1). Quant aux fragments complètement enfoncés, leurs activités peroxydasique et catalasique ont été déterminées dans les cinq premiers millimètres aux deux extrémités. Dans ce cas, il y a une chute brutale des activités enzymatique liée sans doute aux conditions paraphysiologiques, car, après 35 jours de culture, il n'y a aucune prolifération.

	1/2 enfoncé		Hors du milieu		1/2 enfoncé		Hors du milieu		
	N	I	N	I	N	I	N	I	
C		0,300		0,384		2,55		1,52	C
R	0,214	0,237	0,350	0,345	9,00	2,72	1,55	1,62	R
F	0,279	0,218	0,465	0,386	3,35	8,50	3,37	1,57	F
RM			0,368	0,425			12,60	12,60	R

ACTIVITE CATALASIQUE

ACTIVITE PEROXYDASIQUE

TABLEAU III : ACTIVITES ENZYMATIQUES DES DIFFERENTES REGIONS D'EXPLANTATS DE RACINE DE CAROTTE APRES 35 JOURS DE CULTURE "IN VITRO".

C = Cal - R = Région radiculaire - F = Région foliaire - RM = Région de l'explantat en contact avec le milieu de culture.

Les activités peroxydasique et catalasique (Tableau III) des différentes régions confirment que le contact avec le milieu augmente considérablement l'activité peroxydasique, augmentation d'autant plus nette

que la surface de contact est plus réduite. En effet, lorsque les fragments sont placés sur le milieu, la partie en contact avec celui-ci a une activité quadruple de celle de la région hors du milieu. L'activité catalasique est plus faible quand l'explantat est à demi enfoncé, que lorsqu'il repose à la surface du milieu.

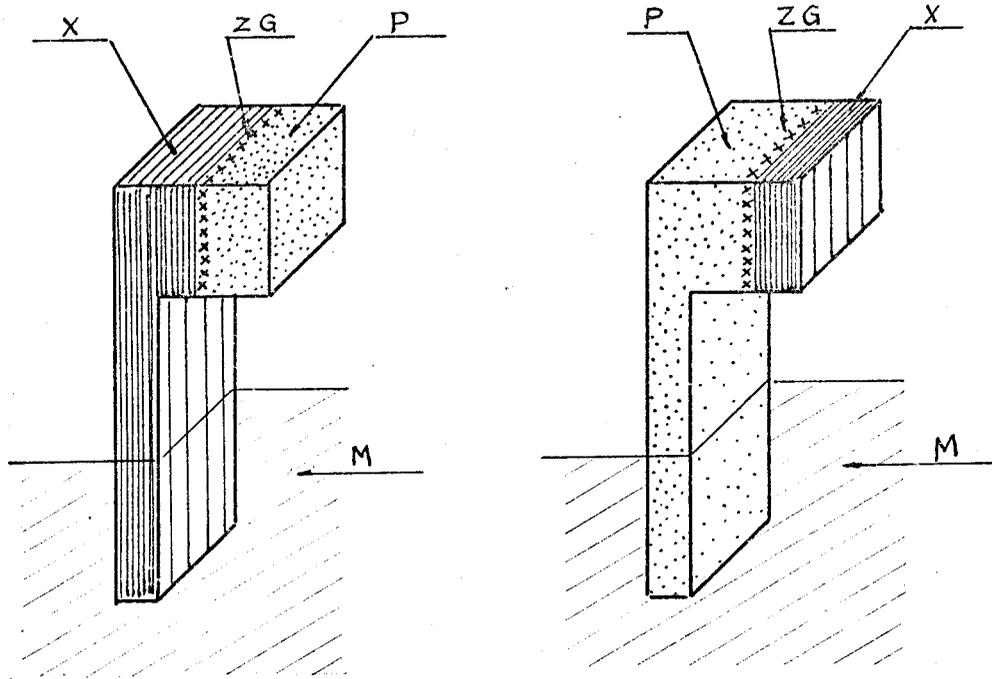
Il s'avère donc qu'on ne peut établir valablement la répartition des enzymes dans un explantat qu'en éliminant l'effet du milieu de culture. Nous avons donc imaginé un mode d'ensemencement particulier décrit Planche III. Il fallait néanmoins tenir compte de la nature du tissu jouant le rôle de support car l'activité peroxydasique initiale du phloème est supérieure à celle du xylème.

Par cette nouvelle méthode de mise en culture, nous avons obtenu un matériel qui proliférait dans de bonnes conditions et nous avons constaté que la polarité morphologique était respectée. La prolifération cellulaire est plus importante quand le xylème joue le rôle de support (Tableau IV), elle n'est pas influencée par l'orientation des fragments.

	SUPPORT PHLOEME	SUPPORT XYLEME
N	90,1	112,9
I	68,5	111,6

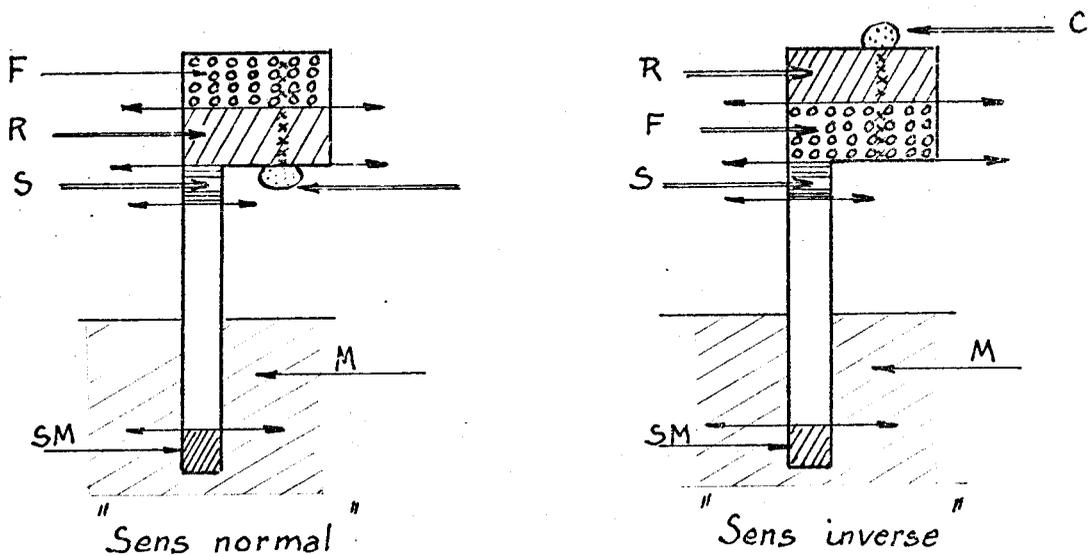
TABLEAU IV : POIDS FRAIS MOYEN (mg) DU CAL NEOFORME

Après 35 jours de culture, nous avons découpé les explantats (Planche III) et analysé les activités peroxydasique et catalasique de chaque région (Tableaux V & VI). Dans les tissus néoformés, l'activité peroxydasique est la même quel que soit le sens d'ensemencement. Pour les tissus préexistants, elle diminue dans la région radiculaire et augmente



A TECHNIQUE DE MISE EN CULTURE

M = milieu de culture P = phloème ZG = zone génératrice X = xylème



B DECOUPAGE DES EXPLANTATS POUR L'ANALYSE ENZYMATIQUE

C = cal R = région radulaire F = région foliaire
 S = support (xylème ou phloème) hors du milieu
 SM = support immergé M = milieu de culture

BUS
LILLE

dans la région foliaire, avec toutefois une exception pour les fragments placés en "sens inverse" et supportés par le xylème. Nous retrouvons pour les catalases une répartition identique à celle des peroxydases.

	SENS NORMAL		SENS INVERSE	
	Support phloème	Support xylème	Support phloème	Support xylème
C	2,41	2,25	2,30	2,15
R	1,80	1,08	1,49	1,40
F	3,66	2,25	1,60	1,40
S	2,87	1,40	2,51	1,40
SM	20,10	12,00	22,90	26,65

TABLEAU V : REPARTITION DE L'ACTIVITE PEROXYDASIQUE DANS LES FRAGMENTS DE RACINE DE CAROTTE, APRES 35 JOURS DE CULTURE "IN VITRO".

C = Cal - R = Région radiculaire - F = Région foliaire
 S = Support hors du milieu de culture -
 SM = Support dans le milieu de culture -

	SENS NORMAL		SENS INVERSE	
	Support phloème	Support xylème	Support phloème	Support xylème
C	0,468	0,560	0,473	0,496
R	0,311	0,388	0,364	0,330
F	0,344	0,429	0,410	0,420
S	0,311	0,388	0,484	0,351
SM	0,359	0,307	0,335	0,436

TABLEAU VI : REPARTITION DE L'ACTIVITE CATALASIQUE DANS LES FRAGMENTS DE RACINE DE CAROTTE, APRES 35 JOURS DE CULTURE "IN VITRO".

Nous avons également dosé les activités peroxydasique et catalasique dans les différents tissus utilisés comme support : dans les régions situées hors du milieu de culture, ces activités sont plus importantes dans le phloème que dans le xylème, ce qui confirme les résultats obtenus avant la mise en culture.

Le milieu de culture joue un rôle important dans la répartition des enzymes, si on supprime ses effets par une technique particulière de prélèvement des explantats, on remarque que les tissus néoformés ont des activités enzymatiques supérieures à celles des tissus préexistants. Pour un même lot de Carotte, les activités enzymatiques des cals sont identiques quelle que soit l'orientation des tissus, ce qui exclut que la pesanteur puisse intervenir dans la répartition des catalases et peroxydases. Les résultats obtenus lorsque les explantats sont posés sur le milieu ou lorsqu'ils sont prélevés selon notre méthode, permettent de penser que les enzymes circulent de façon polarisée dans le sens pointe-collet. En effet, lorsque les fragments sont ensemencés dans le "sens normal", l'activité peroxydasique est toujours plus importante à l'extrémité foliaire de l'explantat, mais s'ils sont ensemencés dans le "sens inverse", les valeurs obtenues le long du fragment sont identiques, ce qui laisse supposer que, dans ce cas, les peroxydases passeraient dans le milieu de culture. Ce passage est confirmé par une oxydation plus rapide du réactif ajouté aux milieux ayant contenu des fragments mis en culture dans cette position. D'autre part, les tissus supports sont de nature différente, le phloème a une activité enzymatique supérieure à celle du xylème avant la mise en culture. Pour les régions immergées, cette différence est retrouvée lorsque les fragments sont ensemencés dans le "sens normal", tandis que pour ceux placés dans l'autre sens, le décalage xylème-phloème n'existe plus, ce qui est très net pour l'activité peroxydasique et témoigne d'une accumulation d'enzymes à ce niveau.

1°) Premier passage -

Des fragments de racine de Carotte, ensemencés dans le "sens inverse" sont cultivés pendant 1 mois sur le milieu de Heller. Les tissus néoformés sont alors transplantés aseptiquement :

- . soit sur le même milieu
- . soit sur ce milieu additionné de $5 \cdot 10^{-8}$ g/ml d'A.I.A.

En l'absence d'auxine, bon nombre d'explantats se nécrosent, les autres ont une croissance faible, leur poids frais ne varie guère jusqu'au 49e jour de culture ; en présence d'A.I.A. au contraire, il augmente régulièrement. Le taux des protéines solubles dosées dans les extraits présente une valeur optimale entre le 14e et le 21e jour. Enfin, la différence de teneur en eau selon le milieu de culture est faible (1 %) (Fig. B).

L'activité peroxydasique croît considérablement entre le 1er et le 28e jour de culture, puisque les valeurs passent de 2,45 à 14,5 soit 6 fois plus importantes ; elle diminue ensuite légèrement.

Ces valeurs sont très différentes suivant la composition du milieu (Fig. 14 A).

Les variations d'activité catalasique sont moins importantes et se traduisent (Fig. 14 B) par une augmentation progressive jusqu'au 21e jour, puis, l'activité catalasique des tissus cultivés avec l'auxine diminue faiblement, tandis que celle des tissus cultivés sans auxine chute brutalement.

