

# THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

**Docteur ès Sciences Naturelles**

par

**Jacques VASSEUR**

ETUDE DU BOURGEONNEMENT DE FRAGMENTS  
DE FEUILLES ETIOLEES D'ENDIVE (*Cichorium intybus* L.)  
EN FONCTION DE CRITERES *caractéristiques*  
PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES.



Soutenu le 10 Nov. 1978, devant la Commission d'Examen

R. BOURIQUET	Rapporteur
H. DURANTON	Rapporteur
J. KREMBEL	Rapporteur
R.J. GAUTHERET	Examineur
J.L. BONNEMAIN	Examineur

## AVANT - PROPOS

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université de LILLE I, sous la direction de Monsieur le Professeur BOURIQUET à qui je dois d'avoir pu le mener à bien. Depuis le jour où il m'a accueilli dans son laboratoire, pour préparer un diplôme d'études supérieures, il ne m'a jamais ménagé, ni les conseils, ni les encouragements. Ses critiques et ses suggestions ont contribué, pour une grande part, à la mise au point définitive du texte de ce manuscrit. Je le prie de bien vouloir trouver ici le témoignage de ma reconnaissance la plus sincère.

Je suis particulièrement sensible à l'honneur que me fait Monsieur le Professeur GAUTHERET, Membre de l'Institut, en acceptant de juger ce mémoire.

J'adresse de très vifs remerciements à Monsieur le Professeur DURANTON qui a bien voulu être le rapporteur des recherches exposées ici.

Je suis également reconnaissant à Monsieur le Professeur BONNEMAIN de s'être intéressé à mon travail et de participer à la commission d'examen.

Que Monsieur le Professeur KREMBEL veuille bien accepter mes remerciements très sincères, pour ses critiques bienveillantes de la rédaction de cette thèse, ainsi que pour avoir accepté d'en être le rapporteur.

En dehors des membres du jury, je ne saurais oublier Monsieur KOVOOR, Maître de Recherche au C.N.R.S.; il trouvera ici le témoignage de ma profonde gratitude pour l'accueil chaleureux qu'il m'a réservé à chacun de mes séjours dans son laboratoire. Sa compétence, son enthousiasme communicatif et les conseils qu'il a toujours bien voulu me prodiguer m'ont aidé à surmonter bien des moments difficiles au cours de mes recherches.

Qu'il me soit permis de remercier également mes Collègues du laboratoire de Physiologie Végétale : M. BATCHO, J.P. COUILLEROT, J. DUBOIS, R. LEFEBVRE, B. LEGRAND et S. RAMBOUR, pour l'aide amicale que j'ai trouvée auprès de chacun d'eux. En particulier, B. LEGRAND se souviendra de nos débuts, animés de préoccupations communes et malgré des conceptions parfois différentes, dans la manière d'aborder les problèmes, j'ai apprécié les nombreuses discussions que nous avons eues. Mon activité de recherche concernant le dernier chapitre de ce mémoire étant indissociable de celle de S. RAMBOUR, il m'est agréable d'exprimer ici tout le plaisir que cette collaboration m'a procuré.

Enfin, je remercie tous ceux qui, à des titres divers, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

## SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	1
MATERIEL ET TECHNIQUES .....	4
A) LE MATERIEL VEGETAL .....	4
B) LA CULTURE IN VITRO .....	5
1°) Préparation du matériel .....	5
2°) Milieux de culture .....	6
3°) Conditions de culture .....	7
4°) Expression des résultats .....	7
C) LES TECHNIQUES BIOCHIMIQUES .....	9
1°) Dosage de l'azote .....	9
2°) Dosage des acides ribonucléiques totaux .....	10
a) procédé de SCHMIDT et TANNHAUSER .....	11
b) procédé de FLECK et MUNRO.....	15
c) procédé de GUINN .....	18
d) conclusion .....	20
3°) Méthodes de mesure des constituants biochimiques .....	21
a) mesures spectrophotométriques .....	21
b) mesures colorimétriques .....	21
4°) Détermination de l'activité ribonucléasique .....	23
5°) Détermination de la composition ribonucléotidique .....	25
6°) Incorporation de précurseurs radioactifs et mesure de la radioactivité .....	27
a) incorporation de précurseurs radioactifs dans les acides nucléiques .....	27
b) évaluation de la radioactivité incorporée .....	29
7°) Extraction et fractionnement des différentes catégories d'ARN .....	29
a) extraction des ARN .....	29
b) fractionnement des ARN sur colonne de MAK .....	32
8°) Recherche d'ARN polyadénylés .....	35

1ERE PARTIE : FORMATION DES BOURGEONS EN FONCTION DE =====	CRITERES PHYSIOLOGIQUES .....	37
CHAPITRE I : CONDITIONS D'UTILISATION DES DISQUES DE FEUILLES COMME TEST DE BOURGEONNEMENT .....		38
A) PRELEVEMENT ET CULTURE DES EXPLANTATS .....		39
1°) Le stade de développement des bourgeons étiolés .....		39
2°) Le lieu de prélèvement des explantats .....		40
3°) La taille des explantats .....		42
4°) Le mode d'ensemencement .....		44
B) MILIEU DE CULTURE .....		46
1°) Le glucose .....		46
2°) La gélose .....		48
3°) La solution nutritive .....		49
C) NATURE DES TISSUS .....		52
D) DISCUSSION ET CONCLUSIONS .....		54
CHAPITRE II : ACTION DE FACTEURS CHIMIQUES SUR LE BOURGEONNEMENT .....		59
A) ACTION DE QUELQUES REGULATEURS DE CROISSANCE .....		59
1°) Les auxines .....		60
a) action de l'acide indolyl-acétique .....		60
b) action de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique .....		61
2°) Les gibbérellines .....		62
a) action de l'acide gibbérellique .....		63
b) interaction acide gibbérellique-auxine .....		64