2°) Deuxième passage -

Après 45 jours, les tissus de Carotte cultivés en présence d'auxine sont repiqués sur un milieu identique. Les activités catalasique (0,495)

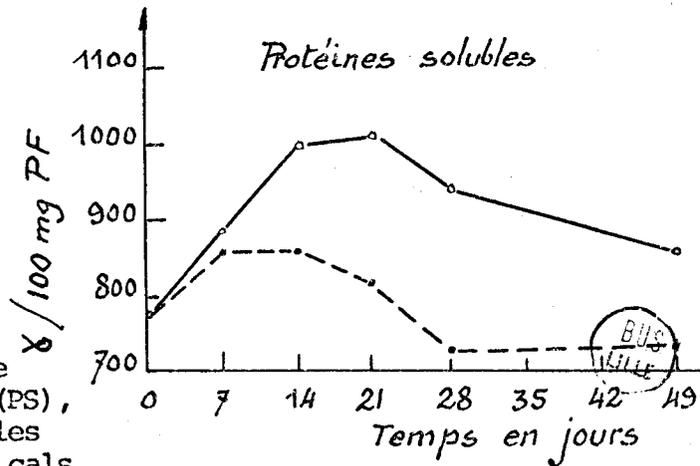
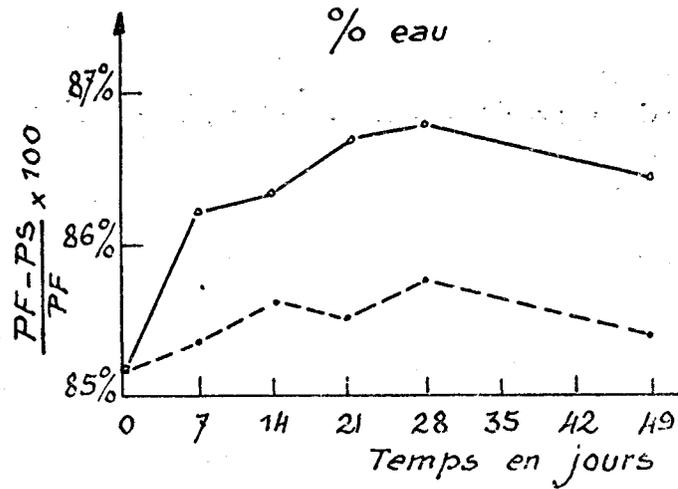
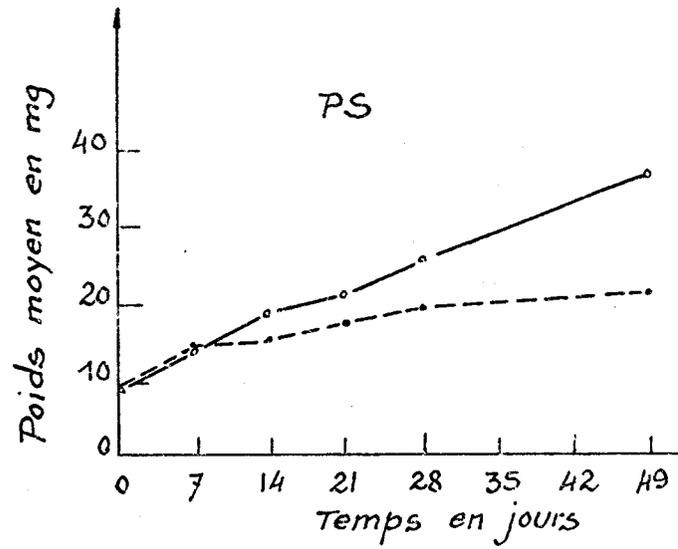
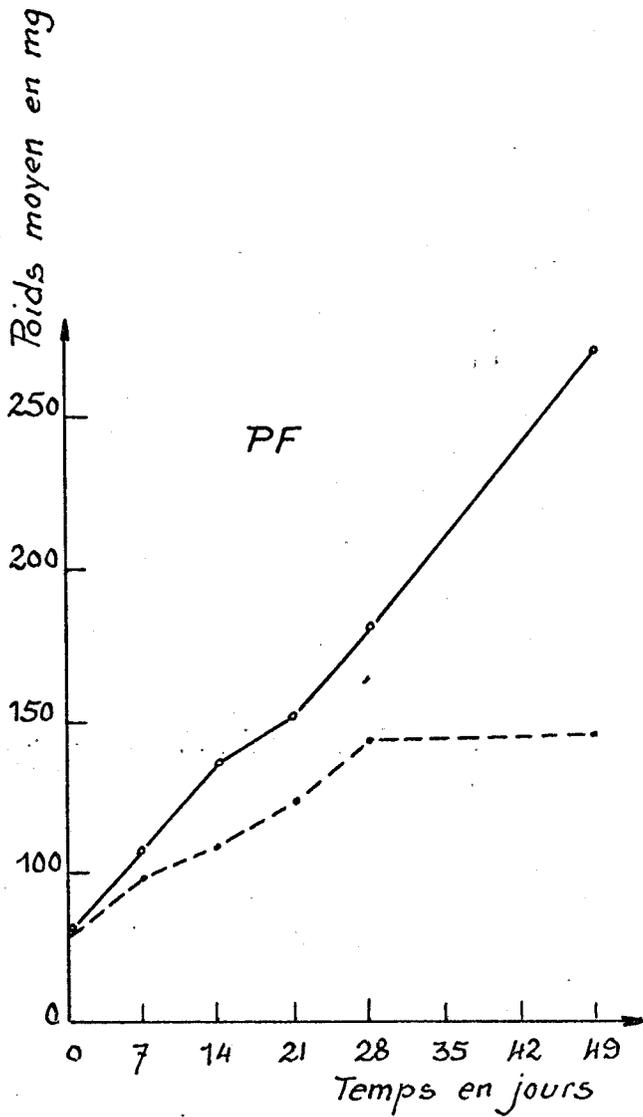


Fig. 13 : Variations du poids de substance fraîche (PF), de matière sèche (PS), de la teneur en protéines solubles des extraits et du % en eau des cals de Carotte cultivés avec (—) ou sans (---) auxine.

BUS
VILLE

PREMIER PASSAGE

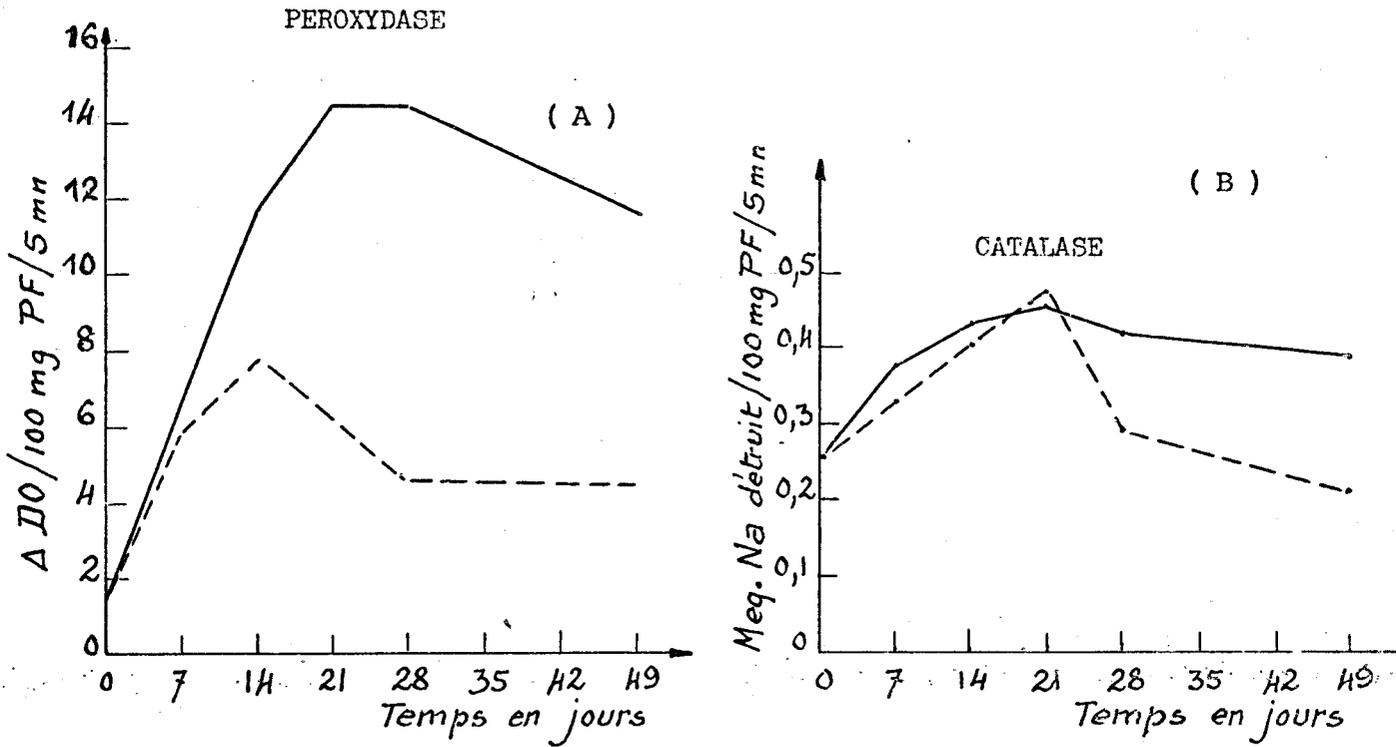


Fig. 14 : Evolution des activités enzymatiques de tissus de Carotte cultivés avec (—) ou sans (---) auxine.

TROISIEME PASSAGE

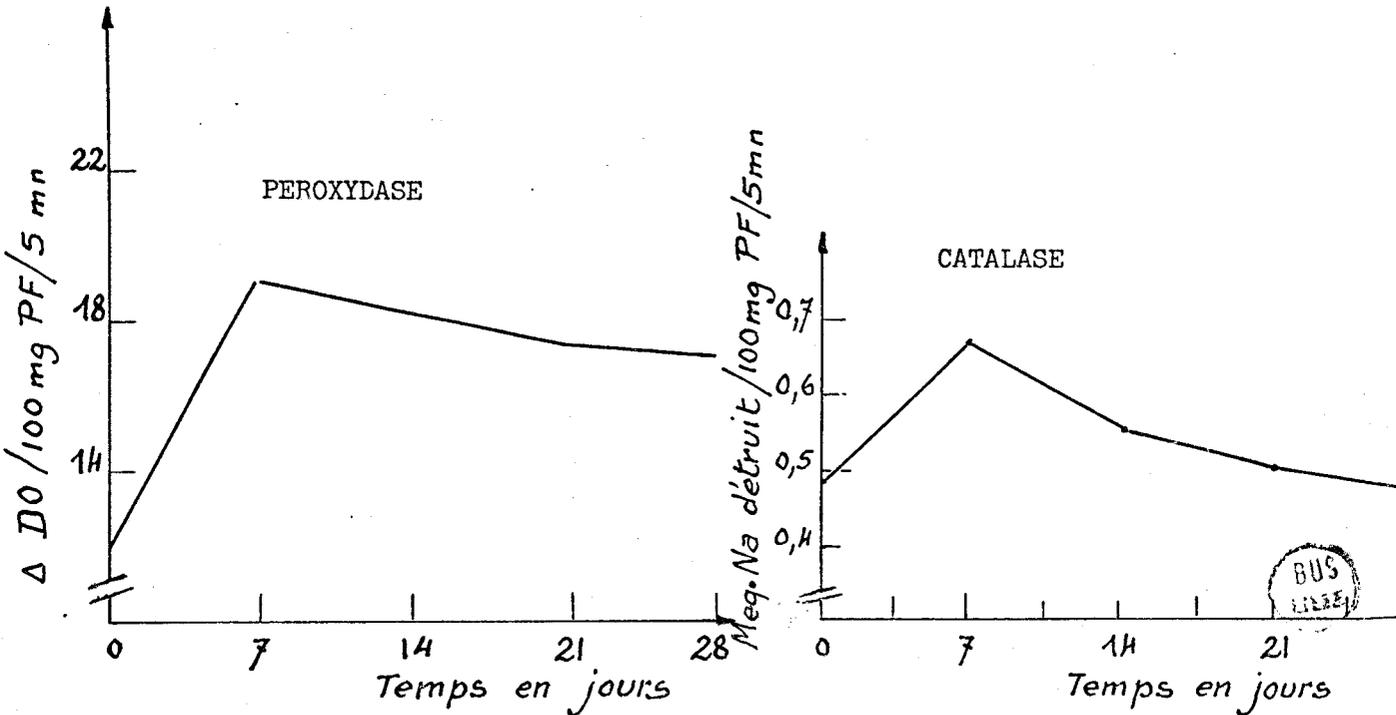


Fig. 15 : Evolution des activités enzymatiques de tissus de Carotte cultivés "in vitro".

et peroxydasique (12,10) dosées dans les colonies âgées de 35 jours restent élevées.

3°) Troisième passage -

Repiqués à nouveau sur le même milieu, nous avons constaté que la prolifération des tissus se faisait dans de bonnes conditions. L'activité catalasique présente un optimum après 7 jours de culture, puis retrouve sa valeur initiale, tandis que l'activité peroxydasique augmente encore au début de la culture et par la suite, se maintient à des valeurs élevées (Fig. 15).