3°) Les cytokinines .....	66
a) action de la kinétine et de la 6-benzylaminopurine ..	67
b) action de la kinétine associée à l'auxine .....	68
c) action de la kinétine associée à l'acide gibbérellique	69
d) action comparée de la kinétine et de l'adénine .....	70
4°) Action du lait de coco .....	75
 B) ACTION DES PURINES ET DES PYRIMIDINES .....	 76
1°) Action des bases puriques et pyrimidines .....	76
2°) Action de quelques analogues puriques et pyrimidiques ..	79
a) analogues puriques .....	80
b) analogues pyrimidiques .....	82
c) influence de la kinétine sur l'inhibition produite par les différents analogues .....	86
d) action de l'hydrazide maléique .....	86
 C) DISCUSSION ET CONCLUSIONS .....	 94
 2EME PARTIE : FORMATION DES BOURGEONS EN FONCTION DE ===== CRITERES BIOCHIMIQUES .....	 104
 CHAPITRE I : ETUDE DE CRITERES BIOCHIMIQUES AU COURS DU BOURGEONNEMENT ..	 105
 A) EVOLUTION DES CRITERES UTILISES .....	 106
1°) Evolution du poids de matière fraîche et de matière sèche	106
2°) Evolution des teneurs en azote .....	106
3°) Evolution de l'ADN .....	108
4°) Evolution de l'ARN total .....	109
5°) Evolution de l'activité ribonucléasique .....	111
6°) Evolution des nucléotides de l'ARN total .....	112
 B) EVENEMENTS MORPHOGENETIQUES ET CRITERES BIOCHIMIQUES .....	 116

C) IMPORTANCE RELATIVE DE DEUX SYNTHESSES D'ARN .....	121
1°) Action de la kinétine et de l'auxine .....	121
2°) Action de l'hydrazide maléique .....	123
D) DISCUSSION ET CONCLUSIONS .....	124
 CHAPITRE II : ACIDES RIBONUCLEIQUES ET BOURGEONNEMENT .....	 128
A) MISE EN EVIDENCE ET EVOLUTION DES DIFFERENTES ESPECES MOLECULAIRES D'ARN .....	 129
1°) Modalités de la séparation sur colonne de MAK .....	129
2°) Evolution des différents types d'ARN .....	131
3°) Discussion .....	133
B) MISE EN EVIDENCE ET EVOLUTION DES ARN POLYADENYLES .....	137
1°) Mise en évidence des ARN polyadénylés .....	137
2°) Evolution des ARN polyadénylés de l'ARN global .....	140
3°) Evolution des ARN polyadénylés de la fraction "TB-RNA" des colonnes de MAK .....	 142
C) DISCUSSION ET CONCLUSIONS .....	143
 CONSIDERATIONS GENERALES ET CONCLUSIONS.....	 149
 RESUME.....	 173
 BIBLIOGRAPHIE .....	 177

## ABREVIATIONS UTILISEES

A D N	=	Acide désoxyribonucléique
A G <sub>3</sub>	=	Acide gibbérellique A <sub>3</sub>
A I A	=	Acide indolyl-acétique
A M P	=	Adénosine monophosphate
A P C	=	HClO <sub>4</sub> = Acide perchlorique
A R N	=	Acide ribonucléique
A R N m	=	Acide ribonucléique messenger
A R N - poly(A <sup>+</sup> )	=	Acide ribonucléique pourvu d'un segment poly (A) à son extrémité 3'OH
A S	=	Activité spécifique
A T C A	=	Acide trichloracétique
° C	=	Degré Celsius
Ci, mCi, µCi	=	Respectivement curie, millicurie et microcurie
C M P	=	Cytidine monophosphate
c.p.m.	=	Coups par minute
2,4-D	=	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
DNase	=	Désoxyribonucléase
D.O.	=	Densité optique = Absorbance
"D-RNA"	=	A R N dont la composition en bases est homologue de celle de l'A D N = "R N A like D N A"
E D T A	=	Ethylène diamine tétraacétate de sodium
g.	=	Accélération due à la pesanteur
G M P	=	Guanosine monophosphate
H M	=	Hydrazide maléique
K	=	Kinétine

M A K	=	Kieselgüühr imprégné de sérum albumine méthylée
nm	=	Nanomètre
poly (A)	=	Homopolymère d'acide adénylique
poly (U)	=	Homopolymère d'acide uridylique
P O P	=	2,5-diphényloxazole
P O P O P	=	1,4 bis-2 (4-méthyl-5-phényloxazolyl) benzène
RNase	=	Ribonucléase
S	=	Unité Svedberg
S D S (ou S L S)	=	Sodium dodecylsulfate (ou laurylsulfate)
"T B - R N A"	=	"Tenaciously bound R N A" = A R N qui restent fixés sur la colonne de M A K après le passage des solutions de NaCl = "ARN liés"
tr/min.	=	Tour par minute
tris	=	Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane
U M P	=	Uridine monophosphate
v/v	=	Volume/volume

# INTRODUCTION

Les tissus de racines, de tiges ou de feuilles cultivés "in vitro" sont parfois capables de produire des bourgeons. La néoformation de ces organes résulte toujours (BUVAT, 1944-1945) de la prolifération de cellules qui se dédifférencient, acquièrent la structure cytologique de cellules méristématiques et s'organisent en méristème caulinaire.