4°) Colonies tissulaires ayant subi de nombreux repiquages (Souche isolée par Gautheret)

La vitesse de prolifération d'un tissu varie au cours de sa culture, faible au début (latence), elle s'accélère ensuite (croissance active), puis diminue (senescence).

Lors de nos essais sur la souche de Carotte, nous avons retrouvé ces différentes phases de croissance.

Les catalases et les peroxydases n'ont pas manifesté d'évolution particulière et leurs activités sont sensiblement les mêmes tout au long de la culture (Fig. 16).

L'auxine est nécessaire à la prolifération de la souche de Carotte. En sa présence, les activités enzymatiques sont plus importantes, mais, il n'est pas possible de savoir si cette différence d'activité est liée à l'hormone elle-même ou à la prolifération plus active des tissus.

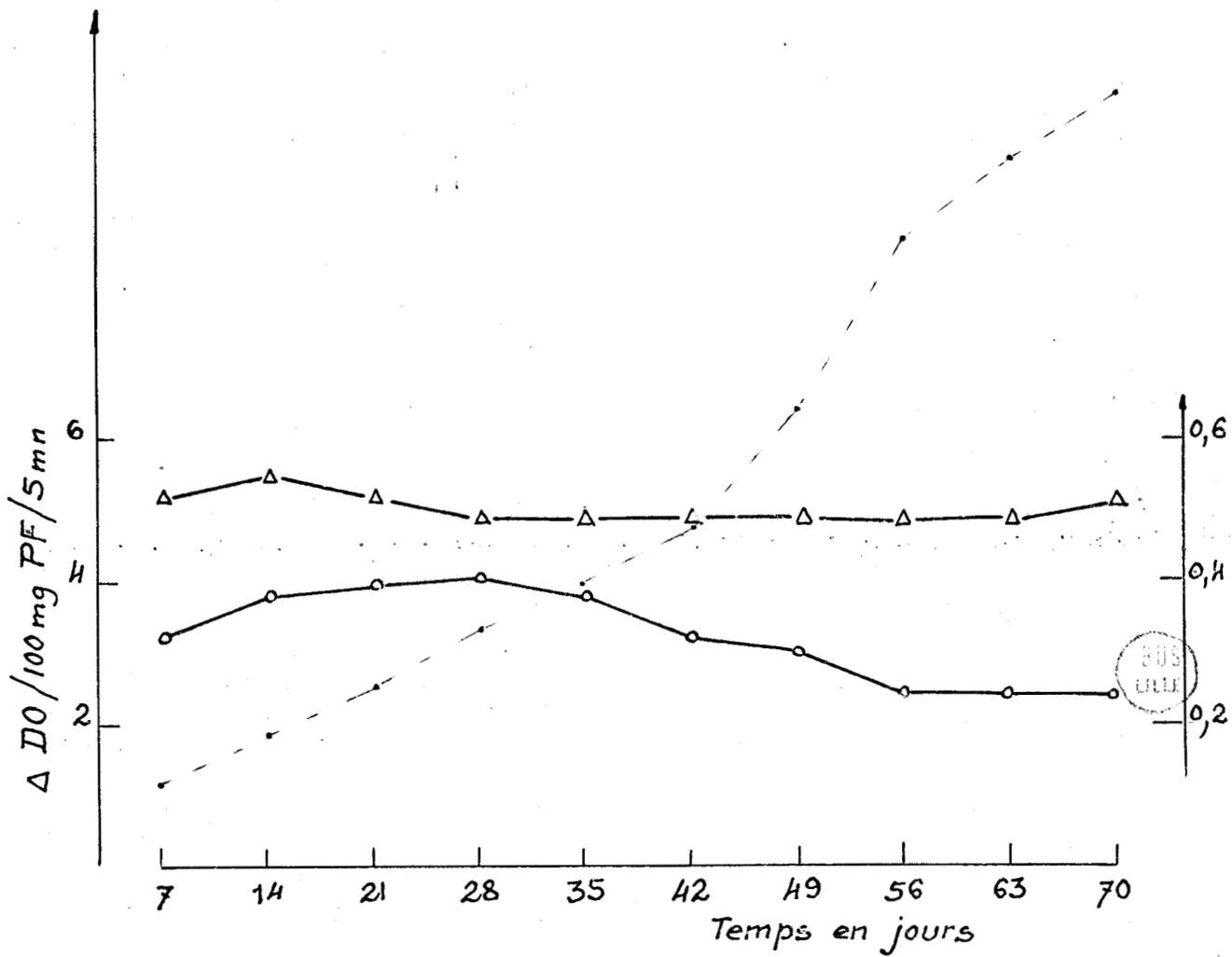


Fig. 16 : Variations des activités catalasique (Δ) et peroxydasique (\circ) des tissus de Carotte cultivés "in vitro" en rapport avec leur croissance (---).

BUS
1951

Le cal néoformé par les explantats a une activité peroxydasique faible qui augmente considérablement au contact du milieu dès les premiers passages. Après de très nombreuses transplantations l'activité peroxydasique diminue pour atteindre des valeurs voisines de celles trouvées initialement dans le cal, il paraît d'ailleurs difficile d'expliquer cette diminution.

Dès l'apparition du cal, l'activité catalasique est supérieure à celle des tissus préexistants. La première transplantation provoque une augmentation passagère de cette activité, mais les variations sont moins fortes que pour les peroxydases et dès la troisième transplantation, il n'y a plus d'évolution importante.

D/ INFLUENCE DE DIFFERENTS FACTEURS CHIMIQUES SUR LES TISSUS DE CAROTTE

Les tissus de la souche isolée par Gautheret ont été cultivés sur des milieux contenant de l'A.I.A., de l'A.N.A ou du 2,4 D à des concentrations variant de 10^{-9} à 10^{-4} g/ml. Après deux mois de culture, la croissance des colonies est évaluée en PF, PS, la teneur en eau est déterminée ainsi que les activités enzymatiques.

1°) Acide 3-indolyl-acétique (A.I.A.)

L'A.I.A. stimule fortement la prolifération des tissus de souche de Carotte (12.39) ; son effet optimum est obtenu pour des concentrations de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-6} g/ml (Tableau VII).

Les faibles doses provoquent une légère diminution de l'activité peroxydasique qui, par contre, augmente (Fig. 17) brutalement pour les concentrations supérieures à 10^{-5} .

Au contraire, l'activité catalasique est stimulée par des doses plus faibles (10^{-7}), alors que les fortes concentrations sont

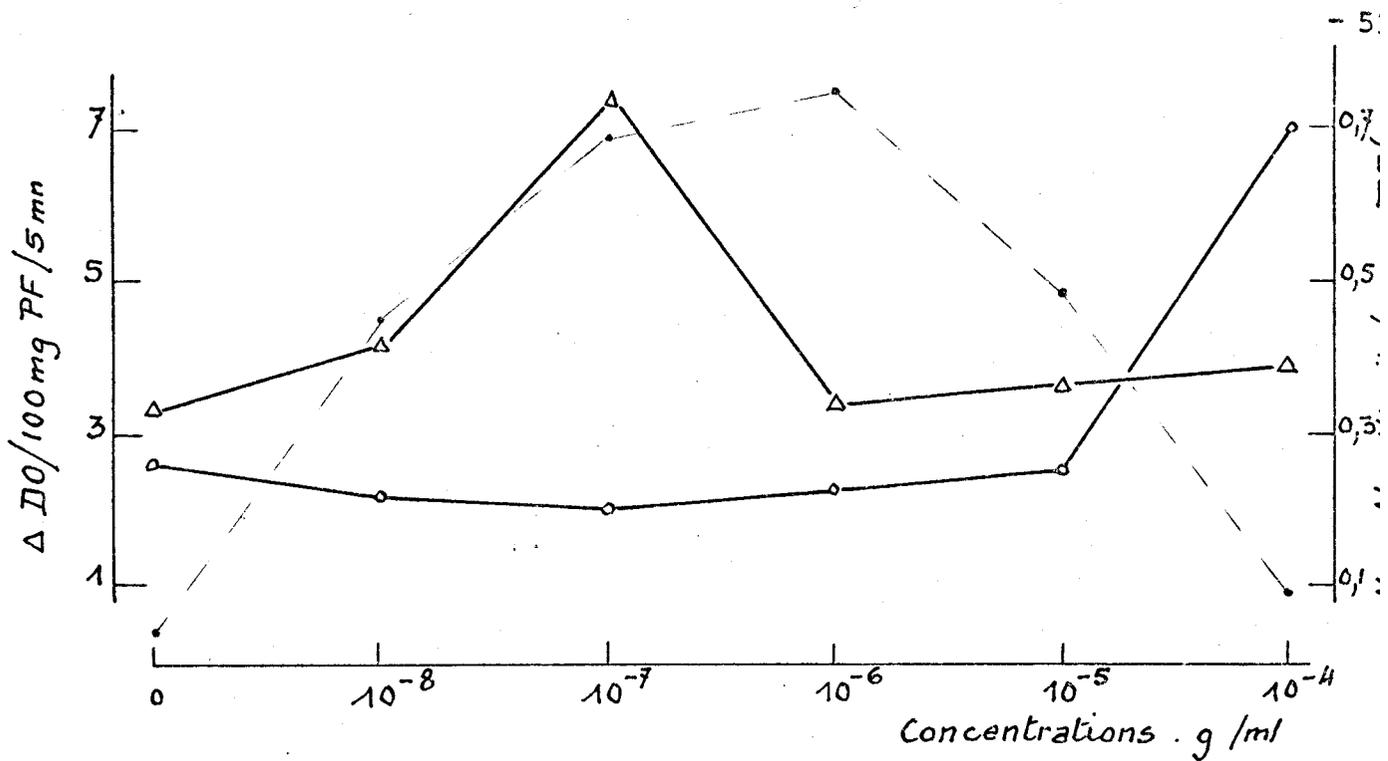


Fig. 17 : Variations des activités catalasique (Δ) et peroxydasique (θ) de tissus de Carotte, comparées à la croissance (----) obtenue en présence de différentes doses d'A.I.A.

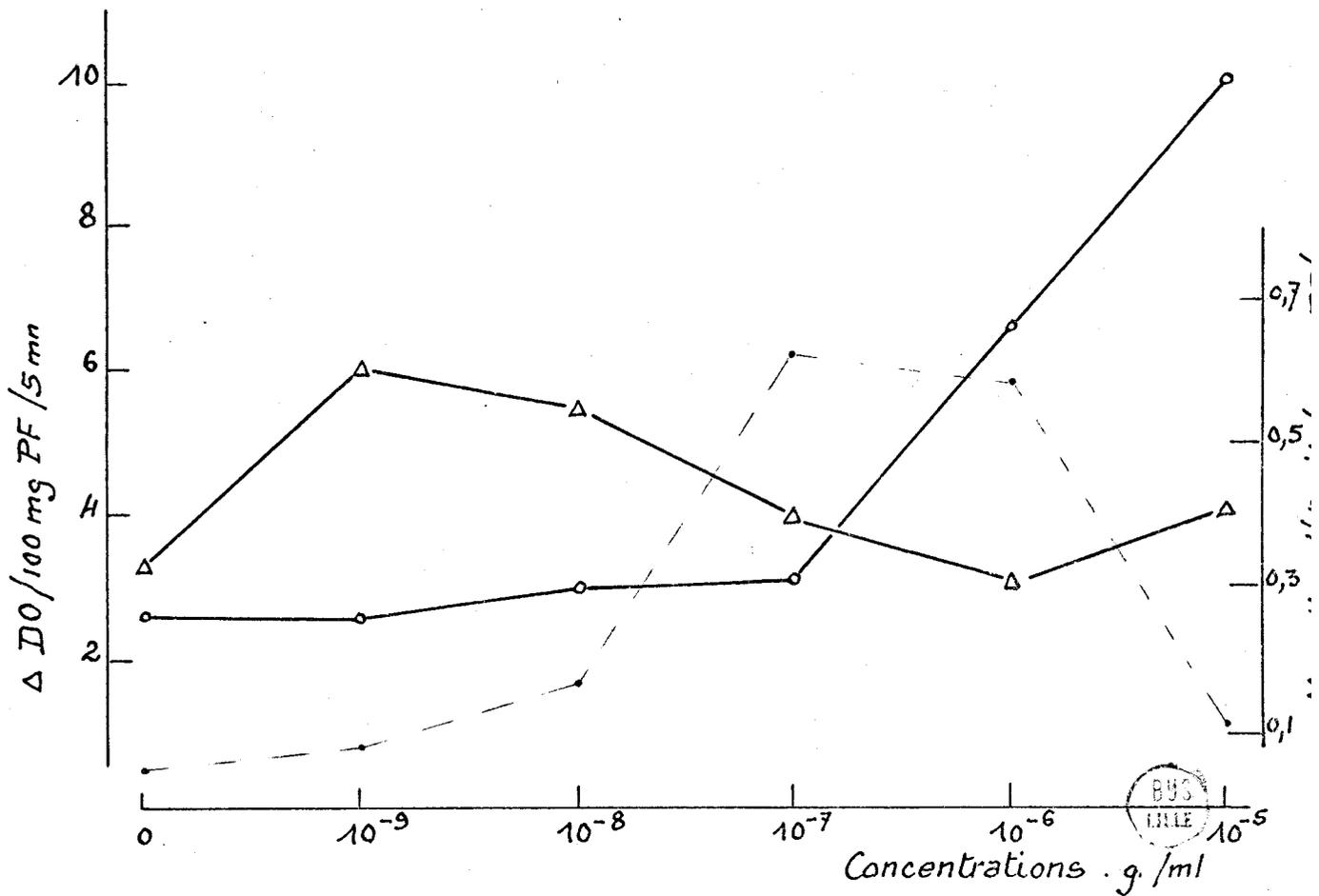


Fig. 18 : Variations des activités catalasique (Δ) et peroxydasique (θ) de tissus de Carotte, comparées à la croissance (---) obtenue en présence de différentes doses d'A.N.A.

pratiquement sans action à son égard (Fig. 17).

	PF moyen (mg)	PS moyen (mg)	% eau
0	786,0	54,53	93,06
10 ⁻⁸	1 606,2	98,70	93,85
10 ⁻⁷	2 090,7	128,94	93,83
10 ⁻⁶	2 206,2	132,38	93,99
10 ⁻⁵	1 678,3	107,53	93,59
10 ⁻⁴	898,65	66,14	92,64

TABLEAU VII : VARIATIONS DES PF ET PS MOYENS ET DU POURCENTAGE EN EAU DES TISSUS DE SOUCHE DE CAROTTE CULTIVES EN PRESENCE DE DIFFERENTES DOSES D'A.I.A.

2°) Acide naphtyl-acétique (A.N.A.)

L'A.N.A. a sur la prolifération des tissus de souche de Carotte une action comparable à celle de l'A.I.A. (Tableau VIII)

	PF moyen (mg)	PS moyen (mg)	% eau
0	709,7	49,28	93,05
10 ⁻⁹	746,4	53,30	92,87
10 ⁻⁸	940,5	64,70	93,12
10 ⁻⁷	1 886,9	113,46	93,98
10 ⁻⁶	1 705,1	110,03	93,54
10 ⁻⁵	833,5	66,95	91,96

TABLEAU VIII : VARIATIONS DES PF ET PS MOYENS ET DU POURCENTAGE EN EAU DES TISSUS DE SOUCHE DE CAROTTE CULTIVES EN PRESENCE DE DIFFERENTES DOSES D'A.N.A.

Il augmente aussi à forte dose l'activité peroxydasique, cette augmentation se manifeste cependant pour des doses 100 fois plus faibles (dès 10^{-7} g/ml). L'activité catalasique est encore stimulée par des doses faibles (10^{-9}), bien que ces concentrations n'aient pas ou peu d'action sur la prolifération (Fig. 18).

3°) Acide 2,4-dichlorophenoxy-acétique (2,4-D)

Le 2,4-D est un puissant stimulant de la prolifération des tissus de Carotte (12). Néanmoins, son effet s'observe à doses faibles (10^{-8}) alors que les doses élevées sont toxiques. L'appauvrissement en eau des tissus est considérable pour les concentrations 10^{-6} et 10^{-5} (Tableau IX)

	PF moyen (mg)	PS moyen (mg)	% eau
0	809,0	57,62	92,87
10^{-9}	1 021,8	68,50	93,29
10^{-8}	1 937,8	109,38	94,35
10^{-7}	735,1	60,91	91,71
10^{-6}	320,4	36,71	88,54
10^{-5}	230,2	26,82	88,34

TABLEAU IX : VARIATIONS DES PF et PS MOYENS et DU POURCENTAGE EN EAU DES TISSUS DE LA SOUCHE DE CAROTTE CULTIVES EN PRESENCE DE DIFFERENTES DOSES DE 2,4-D.

Pour les concentrations supérieures à 10^{-8} , le 2,4-D augmente à la fois les activités peroxydasique et catalasique (Fig. 19), il se comporte donc différemment de l'A.I.A. et de l'A.N.A. en particulier à l'égard de la catalase.

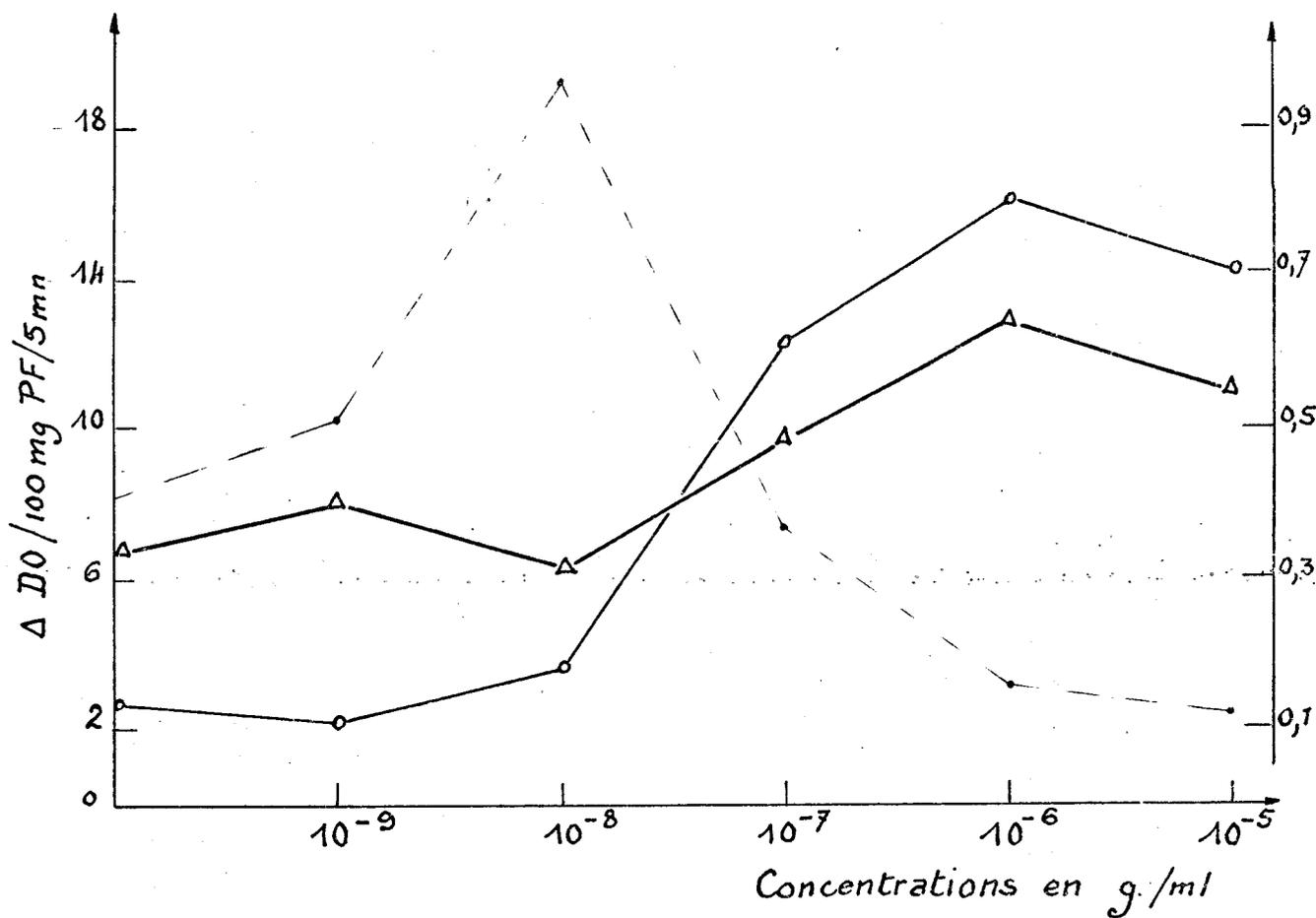


Fig. 19 : Variations des activités catalasique (Δ) et peroxydasique (●) de tissus de Carotte, comparées à la croissance (---) obtenue en présence de différentes doses de 2,4-D



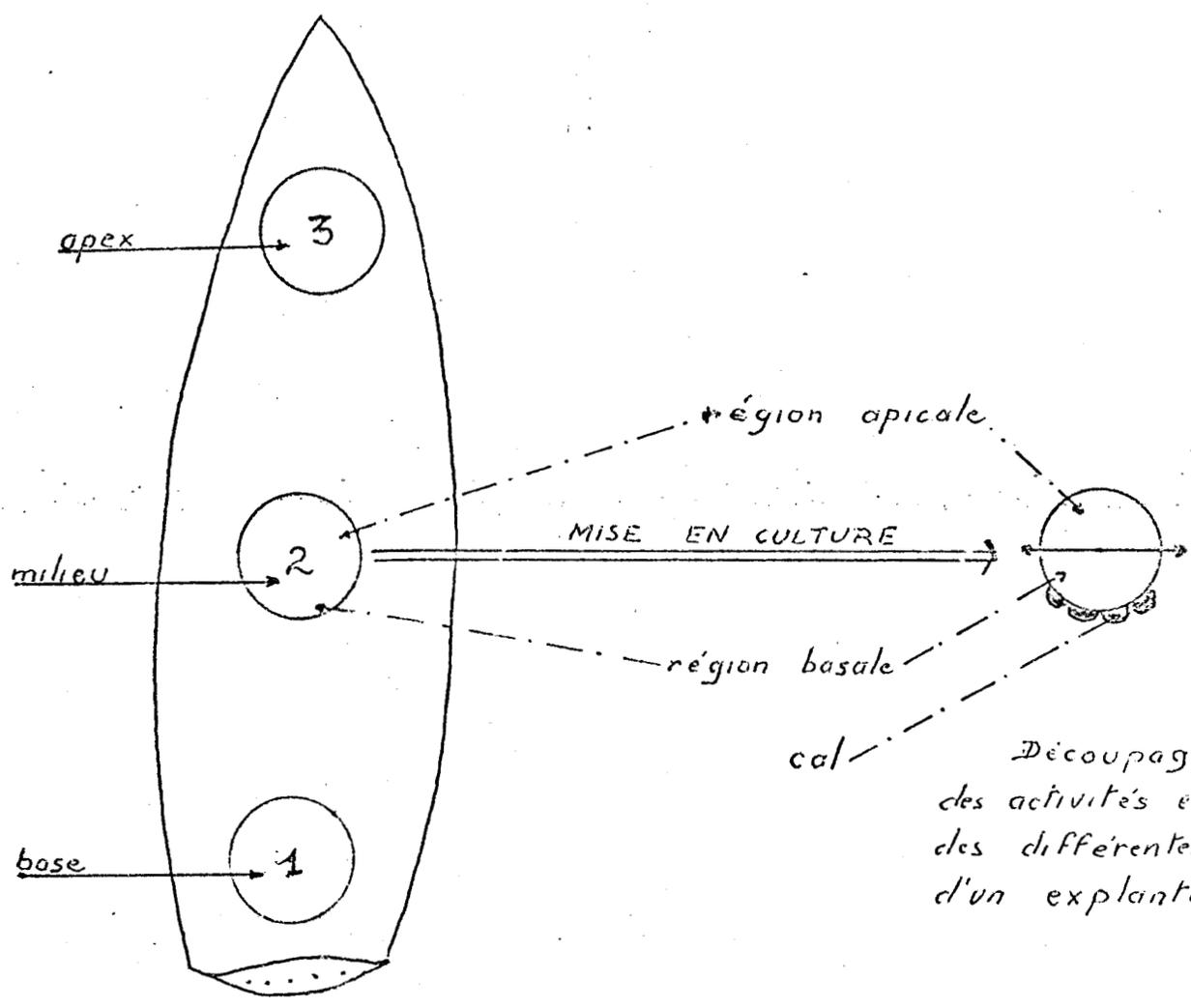
II T I S S U S D' E N D I V E

Nous avons tout d'abord recherché la répartition des peroxydases et des catalases dans le bourgeon d'Endive. Puis, nous avons suivi l'évolution des activités enzymatiques au cours de la culture "in vitro" de fragments de feuille. Enfin, après 25 jours de culture, nous avons séparé les calcs "néoformés" des tissus préexistants et comparé leurs activités catalasique et peroxydasique.