La culture des tissus de feuilles n'a été réalisée qu'assez tardivement, les chercheurs ayant été découragés par les échecs d'HABERLAND (1902). De plus, les feuilles sont des organes fragiles, parfois difficiles à désinfecter et leurs cellules très spécialisées exigent souvent l'emploi de milieux complexes.

Nous avons cependant choisi d'étudier la néoformation de bourgeons adventifs par des fragments de feuilles étiolées d'endive qui sont capables, comme les tissus de racines (GAUTHERET, 1941 ; 1942b ; BUVAT, 1944 ; CAMUS, 1949) de former spontanément des bourgeons.

De nombreux travaux ont déjà été consacrés à l'étude du bourgeonnement (PREVOT, 1939a ; SKOOG, 1944 ; 1950 ; 1954 ; 1955 ; GAUTHERET, 1959 ; 1964 ; 1966 ; CHAMPAGNAT, 1961 ; DORE, 1965 ; PAULET, 1965 ; BUTENKO, 1968 ; BIGOT, 1971 ; MURASHIGE, 1974). Nous aurons l'occasion de les évoquer plus en détail au cours des chapitres suivants.

Tous ces travaux montrent néanmoins que l'on connaît encore bien mal le déterminisme de la formation des bourgeons. Certes, de nombreux auteurs ont confirmé l'hypothèse émise par SKOOG et MILLER (1957) pour qui les phénomènes d'organogenèse sont réglés par un équilibre hormonal : auxine - cytokinine ; l'auxine inhibant le bourgeonnement et favorisant la rhizogenèse et la kinétine ayant l'effet inverse. L'avantage de cette théorie est d'expliquer de façon simple les potentialités organogénétiques des tissus par les gradients d'hormones endogènes. Toutefois, la néoformation des bourgeons est aussi le résultat d'interactions complexes entre facteurs endogènes et exogènes, stimulants ou inhibiteurs. Un autre mérite des travaux de SKOOG et de ses collaborateurs est d'avoir souligné l'importance des substances qui interviennent dans le métabolisme des acides nucléiques (SILBERGER et SKOOG, 1953 ; SKOOG, 1954 ; 1955). Cependant, les publications concernant les mécanismes biochimiques de la néoformation des organes sont encore peu nombreuses et ne permettent pas d'avoir une idée précise du phénomène.

La culture des tissus de feuilles d'endive ayant été réalisée pour la première fois par TOPONI (1963a), nous en avons précisé les modalités et étudié l'action exercée, sur les phénomènes d'organogenèse, par un certain nombre de facteurs. Nous avons ensuite tenté une approche, à l'échelle moléculaire, des phénomènes liés à la néoformation des bourgeons. Le plan que nous suivons dans ce travail est alors le suivant :

- après avoir décrit le matériel et les techniques utilisées, les résultats ont été scindés en deux parties :

. dans la première, nous définirons un milieu minimum permettant un développement satisfaisant des tissus de feuilles d'endive. Nous étudierons ensuite l'influence sur la néoformation des bourgeons, de différents régulateurs de croissance ainsi que des bases puriques et pyrimidiques et de quelques uns de leurs analogues structuraux. Les résultats obtenus

ont alors orienté notre travail vers le métabolisme des acides nucléiques.

. dans la seconde partie, nous avons donc cherché à mettre en évidence les modifications biochimiques qui caractérisent les étapes de la transformation histologique aboutissant à la formation des bourgeons. Cela nous conduira à analyser plus particulièrement le métabolisme des acides ribonucléiques.

- enfin, dans un chapitre de considérations générales, nous situons nos propres résultats parmi ceux de nos prédécesseurs. Cette analyse prolonge et complète les discussions des différents chapitres ; elle nous permettra de dégager les idées susceptibles d'orienter la poursuite de ce travail.

# MATERIEL ET TECHNIQUES

## A) LE MATERIEL VEGETAL

Pour étudier l'organogenèse et plus particulièrement le bourgeonnement, nous avons utilisé l'endive (*Cichorium intybus* L. cultivar "Witloof"), plante commune de nos régions qui présente la propriété de se multiplier très facilement par voie végétative.

Semées en plein champ au printemps, les plantes sont récoltées à l'automne. Privées de leurs feuilles par section au niveau du collet et mises en couches, elles subiront le forçage selon des techniques pratiquées par les producteurs. La chaleur du forçage permet la reprise de l'activité végétative et le développement de bourgeons étiolés appelés communément "chicons". Les feuilles sont imbriquées les unes dans les autres et atteignent à maturité une vingtaine de centimètres de longueur. Ce sont principalement ces feuilles étiolées que nous avons utilisées dès la sortie des couches, afin de réduire les variations liées à l'état physiologique des tissus.

La durée d'utilisation de ces tissus s'étend généralement du mois d'octobre au mois d'avril mais dépend essentiellement des températures hivernales. Des basses températures ralentissent la reprise de l'activité végétative des racines et favorisent l'étalement de la période de production alors que des températures clémentes provoquent l'effet inverse. En fait, la période d'utilisation est déterminée expérimentalement chaque année à l'intérieur de ces limites. Nous avons en effet constaté qu'au début de la période de production, les tissus de feuilles prolifèrent mal et produisent peu d'organes alors qu'à la fin de cette période, si la prolifération et la production des bourgeons sont satisfaisantes, les infections microbiennes augmentent notablement en dépit de conditions rigoureuses d'asepsie.