A/ REPARTITION DES PEROXYDASES ET DES CATALASES DANS LE BOURGEON

La répartition des enzymes a été étudiée dans des bourgeons obtenus selon la technique habituelle des endiviers de la région, et dans les rosettes de feuilles poussant sur des racines cultivées en serre à la lumière du jour. Nous nous sommes limité à la nervure centrale des feuilles, celle-ci est très large dans les bourgeons maintenus à l'abri de la lumière, mais, sur les feuilles chlorophylliennes elle s'amenuise de la base à l'apex où sa largeur est de 2 à 3 mm. Dans ce cas, nous avons prélevé la nervure centrale, non plus au trocard comme nous le faisons pour les feuilles achloriques, mais à l'aide d'un scalpel, en éliminant systématiquement le limbe. Nous avons distingué d'une part dans le bourgeon : les feuilles externes (E), moyennes (M), centrales (C) et d'autre part dans la feuille : la zone basale (1), moyenne (2), et apicale (3) (Planche IV)

Les techniques différentes de prélèvement ne nous ont pas permis d'étudier les répartitions des PF et PS, mais par contre, leur teneur en eau a été établie (Tableau X).



Découpage et analyse
des activités enzymatiques
des différentes régions
d'un explantat.

Prélèvement des disques et
analyse des activités enzymatiques
à différents niveaux de la feuille d'Endive



PRELEVEMENT	BOURGEON ACHLORIQUE	BOURGEON CHLOROPHYLLIEN
E	95,21	93,12
1	94,95	92,85
M 2	94,74	92,63
3	94,28	91,92
C	93,77	91,55

TABLEAU X : POURCENTAGE EN EAU DES FRAGMENTS DE FEUILLE SUIVANT LEUR LIEU DE PRELEVEMENT.

Celle-ci diminue de la base à l'apex des feuilles. De même, les feuilles centrales contiennent relativement moins d'eau que les feuilles externes. Enfin, la teneur en eau est supérieure dans les bourgeons achloriques que dans les bourgeons chlorophylliens.

La répartition longitudinale (1.2.3) ou transversale (E.M.C.) des catalases et des peroxydases (Tableaux XI et XII) se traduit par des activités croissantes de la base à l'apex des feuilles et des feuilles externes aux feuilles centrales. Les activités enzymatiques sont beaucoup plus fortes dans les feuilles vertes que dans les feuilles achloriques.

PRELEVEMENT	ACTIVITE PEROXYDASIQUE DO/1 g PF/5 mn	ACTIVITE CATALASIQUE Meq Na détruit/1g PF/5mn
E	3,02	0,64
1	2,80	0,60
M 2	3,40	0,64
3	4,60	0,57
C	4,02	0,67

(Bourgeon achlorique)

TABLEAU XI : ACTIVITES ENZYMATIQUES DES FRAGMENTS DE FEUILLE SUIVANT LEUR LIEU DE PRELEVEMENT.

PRELEVEMENT	ACTIVITE PEROXYDASIQUE DO/1 g PF/5 mn	ACTIVITE CATALASIQUE Meq Na détruit/1g PF/5mn
E	9,50	0,65
1	7,50	0,80
M 2	10,00	1,02
3	23,75	1,25
C	17,00	1,86

(Bourgeon chlorophyllien)

TABLEAU XII : ACTIVITES ENZYMATIQUES DES FRAGMENTS DE FEUILLE SUIVANT LEUR LIEU DE PRELEVEMENT.

B/ TISSUS DE FEUILLES D'ENDIVE CULTIVES "IN VITRO"

Les tissus de feuilles ont été cultivés sur le milieu de Knop dilué de moitié et placés à l'obscurité ou éclairés 12 Heures par jour.

1°) Croissance et développement

Le PF et le PS varient sensiblement d'un lot à un autre, nous avons donc préféré exprimer nos résultats en teneur en eau, qui reflète les variations relatives de ces deux critères.

Sur l'ensemble du fragment, la teneur en eau diminue à partir du 6e jour de culture, date à laquelle apparaît le cal (Tableau XIII)

TEMPS EN JOURS	0	1	2	3	5	9	12
LUMIERE	94,57	94,62	94,79	94,47	93,26	91,89	91,50
OBSCURITE	94,57	94,98	94,90	94,95	93,97	93,39	92,68

TABLEAU XIII : VARIATIONS DE LA TENEUR EN EAU AU COURS DE LA CULTURE "IN VITRO" DE FRAGMENTS DE FEUILLES D'ENDIVE.

Sur des fragments cultivés pendant 25 jours, nous avons considéré 3 régions (Planche IV) : le cal, la région basale et la région apicale. La teneur en eau de ces différentes parties (Tableau XIV) est différente. Le poids de substance sèche du cal est plus important que celui du reste du fragment, ce qui nous amène à penser que la diminution de l'hydricité du fragment entier au cours de la culture n'est due qu'au rapport : Poids de l'explantat/Poids du Cal.

	CAL	BASE	APEX
LUMIERE	86,46	91,63	92,35
OBSCURITE	87,86	92,81	93,24

TABLEAU XIV : TENEUR EN EAU DES DIFFERENTES REGIONS DU FRAGMENT APRES 25 JOURS DE CULTURE "IN VITRO".

La prolifération des tissus néoformés est plus faible à l'obscurité (Tableau XV)

	LUMIERE 12h/Jour	OBSCURITE
PF	144,41 mg	114,99 mg
PS	19,55 mg	14,06 mg

TABLEAU XV : PF et PS MOYENS DES CALS DE FRAGMENTS DE FEUILLE D'ENDIVE APRES 25 JOURS DE CULTURE A LA LUMIERE ET A L'OBSCURITE.

Les premiers bourgeons apparaissent après 12 jours de culture. La nature des organes formés est différente suivant les conditions d'éclairement (Tableau XVI). En effet, si nous trouvons beaucoup de bourgeons et peu de racines pour un éclairage journalier de 12 heures, au contraire, à l'obscurité, le nombre moyen de bourgeons est faible alors que la rhizogenèse est importante.

	LUMIERE	OBSCURITE
BOURGEONS	2,67	0,94
RACINES	0,15	1,32

TABLEAU XVI : NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS ET DE RACINE APRES 25 JOURS DE CULTURE "IN VITRO".

2^o) Evolution des activités peroxydasique et catalasique

L'activité peroxydasique (Fig. 20) est exaltée par la mise en culture et augmente pendant les 9 premiers jours. Elle atteint des valeurs 35 fois plus fortes que celles trouvées dans les feuilles avant leur ensemencement. Elle diminue ensuite, mais reste après 25 jours, 10 fois supérieure à celle trouvée dans le fragment initial.

Après une augmentation passagère due à la mise en culture, l'activité catalasique diminue brusquement entre le 3^e et le 6^e jour de culture, elle augmente à nouveau pour diminuer ensuite progressivement mais reste toujours plus faible que l'activité initiale (Fig. 21).

- Enfin, suivant les conditions d'éclairement, les activités enzymatiques évoluent différemment.

Au début de la culture, l'activité peroxydasique est plus faible dans les feuilles cultivées à l'obscurité ; ensuite, elle est plus forte que celle des feuilles cultivées à la lumière. Cette dernière, agit en sens inverse sur les activités catalasiques.

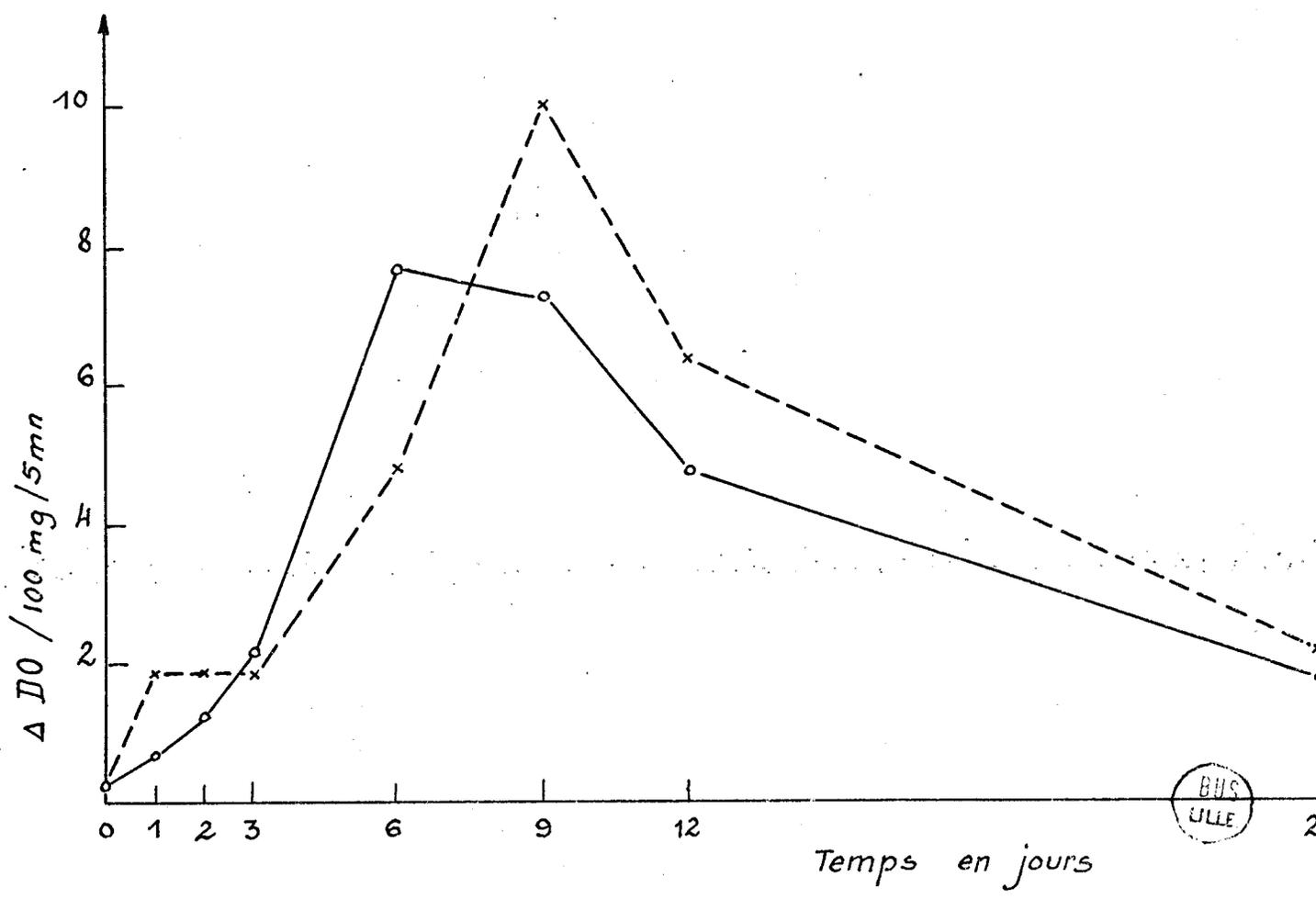


Fig. 20 : Activité peroxydasique de disque de feuille d'Endive cultivés "in vitro" à la lumière (—) et à l'obscurité (----).

Meq Na détruit /
100 mg / 5 mn .

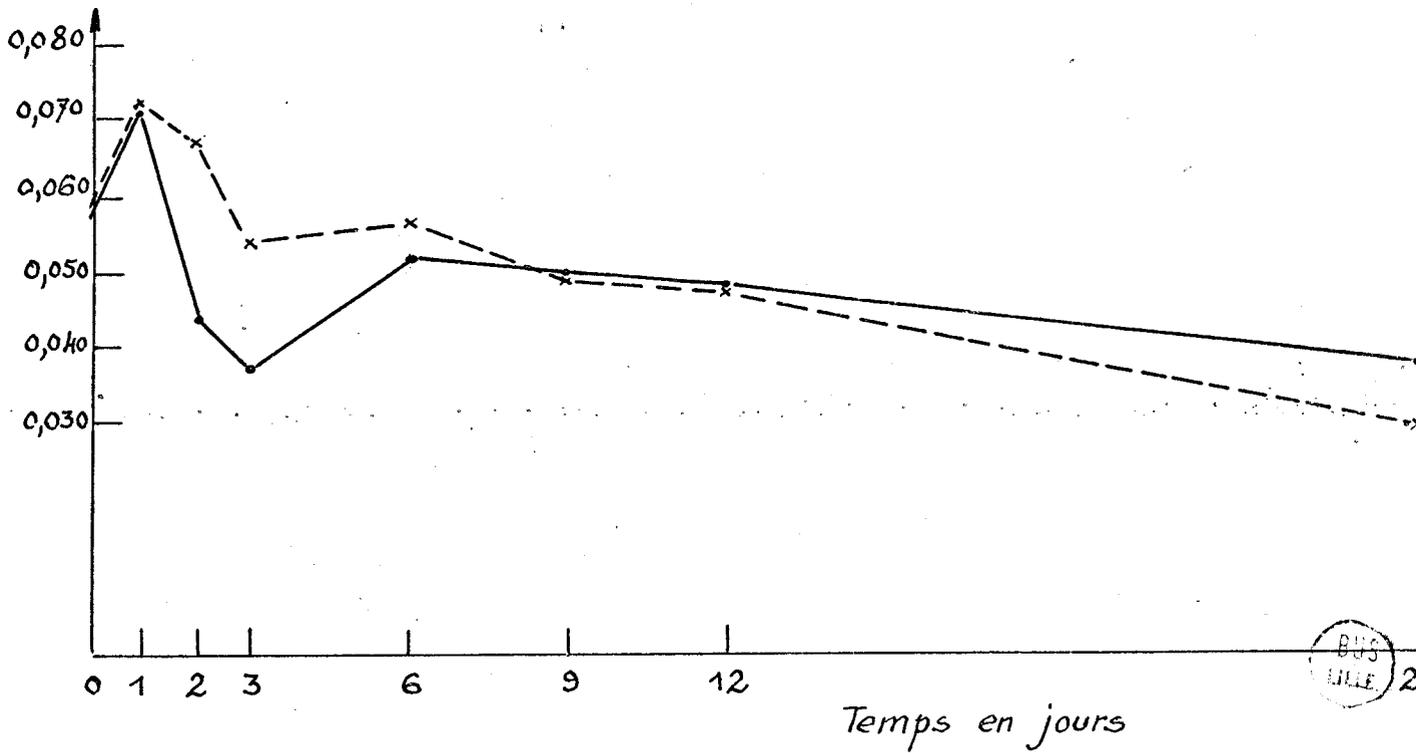


Fig. 21 : Activité catalasique de disques de feuille d'Endive cultivés "in vitro" à la lumière (—) et à l'obscurité (- - -).

3^d) Répartition des activités catalasique et peroxydasique dans des fragments de feuille après 25 jours de culture "in vitro"

Que les fragments soient cultivés à la lumière ou à l'obscurité, les activités des catalases et des peroxydases des différentes régions des explantats (Planche IV) ont une répartition identique (Tableau XVII) ; très élevées dans les cals, elles diminuent progressivement de la base à l'apex du fragment. Cependant, dans les cals se développant à la lumière, l'activité peroxydasique est inférieure et l'activité catalasique est supérieure à celle des tissus néoformés à l'obscurité.

	LUMIERE 12 h/jour		OBSCURITE	
	Activ. perox.	Activ. cat.	Activ. perox.	Activ. cat.
CAL	3,76	0,128	4,80	0,102
BASE	1,56	0,044	1,40	0,077
APEX	1,44	0,034	1,36	0,044

TABLEAU XVII : ACTIVITES CATALASIQUE ET PEROXYDASIQUE D'EXPLANTATS DE FEUILLES D'ENDIVE CULTIVES 25 JOURS EN PRESENCE OU NON DE LUMIERE.

Dans le bourgeon d'Endive, la répartition des peroxydases et des catalases suit un gradient qui va en augmentant des feuilles externes aux feuilles internes. Dans chaque feuille, il y a de plus un gradient longitudinal. Nous avons constaté par ailleurs (Vasseur & Legrand), que la répartition des protéines et des acides nucléiques (A.R.N. et A.D.N) est identique à celle des enzymes, il paraît logique de penser que la richesse en protéines est liée à celle des enzymes. Ceci nous a amené à ne cultiver que des explantats prélevés dans des régions comparables (parties médiane des feuilles moyennes). Au cours de la culture "in vitro",

les peroxydases et les catalases évoluent différemment. Les activités peroxydasique sont exaltées par la mise en culture et restent toujours supérieures à l'activité initiale, tandis que les activités catalasiques, sauf pendant les premiers jours de culture, sont plus faibles que celles trouvées dans les feuilles avant leur mise en culture.

Les tissus néoformés ont des activités enzymatiques supérieures à celles des tissus préexistants.

CONSIDERATIONS GÉNÉRALES

Dans la racine de Carotte, le phloème a des activités enzymatiques plus importantes que le xylème, ce qui confirme les résultats de Van Fleet (1959). Cet auteur a en effet montré que l'arrêt de la division cellulaire provoque un déclin de l'activité peroxydasique dans tous les tissus, excepté dans le phloème.

Les enzymes sont réparties selon un gradient axial dans la racine, l'activité la plus faible se trouvant vers la pointe donc, dans des tissus relativement jeunes par rapport à ceux situés près du collet. Gaspar et Khaufflaire (1957) ont trouvé une répartition identique dans la racine de Lens où ils ont souligné le parallélisme de la distribution des catalases des peroxydases et des auxines-oxydases.

Chez le Tabac (93), l'activité peroxydasique la plus forte se trouve dans les feuilles matures. Chez le Fraisier (100), ce résultat a également été retrouvé ; de plus, les feuilles jeunes possèdent plus de catalase que les feuilles âgées. Si dans le bourgeon d'Endive nous retrouvons la même répartition pour les catalases, nos résultats pour les peroxydases sont très différents. S'agit-il alors dans le cas de l'Endive, d'une répartition particulière en relation avec le développement des feuilles ?

La répartition des catalases et des peroxydases ayant été étudiée dans les racines et dans les feuilles et le parallélisme de leur répartition démontré, nous avons été frappé de voir que, malgré l'évolution différente des enzymes au cours de la culture "in vitro", ce parallélisme subsistait dans un explantat à n'importe quel moment du prélèvement. Il semble que cette répartition soit définie de façon rigoureuse dans les plantes et qu'elle est en relation avec d'autres gradients intéressants divers composés.

Sauf dans le cas de la souche chlorophyllienne de Carotte, très anciennement installée, la mise en culture des tissus provoque une augmentation des activités enzymatiques qui se poursuit plus ou moins longtemps suivant l'enzyme considérée. L'optimum d'activité catalasique précède toujours celui de l'activité peroxydasique (Fig. 21 et 22), sans qu'il y ait semble-t'il de relation directe avec la néoformation de tissus ou d'organes. On peut penser que cette augmentation provient du traumatisme qui se produit toujours lors de la mise en culture, l'effet des blessures sur la stimulation des activités peroxydasiques a d'ailleurs été démontré par Bastin (1968). Sur les explantats, les activités enzymatiques des tissus néoformés sont plus importantes, elles évoluent indépendamment de celles des tissus préexistants.

Au cours de la prolifération des tissus de souche de Carotte, les activités enzymatiques varient peu. Ce matériel est donc favorable pour étudier l'action de différents facteurs de croissance sur les systèmes enzymatiques. Une telle étude paraissait d'autant plus intéressante que les hypothèses formulées jusqu'alors paraissaient divergentes. Selon Galston (1951), il y aurait une relation inverse entre la croissance et l'activité catalasique. Par contre, pour Lance (1963), toute prolifération active s'accompagnerait d'une augmentation des activités enzymatiques. Au cours de nos essais, nous avons constaté qu'en présence d'A.I.A., les concentrations les plus favorables à la prolifération (10^{-7} , 10^{-6}) sont celles qui correspondent aux activités catalasiques les plus fortes. Mais ceci n'est plus vrai en présence d'A.N.A. Enfin, avec le 2 4-D, l'activité catalasique la plus faible correspond à la prolifération maximale.

Certes, Galston et Lance ont utilisé d'une part, d'autres tissus et d'autre part, des critères différents, les comparaisons sont

donc peut-être hasardeuses. Nous devons cependant souligner que, pour un même tissu, deux substances phytohormonales différentes comme l'A.I.A. et le 2,4-D, ont une action différente. Il est donc bien délicat de vouloir établir une loi absolue reliant l'activité enzymatique à la prolifération cellulaire, lorsqu'on la modifie par un facteur externe sans savoir si la substance intervient sur le système enzymatique lui-même, d'une façon directe ou indirecte.

Néanmoins, pour un explantat déterminé où le cal néoformé prolifère activement, il y a une relation directe entre prolifération et activité enzymatique.

B I B L I O G R A P H I E

1. AKAZAWA (T.) and CONN (E. E.) - 1958 -
The oxidation of reduced pyridine nucléotides by peroxidase.
Jour. Biol. Chem., 232 , 403 - 415 .
2. ALTSCHUL (A. M.), KARON (M. L.) and KYAME (L.) - 1948 -
Catalase and peroxidase in germinating Cottonseed.
Arch. of Biochem., 18 , 161 - 170 .
3. ALVAREZ (M. R.) - 1968 -
Temporal and spatial changes in peroxidase activity during
fruit development in *Encyclia tampensis* (Orchidaceae) .
Amer. Jour. Bot., 55 , 619 - 625 .
4. APPLEMAN (D.) - 1952 -
Catalase - chlorophyll relationship in Barley seedlings.
Plant Physiol., 27 , 613 - 621 .
5. APPLEMAN (D.) and PYFROM (H. T.) - 1955 -
Changes in catalase activity and other responses induced
in plants by red and blue light.
Plant Physiol., 30 , 543 - 549 .
6. AVELLA (Th.), DINANT (M.) et GASPAR (Th.) - 1966 -
Action des acides o, m, et p -hydroxybenzoïque sur
la destruction de l'acide b - indolylacétique par la
catalase du foie de Boeuf.
Bull. Soc. Roy. Sc. Liège, 3 - 4 , 307 - 314 .
7. AXELROD (B.) and JAGENDORF (A. T.) - 1951 -
The fate of phosphatase, invertase and peroxidase in
autolyzing leaves.
Plant Physiol., 26 , 406 - 410 .
8. BASTIN (M.) - 1968 -
Effect of wounding on the synthesis of phénols, phenol-
oxidase and peroxidase in the tuber tissue of Jerusalem
artichoke.
Canad. Jour. Biochem., 46 , 1339 - 1343 .
9. BASTIN (M.), GASPAR (Th.) et LEYH (C.) - 1965 -
Sur le site actif de la peroxydase impliquée dans l'oxydation
de l'acide β - indolylacétique.
C. R. Acad. Sc., 260 , 4050 - 4052 .

10. BJORN (L. O.) - 1967 -
 Some effects of light on excised Wheat roots with special reference to peroxide metabolism.
Physiol. Plant., 20 , 149 - 170 .

11. BOUILLENNE - WALRAND (M.), GASPAR (Th.), LEYH (C.) et CLEJDO (O.) - 1969 -
 Action comparée et combinée de l'acide 2 - chloro - 9 - fluoréno - carbonique (morphactine) et de l'acide gibberellique sur la croissance et l'activité peroxydasique du Maïs.
C. R. Acad. Sc., 269 , 831 - 833 .

12. BOURIQUET (R.) - 1960 -
 Recherches sur l'activité de quelques facteurs de croissance à l'égard des tissus végétaux cultivés "in vitro".
Rev. Cytol. et Biol. vég., 1 , 93 - 326.

13. BURRIS (R. M.) - 1960 -
 Hydroperoxidases (peroxidases and catalases).
 In : W. Ruhland Ed. *Encyclopedia of Plant Physiology* XII (1) Ed. Springer Verlag 365 - 400 .

14. DE JONG (D. W.) - 1967 -
 An investigation of the role of plant peroxidase in cell wall development by the histochemical method.
Jour. Histochem. Cytochem., 15 , 335 - 346 .

15. DE JONG (D. W.), OLSON (A. C.), HAWKER (K. M.) and JANSSES (E. F.) - 1968 -
 Effect of cultivation temperature on peroxidase isozymes of plant cells grown in suspension.
Plant Physiol., 43 , 841 - 844 .

16. DEKOCK (P. C.), COMMISSIONG (K.), FARMER (V. C.) and INKSON (R. H.) - 1960 -
 Interrelationships of catalase, peroxidase, hematin and chlorophyll.
Plant Physiol., 35 , 599 - 604 .

17. DUFFUS (J. H.) - 1966 -
 Peroxidase in Barley endosperm.
Jour. Inst. Brew., 75 , 569 - 573 .

18. DUQUENOIS (P.), GAZET du CHATELIER (G.) et GUTH (Th.) - 1953 -
 Les peroxydases végétales I. Sur la constance des manifestations peroxydasiques chez les végétaux.
Bull. Soc. Chim. Biol., 10 , 1217 - 1224 .