## B) LA CULTURE "IN VITRO"

La technique de culture de tissus employée, est celle décrite par GAUTHERET (1942a et c, 1959). Elle permet de cultiver des fragments d'organes en supprimant les phénomènes de corrélations, dans des conditions aseptiques et sur un milieu de composition définie.

### 1°) Préparation du matériel

Au moment de l'utilisation, les feuilles les plus externes qui forment l'enveloppe du "chicon" sont éliminées. Les autres sont séparées, stérilisées par immersion pendant 20 minutes dans une solution d'hypochlorite de calcium à 7 % puis lavées dans trois bains successifs d'eau stérile. La solution d'hypochlorite de calcium est obtenue par agitation de la poudre (à 215° chlorométrique) 15 minutes dans l'eau puis par filtration. Les explants sont alors prélevés au niveau de la nervure principale, très charnue,

à l'aide d'un trocart de 16 mm de diamètre. Sur de tels explantats, nous pouvons définir une partie basale et une partie apicale suivant l'orientation par rapport à la feuille mère.

## 2°) Milieux de culture

Les milieux nutritifs que nous avons utilisés comprennent des sels minéraux, du glucose (3 %) et sont solidifiés par de la gélose (0,9 %).

Afin de simplifier au maximum les conditions de culture, nous avons utilisé le milieu nutritif de base préconisé par GAUTHERET (1942a) qui comprend les macroéléments de la solution de KNOP (1884) diluée de moitié et les microéléments de la solution de BERTHELOT.

Nous n'avons pas entrepris l'étude systématique de l'action des éléments minéraux sur le bourgeonnement mais pour juger des limites d'utilisation du milieu de base, nous avons été amené à le comparer d'une part, au milieu de HELLER (1953) et d'autre part, au milieu préconisé par MURASHIGE et SKOOG (1962) qui comprend en outre des constituants organiques : hydrolysate de caséine (1 g/l), myo-inositol (100 mg/l), glycolle (2 mg/l), acide nicotinique (0,5 mg/l), pyridoxine-HCl (0,5 mg/l), thiamine-HCl (0,1 mg/l) ainsi que de l'acide indolyl-acétique et de la kinétine.

Dans tous les cas, le pH est ajusté à 5,5 avec de la soude ou de l'acide chlorhydrique. Les milieux de culture sont répartis dans des tubes (diamètre 20 mm x longueur 160 mm) bouchés par du coton hydrophile puis autoclavés à 120°C pendant 20 minutes.

Les substances de croissance sont ajoutées aux milieux avant stérilisation sauf lorsqu'elles sont thermolabiles, comme en particulier l'acide gibbérellique (BRAGT et PIERIK, 1971). Dans ce cas, elles sont stérilisées soit par l'éther, soit après mise en solution, par filtration sur membrane

d'ester de cellulose (Millipore) retenant les particules d'un diamètre supérieur à  $0,45 \mu$ .

Les disques de feuilles sont alors ensemencés suivant des modalités qui seront définies ultérieurement.

### 3°) Conditions de culture

Après ensemencement, les tubes de culture sont capuchonnés au moyen de papier d'étain afin d'éviter une évaporation trop intense, puis placés dans une pièce climatisée à  $22^{\circ}\text{C}$ , éclairée douze heures par jour. La lumière est produite par des tubes luminescents qui fournissent un éclairage de 1000 lux environ au voisinage des tubes de culture.

### 4°) Expression des résultats

#### a) évaluation du bourgeonnement

Une série expérimentale comprend 24 explantats ensemencés à un temps  $t_0$  et comparés entr'eux à un temps  $t_x$ . Chaque essai est répété au moins deux fois.

Nos résultats sont souvent discutés dans le cadre de chaque série d'essais, pour éviter l'écueil dû à la variabilité du matériel biologique au cours de l'année. En effet, la capacité organogène des fragments des lots témoins peut varier sensiblement au cours des expériences successives. Toutefois, à l'intérieur d'une même série, il est possible de réduire ces variations, par le contrôle rigoureux des conditions de culture, par le choix des explantats et par leur distribution aussi homogène que possible entre les différents lots.

Sur le milieu de base, les bourgeons apparaissent entre le 10<sup>e</sup> et le 12<sup>e</sup> jour après l'ensemencement. Leur nombre augmente ensuite régulièrement jusqu'au 30<sup>e</sup> jour de culture puis se stabilise (figure 1) ; c'est pourquoi les dénombrements sont effectués le 40<sup>e</sup> jour. Nous avons considéré comme bourgeon

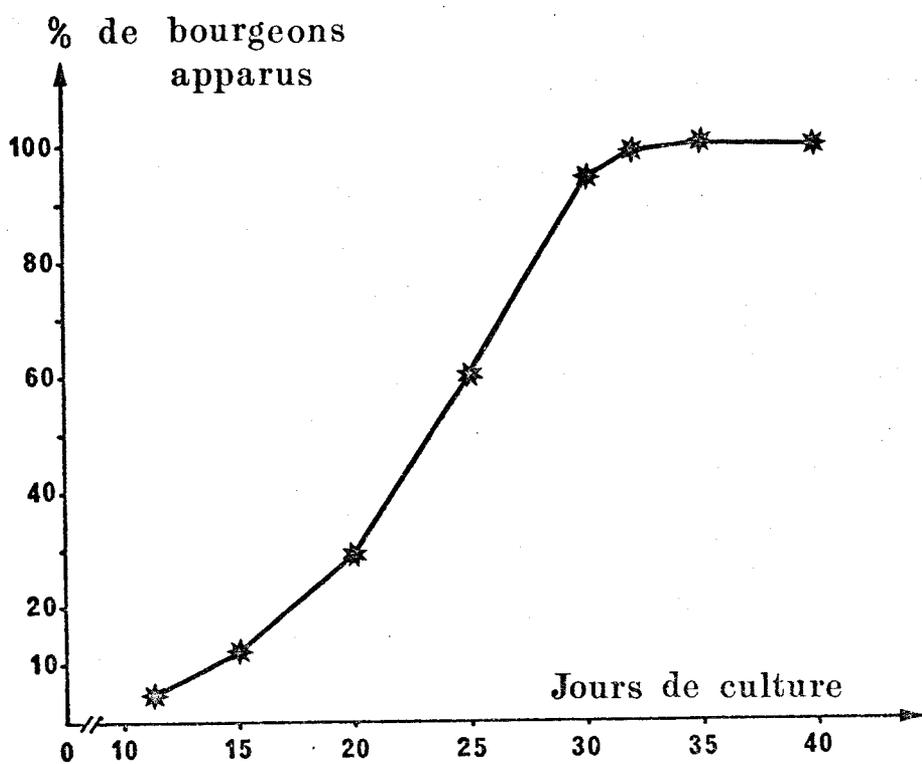


Figure 1 : Cinétique de l'apparition des bourgeons en fonction du temps de culture.

Le pourcentage de bourgeons apparus à un moment donné est établi en fonction du nombre total des bourgeons formés après 40 jours de culture.

toute ébauche caulinaire ayant formé au moins une feuille.

D'une manière générale, nous avons calculé le nombre moyen d'organes néoformés par explantat. Dans les tableaux, nous avons également fait figurer deux autres valeurs :

- l'une donne le pourcentage d'explantats portant des bourgeons
- l'autre donne le pourcentage d'explantats ayant proliféré.

Ceci est justifié par le fait qu'au sein d'un même lot, tous les explantats ne prolifèrent pas. De même, parmi ceux qui prolifèrent, tous ne sont pas organogènes.

L'intensité du bourgeonnement est alors évaluée en tenant compte à la fois du nombre moyen de bourgeons produits par explantat et du pourcentage de fragments produisant un ou plusieurs organes. L'intensité de la prolifération sera exprimée par le pourcentage d'explantats manifestant des propriétés callogènes. De plus, nous décrirons l'aspect de la prolifération cellulaire à chaque fois qu'elle sera différente de celle observée sur les explantats du lot témoin.

### b) évaluation de la croissance

Indépendamment des phénomènes d'organogenèse, la croissance d'un explantat peut être suivie dans le temps par l'augmentation de sa masse de matière fraîche et de matière sèche.

Les explantats sont alors extraits des tubes à essais, essuyés afin d'éliminer tout le milieu pouvant adhérer à leur surface puis pesés (poids de matière fraîche, P.F.). Ils sont ensuite maintenus à l'étuve à 100°-105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant (poids de matière sèche, P.S.).

## C) LES TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

### 1°) Dosage de l'azote

Le matériel séché est réduit en poudre. Pour déterminer l'azote total, des prises d'essai de 100 à 200 mg sont minéralisées, en triple exemplaires, dans des matras de Kjeldahl (BRUNEL, 1948) en présence d'acide sulfurique concentré et de catalyseur au sélénium ( $\text{CuSO}_4$  : 1 partie ;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  : 1 partie ; Se : 0,2 partie). La minéralisation est poursuivie 6 heures après décoloration du mélange. La liqueur sulfurique refroidie est alors amenée à 50 ml avec de l'eau distillée. Des parties aliquotes (2 ml) de cette liqueur diluée sont mélangées à 2 ml du réactif de Nessler (produit Merck ; mélange

en proportions égales des solutions A et B) et complétées à 25 ml dans une fiole jaugée. Après 5 minutes, l'intensité de la coloration jaune obtenue est déterminée au photocolorimètre à 420 nm. Chaque série de minéralisations comporte un témoin (sans azote) et des matras contenant des quantités connues d'azote sous forme de sulfate d'ammonium (de 500 à 3000  $\mu\text{g}$  de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ). On trace alors une courbe étalon qui permet de calculer les quantités d'azote contenues dans les prises d'essais.

L'azote protéique est obtenu par contact de la poudre végétale avec de l'acide trichloracétique à 10 % pendant 12 heures à  $0^\circ\text{-}4^\circ\text{C}$ . Dans ces conditions, les protéines précipitent et sont séparées de la partie soluble par filtration sur papier filtre sans cendre. Après plusieurs rinçages avec de l'acide trichloracétique à 5 %, le résidu insoluble (filtre compris) est minéralisé, puis dosé selon le protocole précédemment décrit.

La détermination du taux d'azote soluble est faite par différence entre le taux d'azote total et le taux d'azote protéique.

## 2°) Dosage des acides ribonucléiques totaux

L'extraction des acides nucléiques peut s'effectuer suivant trois procédés différents dont le principe général peut se résumer ainsi : les tissus sont homogénéisés dans des solutions d'acides trichloracétique ou perchlorique qui précipitent la fraction macromoléculaire totale ; cette dernière est délipidée, puis extraite, soit par un traitement à chaud avec ces mêmes acides (SCHNEIDER, 1945), soit par un traitement à froid (OGUR et ROSEN, 1950), soit encore par une hydrolyse alcaline sélective qui libère les ribonucléotides (SCHMIDT et THANNHAUSER, 1945).