19. ENDO (T.) - 1968 -
 Indoleacetate oxidase activity of horseradish and other plant peroxidase isozymes.
Plant and Cell Physiol., 9 , 333 - 341 .

20. EULER (H.) und JOSEPHSON (K.) - 1927 -
 Ueber Katalase.
Liebig's Ann. der Chem., 452 , 158 - 181 .

21. EVANS (J. J.) and ALLDRIDGE (M. R.) - 1964 -
The distribution of peroxidases in extreme dwarf and normal tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.).
Phytochemistry, 4, 499 - 503 .
22. FEINSTEIN (R. N.) - 1949 -
Perborate as substrate in new assay of catalase.
Jour. Biol. Chem., 180, 1197 - 1202 .
23. FOX (L. K.), PURVES (W. K.) and NAKADA (H. I.) - 1965 -
The role of horseradish peroxidase in indole - 3 - acetic acid oxydation.
Biochem., 4, 2754 - 2763.
24. FOX (L. K.), PURVES (W. K.) and NAKADA (H. I.) -1965 -
The role of horseradish peroxidase in indole - 3 - acetic acid oxydation.
Biochem., 4, 2754 - 2763 .
25. FREDERICK (S. E.) and NEWCOMB (E.H.) - 1969 -
Cytochemical localisation of catalase in leaf microbodies (peroxisomes).
Jour. of Cell Biol., 43, 343 - 353 .
26. FRENYO (V.) and MIHALYFI (J.) - 1964 -
Alterations of catalase activity in *Pinus* leaves.
Ann. Univ. Sc. Budapest, 7, 87 - 93 .
27. FREUDENBERG (K.) - 1959 -
Biosynthesis and constitution of lignin.
Nature, 183, 11 - 52 .
28. GALSTON (A. W.) - 1951 -
Sur la relation entre la croissance des cultures de tissus végétaux et leur teneur en catalase.
C. R. Acad. Sc., 232, 1505 - 1507 .
29. GALSTON (A. W.); BONNER (J.) and BAKER (S. S.) - 1953 -
Flavoprotein and peroxidase as components of the indole-acetic acid oxidase system of Peas.
Arch. Biochem. Biophys., 42, 456 - 470 .
30. GALSTON (A. W.), LAVEE (S.) and SIEGEL (B. Z.) - 1968 -
The induction and repression of peroxidase isozymes by 3 - indoleacetic acid.
in: *Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances*,
Ed. Wightman and Setterfield, Runge Press, 455 - 472.
31. GASPAR (Th.) - 1965 -
Catabolisme auxinique et effecteurs auxines-oxydasiques.
Etude comparée chez *Lens culinaris* et *Salvia splendens*.
Bull. Soc. Roy. Sc. Liege, 7 - 8, 391 - 537 .

32. GASPAR (Th.) and DINANT (M.) - 1967 -
Phenoxidase, catalase and peroxidase in plant extracts in relation to the auxin catabolism.
Wissensch. Z. Univ. Rostock Math. Naturwiss. Reihe 16 ; 441 - 4
33. GASPAR (Th.) and LACOPPE (J.) - 1968 -
The effect of C.C.C. and Amo - 1618 on growth, catalase, peroxidase and indoleacetic acid oxidases activity of young Barley seedlings.
Physiol. Plant., 21 , 1104 - 1109.
34. GASPAR (Th.), VERBEEK (R.) et VAN CNCKELEN (H.) - 1969 -
Variations de quelques activités enzymatiques (peroxydase, catalase, A.I.A.- oxydase) et de la teneur en polyphénols au cours de la germination de l'Orge. Influence de la kinétine.
Physiol. Plant., 22 , 1200 - 1206 .
35. GASPAR (Th.) and XHAUFFLAIRE (A.) - 1967 -
Exocellular enzymes in Lens root and auxin catabolism.
Arch. Intern. Physiol. Biochim., 75 , 189 - 196 .
36. GASPAR (Th.) and XHAUFFLAIRE (A.) - 1967 -
Effect of kinetin on growth, auxin catabolism, peroxidase and catalase activities.
Planta, 72 , 252 - 257 .
37. GASPAR (Th.) et XHAUFFLAIRE (A.) - 1968 -
Action comparée de la 6 furfurylamino purine et de la 6 (y,y - dimethylallylamino) purine, sur la croissance, l'activité peroxydasiqne, la teneur en chlorophylle et en caroténoïdes.
Physiol. Plant., 21 , 792 - 799 .
38. GAUTHERET (R. J.) - 1939 -
Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercule de Carotte.
C. R. Acad. Sc., 208 , 118 - 120 .
39. GAUTHERET (R. J.) - 1940 -
Recherches expérimentales sur la polarité des tissus du tubercule de Carotte.
C. R. Acad. Sc., 211 , 15 - 18 .
40. GAUTHERET (R. J.) - 1959 -
La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisations.
Masson et Cie Editeurs Paris, 863 p.
41. GAYLER (K. R.) and GLASZIOU (K. T.) - 1969 -
Plant enzyme synthesis: Hormonal regulation of invertase and peroxidase synthesis in sugar Cane.
Planta, 84 , 185 - 194.

- 12
42. GERLOFF (E. D.), STAHMANN (M. A.) and SMITH (D.) - 1967 -
Soluble proteins in Alfafa root as related to cold
hardiness.
Plant Physiol., 42 , 895 - 899 .
 43. GLASZIOU (K. T.), GAYLER (K. R.) and WALDRON (J. C.) - 1967 -
Effects of auxin and gibberellic acid on the regulation of
enzyme synthesis in sugar - Cane stem tissue.
in: Biochemistry and Physiology of Plant Growth Substances,
Ed. Wightman and Setterfield, Runge Press, 433 - 442 .
 44. GOLDACRE (P. L.) - 1951 -
Hydrogen peroxide in the enzymic oxidation of heteroauxin.
Austral. Jour. Sc. Res., 4 , 293 - 302 .
 45. GOLDACRE (P. L.) and GALSTON (A. W.) - 1953 -
The specific inhibition of catalase by substituted phenols.
Arch. Biochem. Biophys., 43 , 169 - 175 .
 46. GRANICK (S.) - 1951 -
Biosynthesis of chlorophyll and related pigments.
Ann. Rev. Plant Physiol., 2 , 115 - 144 .
 47. GUTH (Th.) - 1953 -
Essai de localisation des manifestations peroxydasiques dans
les végétaux.
Thés. Doct. Univ. Pharm. Strasbourg, 72 p. .
 48. HALEVY (A. H.) - 1962 -
Inverse effect of gibberellin and Amo - 1618 on growth,
catalase and peroxidase activity in Cucumber seedlings.
Experientia , 18 , 74 - 76 .
 49. HALEVY (A. H.) - 1963 -
Interaction of growth-retarding compounds and gibberellin
on indoleacetic acid oxidase and peroxidase of Cucumber
seedlings.
Plant Physiol., 38 , 731 - 737 .
 50. HARMEY (M. A.) and MURRAY (A. N.) - 1968 -
The effect of gibberellic acid on peroxidase levels in Barley.
Planta , 83 , 387 - 389 .
 51. HELLER (R.) - 1953 -
Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux
cultivés "in vitro" .
Ann. Sc. nat. Bot., 14 , 1 - 223 .
 52. HINMAN (R. L.) and LANG (J.) - 1965 -
Peroxidase catalysed oxidation of indole - 3 - acetic acid.
Biochem. Jour., 4 , 144 - 158 .

53. HORI (T.) and NAKAMURA (H.) - 1953 -
 On the relation between the respiratory enzymes and the growth hormones in the seedlings of the legumineusae plants. I. Catalase and peroxidase activities in the *Vicia Faba* seedlings.
Bot. Mag. Jap. Tokio, 66 , 173 - 176 .
54. JAGENDORF (A.) and WILDMAN (S. G.) - 1954 -
 The proteins of green leaves. IV Centrifugal fractionation of Tobacco leaf homogenates and some properties of isolated chloroplastes.
Plant Physiol., 29 , 270 - 279 .
55. JENSEN (W.) - 1955 -
 The histochemical localization of peroxidase in roots and its induction by indoleacetic acid.
Plant Physiol., 30 , 426 - 432 .
56. KAMERBEEK (G. A.) - 1956 -
 Peroxidase content of dwarf types and giant types of plants.
Acta. Bot. Neerland., 5 , 257 - 263 .
57. KENTEN (R. H.) - 1955 -
 The oxidation of indolyl - 3 - acetic acid by waxpod bean sap and peroxidase systems.
Biochem. Jour., 59 , 110 - 121 .
58. KUHN (R.), HAND (D. B.) und FLORKIN (M.) - 1931 -
 Über die Nature der Peroxydase.
Hoppe-Seylers , 201 , 255 - 266 .
59. LACOPPE (J.) et GASPARD (Th.) - 1968 -
 A propos de la spécificité des réducteurs de croissance.
C. R. Acad. Sc., 266 , 2330 - 2331 .
60. LACOPPE (J.) et GASPARD (Th.) - 1968 -
 Action du C.C.C., de l' Amo - 1618 sur la germination, la croissance et les activités AIA - oxydasique, peroxydasique, catalasique "in vitro" et "in vivo" de la racine de Lentille.
Planta, 80 , 27 - 33 .
61. LANCE (C.) - 1963 -
 Recherches sur la croissance et le métabolisme respiratoire de tissus végétaux normaux et tumoraux cultivés "in vitro".
Thès. Fac. Sc. Paris, 157 p. .
62. LANZANI (G. A.) and GALANTE (E.) - 1964 -
 Peroxidase activities from Wheat embryo ribosomes.
Arch. Biochem. Biophys., 106 , 20 - 24 .

63. LAVEE (S.) and GALSTON (A. W.) - 1968 -
 Hormonal control of peroxidase activity in cultured
 Pelargonium pith.
 Amer. Jour. Bot., 55 , 890 - 893 .

64. LAVEE (S.) and GALSTON (A. W.) - 1968 -
 Structural, physiological and biochemical gradients in
 Tobacco pith tissue.
 Plant Physiol., 43 , 1760 - 1768 .

65. LEGRAND (B.) - 1969 -
 Répartition des catalases et peroxydases dans des fragments de
 racine de Carotte cultivés "in vitro".
 Rev. Gen. Bot., 76 , 469 - 475 .

66. LIPETZ (J.) and GALSTON (A. W.) - 1959 -
 Indole acetic acid oxidase and peroxidase activities in normal
 and crown gall tissue cultures of Parthenocissus tricuspidata.
 Amer. Jour. Bot., 46 , 193 - 196 .

67. LIPETZ (J.) and GARRO (A. J.) - 1965 -
 Ionic effects on lignification and peroxidase in tissue
 cultures.
 Jour. of Cell Biol., 25 , 109 - 116 .

68. LOEW (O.) - 1901 -
 Catalase a new enzyme of general occurrence.
 U. S. Dept. Agricult. Rep., 68 , 1 - 47 .

69. LOVREKOVICH (L.), LOVREKOVICH (H.) and STAHMANN (R.) - 1968 -
 The importance of peroxidase in the wildfire disease.
 Phytopathology, 58 , 193 - 197 .

70. LOWRY (O. H.), ROSEBOROUGH (N. J.), FARR (A. L.) and RANDALL (R. J.) - 1951
 Protein measurement with the folin phenol reagent.
 Jour. Biol. Chem., 193 , 265 - 275 .

71. MACKO (V.), HONOLD (G. R.) and STAHMANN (M. A.) - 1967 -
 Soluble proteins and multiple enzyme forms in early growth
 of Wheat.
 Phytochemistry, 6 , 465 - 471 .

72. MAGDON (E.) - 1964 -
 Untersuchungen zua beeinflussung der Katalaseaktivitat und
 der Strahlenempfindlichkeit von Vici Faba - Primärwurzeln
 durch Gibberellinsäur.
 Radiation Botant, 4 , 71 - 81 .

73. MARCHESINI (A.), SEQUI (P.) e LANZANI (G. A.) - 1968-1969 -
 Isoenzimi perossidasi del grano durante la germinazione.
 Agrochimica, 13 , 136 - 142 .