Ces procédés ont été mis au point essentiellement pour des tissus animaux. Or, aucun d'entr'eux n'est applicable directement à l'étude des tissus végétaux qui se prêtent beaucoup plus difficilement que les animaux, les bactéries ou les virus à des études biochimiques. Ceci est dû essentiel-

lement à l'existence de nucléases très actives, à la faible proportion (par rapport au poids de tissu) d'acides nucléiques et à la présence de pigments ou de substances qui interfèrent avec la détermination de ces acides nucléiques (DE DEKEN - GRENSON et DE DEKEN, 1959 ; TSANEV et MARKOV, 1960 ; INGLE, 1963 ; NIEMAN et POULSEN, 1963 ; FLECK et MUNRO, 1962, WOLLGIEHN et PARTHIER, 1964 ...).

Il faut donc adapter la méthodologie aux exigences des tissus. En 1961, HUTCHINSON et MUNRO, publient une étude critique détaillée des différentes méthodes d'extraction et recommandent, tout en la modifiant légèrement, la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER. C'est en fait la seule qui ait été retenue après de nombreuses études comparatives (MUNRO et FLECK, 1966) ; c'est pourquoi nous avons essayé de l'adapter aux tissus qui nous intéressent :

a) procédé de SCHMIDT et THANNHAUSER

Le matériel végétal (20 fragments) est congelé avec de l'azote liquide et broyé dans de l'acétone à 80 %. L'homogénat est centrifugé et le culot de centrifugation est repris par de l'acétone à 80 % jusqu'à l'obtention d'un surnageant clair. Toutes les opérations sont effectuées à 4°C et les centrifugations sont réalisées, chacune 10 minutes, à 20.000 g. Nous avons ajouté cette étape à la méthode originale de SCHMIDT et THANNHAUSER car des solvants tels que l'acétone ou le méthanol réduisent l'activité nucléasique et éliminent la plupart des pigments (SMILLIE et KROTKOV, 1960).

De la poudre acétonique sont alors extraits les composés solubles dans l'acide trichloracétique (ATCA). Cette fraction acido-soluble est très hétérogène ; elle regroupe des molécules de faible poids moléculaire dont le seul point commun est la solubilité à froid en milieu acide.

Le culot de précipitation trichloracétique est alors lavé à trois reprises par de l'éthanol saturé en acétate de sodium. Cette opération

est très importante car, s'il subsiste des traces d'acide par suite d'un lavage insuffisant, l'acide désoxyribonucléique peut subir des modifications avec formation d'acide apurique (MARKO et BUTLER, 1951, BONAR et DUGGAN, 1955, STEELE, OKAMURA et BUSCH, 1964). Cette réaction a lieu à partir de  $\text{pH} = 1,6$  et peut être totale en 24 heures à  $37^{\circ}\text{C}$ . Ces conditions peuvent être atteintes au cours des opérations de délipidation à chaud. L'ADN ainsi dégradé qui se sépare mal de l'ARN, peut provoquer des erreurs par excès de la fraction ribonucléique.

Le résidu est alors délipidé par deux traitements successifs avec un mélange : éthanol-chloroforme (3/1 ; v/v) puis éthanol-éther (3/1 ; v/v) et enfin traité par de l'éther.

Le résidu blanc, fibreux obtenu peut être conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  (BROUGHTON, 1970). Il est mis en suspension dans une petite quantité de potasse 0,3 N afin d'obtenir une pâte homogène ; on complète ensuite à 20 ml avec KOH 0,3 N. L'hydrolyse alcaline est effectuée à  $37^{\circ}\text{C}$ , pendant 16 heures. La solution obtenue est ramenée à  $4^{\circ}\text{C}$  et ajustée à  $\text{pH} = 1$  par l'acide perchlorique 6 N froid. Après 3 à 4 heures de repos à  $4^{\circ}\text{C}$ , le précipité centrifugé à 10.000 g, pendant 20 minutes, sera lavé à deux reprises par l'acide perchlorique 0,25 N. Les surnageants recueillis constituent la fraction d'ARN. Le culot peut alors être traité par l'acide perchlorique (APC) à chaud pour extraire l'ADN. Les différentes phases de l'extraction sont résumées dans un schéma (figure 2).

La comparaison des spectres d'absorption des solutions d'ARN obtenus par cette méthode et celui d'un ARN commercial traité de la même manière, pour tenir compte de l'effet hyperchrome provoqué par l'hydrolyse alcaline (figure 3) montre que les premiers sont peu satisfaisants. Cela incombe certainement en grande partie à la présence de composés phénoliques, toujours abondants dans le matériel végétal (PAUPARDIN, 1970) qui possèdent des

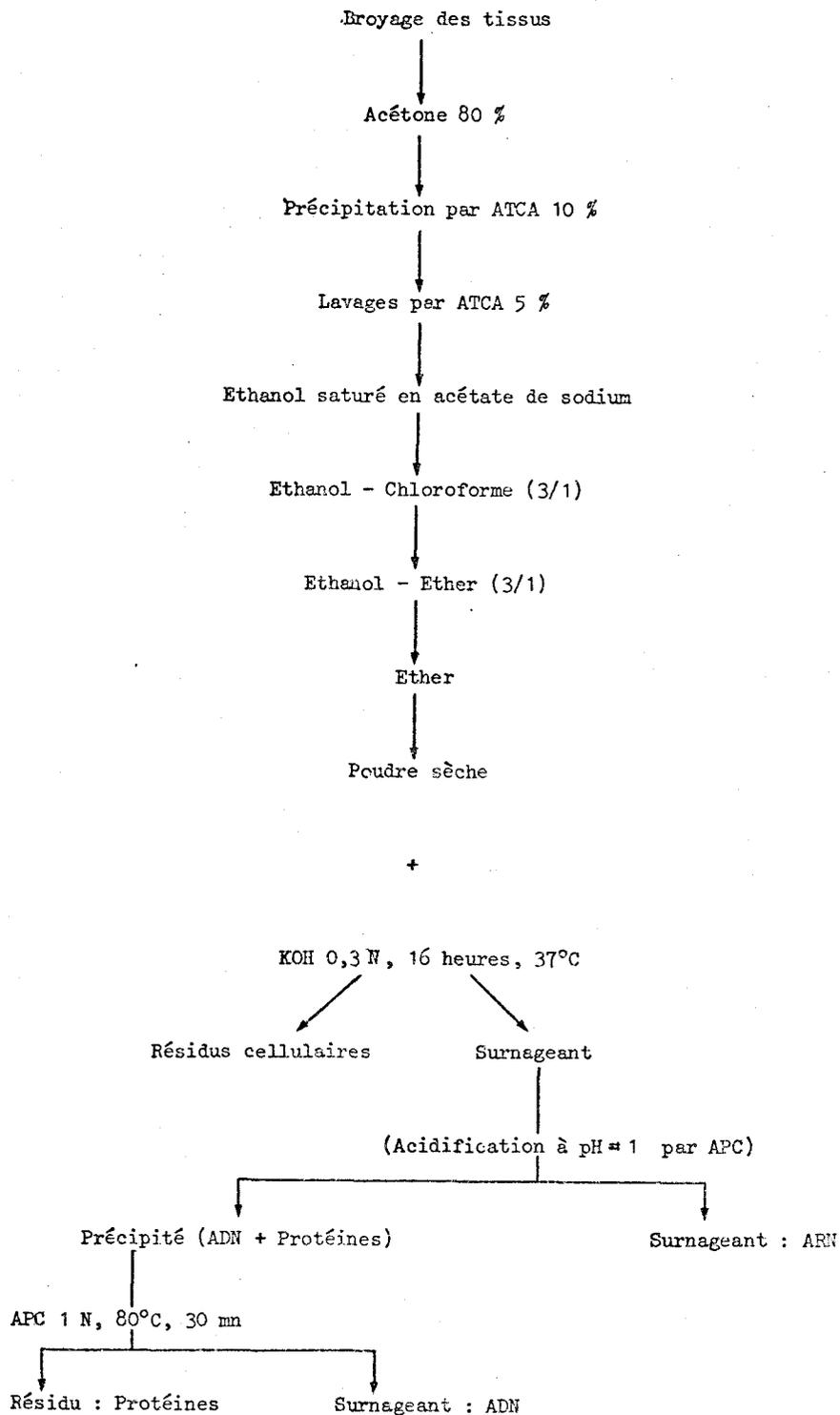


FIGURE 2

Schéma de l'extraction des acides nucléiques selon la méthode de SCHMIDT-THANNHAUSER (1945)