74. MAROTI (M.) and NADASSY (H.) - 1968 -
The cytological indicators of root growth. V. The catalase activity of isolated root segments.
Acta Bot. Acad. Sc. Hungaricae, 14, 351 - 356 .
75. MATSUSHITA (S.) and IBUKI (F.) - 1960 -
Peroxidase activity found in ribonucleic particles from Pea seedlings and Rabbit liver.
Biochim. Biophys. Acta, 40, 540 - 542 .
76. Mc COWN (B. H.), HALL (T. C.) and BECK (G. E.) - 1969 -
Plant leaf and stem proteins. II Isozymes and environmental change.
Plant Physiol., 44, 210 - 216 .
77. Mc COWN (B. H.), Mc LEESTER (R. C.), BECK (G. E.) and HALL (T. C.) - 1969 -
Environment - induced changes in peroxidase zymograms in the stems of deciduous and evergreen plants.
Cryobiology, 5, 410 - 412 .
78. MEUDT (W. J.) - 1967 -
Studies on the oxidation of indole - 3 - acetic acid by peroxidase enzymes.
Ann. NEW YORK Acad. Sc., 144, 118 - 128 .
79. NOVACKY (M.) and HAMPTON (R. E.) - 1968 -
Peroxidase isozymes in virus infected plants.
Phytopathology, 58, 301 - 305 .
80. OCKERSE (R.), SJEGEL (B. Z.) and GALSTON (A. W.) - 1966 -
Hormone induced repression of a peroxidase isozyme in plant tissue.
Science, 151, 452 - 453 .
81. PARISH (R. W.) - 1968 -
Studies on senescing Tobacco leaf disks with special reference to peroxidase. I The effects of cutting and of inhibition of nucleic acid and protein synthesis.
Planta, 82, 1 - 13 .
82. PARISH (R. W.) - 1968 -
Studies on senescing Tobacco leaf disks with special reference to peroxidase. II The effects and interactions of proline, hydroxyproline and kinetin.
Planta, 82, 14 - 21 .
83. PARISH (R. W.) - 1969 -
Studies on the effect of calcium and boron on peroxidases of plant cell walls.
Z. Pflanzenphysiol., 60, 211 - 216 .

84. PARISH (R. W.) and MILLER (F. L.) - 1969 -
The uptake and effects of calcium and phosphate on maturity, lignification and peroxidase activity of Wheat internodes. Austral. Jour. Biol. Sc., 22 , 77 - 85 .
85. PILET (P. E.) - 1956 -
Activité des auxines-oxydases dans les fragments de Carotte cultivés "in vitro" .
C. R. Acad. Sc., 243 , 1141 - 1143 .
86. PILET (P. E.) - 1967 -
Auxin content and auxin catabolism in relation to the growth polarity.
Physiol. Plant., 20 , 285 - 290 .
87. PILET (P. E.) and GALSTON (A. W.) - 1955 -
Auxin destruction, peroxidase activity, and peroxide genesis in the roots of *Lens culinaris*.
Physiol. Plant., 8 , 888 - 898..
88. PILET (P. E.), ZRYD (J. P.) et LAVANCHY (P.) - 1967 -
Rôle du pH dans l'analyse de l'activité auxines - oxydasique d'extraits bruts et purifiés.
Physiol. vég., 5 , 327 - 335 .
89. PLESNICAR (M.), BONNER (W. D.) and STOREY (B. T.) - 1967 -
Peroxidase associated with higher plant mitochondria.
Plant Physiol., 42 , 366 - 370 .
90. POPE (M. N.) - 1932 -
Catalase activity in relation to the growth curve in Barley.
Jour. of Agricult. Rep., 68 , 1 - 47 .
91. ROBERTS (D. W.) - 1969 -
A comparison of the peroxidase isozymes of Wheat plant grown at 6° and 20° C.
Canad. Jour. of Bot., 47 , 263 - 265.
92. RUBIN (B. A.) and IVANOVA (T. M.) - 1963 -
On the oxidase function of plant peroxidase.
Life Sciences, 4 , 281 - 289 .
93. SHEEN (S. J.) - 1969 -
The distribution of polyphenols, chlorogenic acid oxidase and peroxidase in different plant parts of Tobacco, *Nicotiana tabacum* L.
Phytochemistry, 8 , 1839 - 1847 .
94. SIEGEL (S. M.) - 1953 -
Effects of exposures of seeds to various physical agents.
II . Physiological and chemical aspects of heat injury in the red kidney bean embryo.
Bot. Gaz., 114 , 297 - 312 .

95. SIEGEL (S. M.) - 1954 -
 Studies on the biosynthesis of lignin.
Physiol. Plant., 7 , 41 - 50 .
96. SIEGEL (S. M.) - 1955 -
 The biochemistry of lignin formation.
Physiol. Plant., 8 , 20 - 32 .
97. SIEGEL (S. M.) - 1956 -
 The chemistry and physiology of lignin formation.
Quart. Rev. Biol., 31 , 1 - 18 .
98. SIEGEL (S. M.) and GALSTON (A. W.) - 1955 -
 Peroxide genesis in plant tissues and its relation to
 indoleacetic acid destruction.
Arch. Biochem. Biophys., 54 , 102 - 113 .
99. SIEGEL (B. Z.) and GALSTON (A. W.) - 1967 -
 Indoleacetic acid oxidase activity of apoperoxidase.
Science, 157 , 1557 - 1559 .
100. SIRONVAL (C.) - 1959 -
 Sur l'activité catalasique et peroxydasique des feuilles.
Arch. Intern. Physiol. Biochim., 67 , 125 - 126.
101. STAFFORD (H.) - 1960 -
 Differences between lignin like polymers formed by peroxy-
 dation of eugenol and ferulic acid in leaf sections of
 Phleum.
Plant Physiol., 35 , 108 - 114 .
102. STAHMANN (R.) - 1964 -
 Interactions of peroxidase and catalase between *Phaseolus*
vulgaris and *Pseudomonas phaseolicola* (Holla blight of bean).
Nature, 204 , 474 - 475 .
103. STREKOVA (Y.) - 1961 -
 Histochemical study of some processes taking place during
 hardening of Corn seeds by varying temperatures.
Friziologiya Rastenii, 8 , 168 - 172 .
104. THEORELL (H.) - 1942 -
 The preparation and some properties of crystalline Horse-
 radish peroxidase.
Ark. Kemi. Mineral Geol., 16 , 1 - 11 .
105. THEORELL (H.) - 1951 -
 The iron - containing enzymes. B . Catalase and peroxidase
 " hydroperoxidase".
 in: *The Enzymes Part. I*, Sumner and Myrbach ed. Academic
 Press NEW YORK, 397 - 427 .

106. TOLBERT (N. E.), OESER (A.), KISAKI (T.), HAGEMAN (R.), YAMAZAKI (R.) - 1966
Peroxisomes from Spinach leaves containing enzymes related to glycolate metabolism.
Jour. Biol. Chem., 243 , 5179 - 5184 .
107. TRAN THANH VAN (M.) et TRIPPI (V.) - 1969 -
Composition et activité des peroxydases chez le *Geum urbanum* L. en relation avec les traitements réfrigérants.
C. R. Acad. Sc., 269 , 1179 - 1182 .
108. UDVARDY (J.), HORVATH (M.), KISBAN (K.), DESIL (L.), FARKAS (G.) - 1964 -
Alteration of enzyme activities in detached leaves and their counteraction by kinetin.
Experientia, 20 , 214 - 215 .
109. VAN DULJN (P.) - 1955 -
An improved histochemical benzidine - blue peroxidase method and a note on the composition of the blue reaction product.
Rec. Trav. Chim., 74 , 771 - 778 .
110. VAN FLEET (D. S.) - 1959 -
Analys of the histochemical localization of peroxidase related to the differentiation of plant tissues.
Canad. Jour. of Bot., 37 , 449 - 458 .
111. VARGA (M.) and BITO (M.) - 1967 -
On the mechanism of gibberellin - auxin interaction. IV . Effect of gibberellin treatment on the oxidative destruction of indoleacetic acid in Bean hypocotyl tissues.
Acta Biol. Szeged, 13 , 107 - 112 .
112. VASSEUR (J.) - 1965 -
Sur les conditions de culture "in vitro" des tissus de feuille d'Endive.
Bull. Soc.Bot. Nord de la France, 18 , 205 - 212 .
113. VASSEUR (J.) et LEGRAND (B.) - 1970 -
Répartition des protéines, des acides nucléiques et des activités enzymatiques : auxines - oxydase, peroxydase et catalase dans les feuilles de l'Endive. (*Cichorium intybus* L.).
A paraître .
114. VEECH (J. A.) - 1969 -
Localization of peroxidase in infected Tobacco susceptible and resistant to black Shanks.
Phytopathology, 59 , 566 - 571 .
115. VIGIL (R. L.) - 1969 -
Intracellular localization of catalase (peroxidatic) activity in plant microbodies.
Jour. Histochem. Cytochem., 17 , 425 - 428 .

116. WESTON (T. J.) - 1969 -

The behaviour of peroxidase and polyphenol oxidase during
the growth and senescence of Tobacco leaves.
Jour. Experimental Bot., 20 , 56 - 63 .

117. WILLSTATER (R.) und STOLL (A.) - 1918 -

Ueber Peroxidase.
Liebig's Ann. der Chem., 416 , 21 - 64 .

118. YIP (C. C.) - 1964 -

The hydroxylation of proline by horseradish peroxidase.
Biochem. Biophys. Acta, 92 , 391 - 394.

T A B L E D E S M A T I E R E S

H I S T O R I Q U E

LES PEROXYDASES

I. DISTRIBUTION . LOCALISATION	4
II. LA LIGNIFICATION ET LES PEROXYDASES	5
III. LA RESPIRATION	6
IV. VARIATIONS DES PEROXYDASES AU COURS DU DEVELOPPEMENT	7
V. PEROXYDASES DANS LES TISSUS CULTIVES " IN VITRO "	8
VI. ACTIVITE AUXINES - OXYDASIQUE DE LA PEROXYDASE	8
VII. ACTION DES FACTEURS PHYTOHORMONAUX	9
VIII. FACTEUR PHYSIQUE : LA TEMPERATURE	9
IX. FACTEURS BIOLOGIQUES : PATHOLOGIE	10

LES CATALASES

I. DISTRIBUTION . LOCALISATION	11
II. LA DETOXCATION	11
III. VARIATIONS DES CATALASES AU COURS DU DEVELOPPEMENT	12
IV. CATALASES DANS LES TISSUS CULTIVES " IN VITRO "	13
V. ACTION DES FACTEURS PHYTOHORMONAUX	13
VI. FACTEUR PHYSIQUE : LA LUMIERE	13

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

I. TECHNIQUE DE CULTURE DES TISSUS " IN VITRO "	14
II. MATERIEL	14
A/ TISSUS D'ENDIVE	
B/ TISSUS DE CAROTTE	

III. TECHNIQUES EXPERIMENTALES

A/ MESURE DE LA CROISSANCE	16
B/ MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES	17
1° Technique d'extraction	
2° Mesure des activités enzymatiques	
a) Dosage de la peroxydase	
b) Dosage de la catalase	
C/ CRITIQUES METHODOLOGIQUES	19
1° L'extraction	
a) Le volume du tampon d'extraction	
b) Le pH du tampon d'extraction	
2° L'activité peroxydasique	
a) Le pH de la solution active	
b) Le pH du milieu réactionnel	
c) Le temps d'incubation	
3° L'activité catalasique	
a) La concentration enzymatique	
b) La température d'incubation	
c) Description de la technique	
4° Choix d'un critère de référence	

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I. TISSUS DE CAROTTE

A/ REPARTITION DES PEROXYDASES ET DES CATALASES DANS LES DIFFERENTS TISSUS DE LA RACINE DE CAROTTE	35
B/ CULTURE " IN VITRO " DE FRAGMENTS DE RACINE DE CAROTTE	36
1° Evolution des activités peroxydasique et catalasique	
2° Répartition des peroxydases et des catalases dans des fragments de racine de Carotte après 35 jours de culture	
C/ CULTURE "IN VITRO " DE TISSUS REPIQUES	45
1° Premier passage	
2° Deuxième passage	
3° Troisième passage	
4° Colonies tissulaires ayant subi de nombreux repiquages (Souche isolée par Gautheret)	

D/ INFLUENCE DE DIFFERENTS FACTEURS CHIMIQUES SUR LES TISSUS DE CAROTTE	50
1° Acide 3 - indolyl - acétique	
2° Acide naphtyl - acétique	
3° Acide 2,4 - dichlorophenoxy - acétique	

II. TISSUS D'ENDIVE

A/ REPARTITION DES PEROXYDASES ET DES CATALASES DANS LE BOURGEON	55
B/ TISSUS DE FEUILLE D'ENDIVE CULTIVES " IN VITRO "	58
1° Croissance et développement	
2° Evolution des activités peroxydasique et catalasique ..	
3° Répartition des activités catalasique et peroxydasique dans des fragments de feuilles, après 25 jours de culture "in vitro"	64

CONSIDERATIONS GENERALES

BIBLIOGRAPHIE