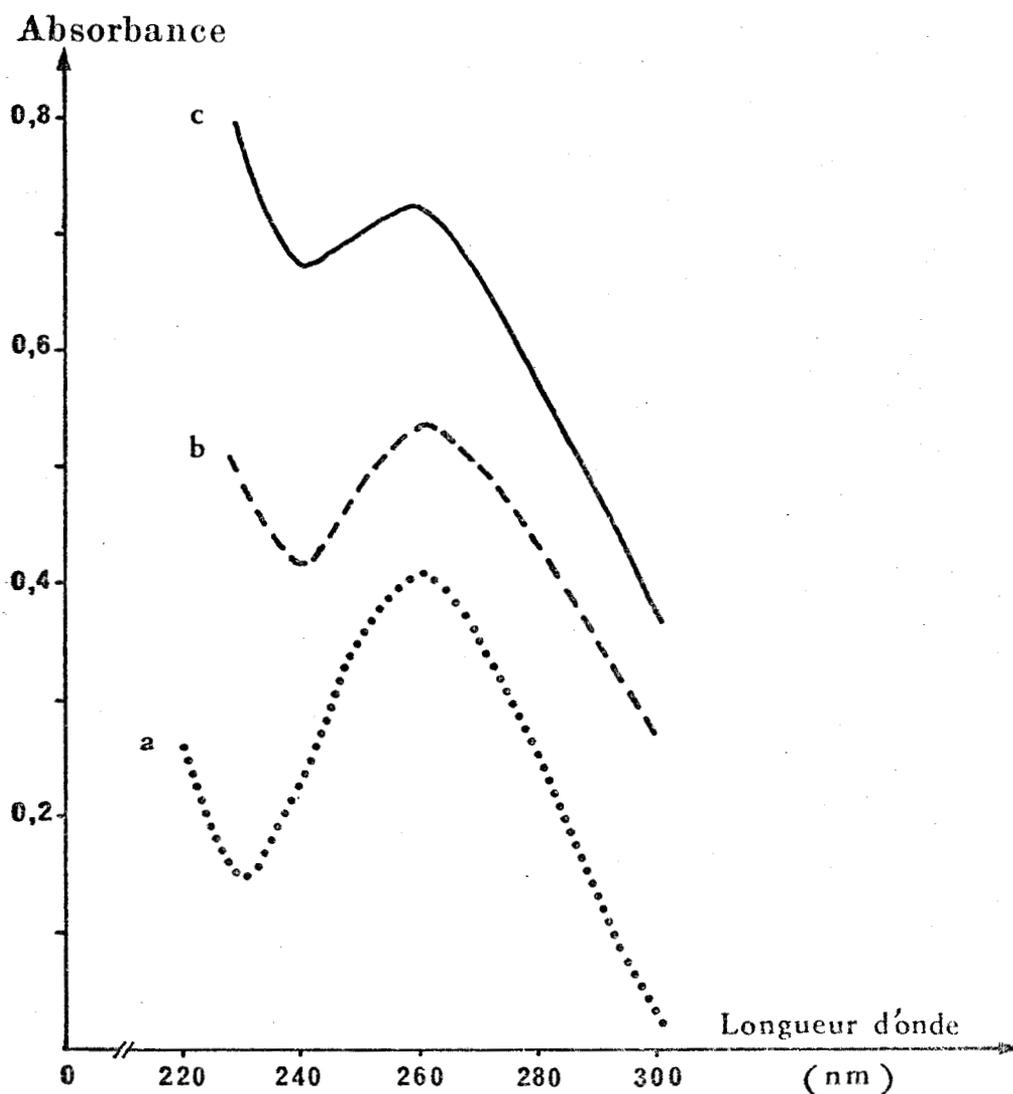


Figure 3 : Spectres d'absorption d'acides ribonucléiques obtenus par la méthode de SCHMIDT-TANNHAUSER

- a) ARN commercial
- b,c) ARN extraits de fragments de feuilles d'endive
  - b) avant la mise en culture
  - c) après 12 jours de culture.

propriétés d'absorption dans l'ultraviolet susceptibles de perturber les spectres des acides nucléiques. Ces substances provoquent un brunissement progressif des explantats au cours de la culture ; brunissement qui se produit d'abord au niveau des zones de blessure et est lié à l'oxydation des composés phénoliques et à leur polymérisation. La présence de ces composés

nous avait incité à utiliser de l'acétone à 80 % susceptible d'en assurer une bonne extraction (MACHEIX, 1974) en favorisant la rupture des liaisons qui peuvent se former avec les protéines (ANDERSON, 1968). Toutefois, dans nos conditions d'extraction, si l'acétone extrait bien la totalité des pigments chlorophylliens, il n'en est pas de même des composés phénoliques qui sont très difficiles à éliminer (ROUX, 1963). Ceux qui ne sont pas extraits, sont oxydés au cours de l'hydrolyse potassique et donnent une coloration jaune pâle aux extraits. Dans le cas de l'albumen immature de Maïs, cette pigmentation jaune des solutions d'ARN a été attribuée à l'acide chlorogénique (SEIGLE-MURANDI, 1971).

La présence de tels contaminants provoque un déplacement du minimum d'absorption des spectres, en lumière ultra-violette, de 230 nm à 240 nm. Les rapports des densités optiques à 260 nm par rapport à celles à 280 nm et à 230 nm sont beaucoup plus faibles (Tableau 1) que ceux observés pour un ARN commercial traité dans les mêmes conditions qui sont respectivement de 1,70 et 2,84. De plus, les résultats obtenus par le dosage du phosphore et par la mesure de la densité optique à 260 nm ne sont pas concordants.

Le procédé de SCHMIDT et THANNHAUSER ne permet donc pas d'obtenir une fraction d'ARN dont la pureté soit suffisante pour permettre des études comparatives. C'est pourquoi nous avons essayé d'améliorer la qualité des extractions soit en réduisant le temps d'hydrolyse (FLECK et MUNRO, 1962), soit par une extraction préalable des tissus au chlorure de sodium, avant l'hydrolyse potassique (GUINN, 1966).

#### b) procédé de FLECK et MUNRO

Il est identique à celui de SCHMIDT et THANNHAUSER mais le temps de contact des tissus avec la solution de potasse 0,3 N est ramené de 16 heures à 1 heure. Selon ces auteurs, une durée de traitement de 1 heure

METHODE D'EXTRACTION						
	Schmidt et Thannhauser		Fleck et Munro		Guinn	
	J <sub>0</sub>	J <sub>12</sub>	J <sub>0</sub>	J <sub>12</sub>	J <sub>0</sub>	J <sub>12</sub>
D.O. *	16,9	32,9	12,8	19,2	13,1	18,2
Phosphore	13,4	18,8	12,9	18,1	13,5	17,9
$\frac{260}{280}$ (1,70)	1,25	1,02	1,60	1,56	1,67	1,67
$\frac{260}{230}$ (2,84)	1,17	0,95	1,55	1,48	2,29	2,26

TABLEAU 1 : Influence de la méthode d'extraction sur la pureté de l'ARN extrait des tissus avant la mise en culture (J<sub>0</sub>) et après 12 jours de culture (J<sub>12</sub>).

La teneur en A R N est évaluée par le dosage du phosphore et par la mesure de la densité optique à 260 nm (\* dans ce cas, le contenu en phosphore est estimé sur la base de 9,1 % ; Ingle 1963). Les résultats sont exprimés en µg de phosphore par gramme de matière fraîche (µg P/g PF).

réduit au minimum la contamination par les protéines et suffit pour rendre acido-soluble la fraction d'ARN.

Pour vérifier l'efficacité de cette méthode, nous avons utilisé des fragments de feuilles ayant été cultivés pendant 12 jours, ce qui représente la date limite de nos dosages. De tels fragments doivent donc contenir un maximum de substances susceptibles de contaminer les extraits. Les résultats obtenus (figure 4) montrent qu'une durée de traitement de 1 heure par la potasse suffit pour solubiliser tout l'ARN et le spectre d'absorption est comparable à celui obtenu pour l'ARN témoin (figure 3). De plus, les valeurs obtenues par le dosage du phosphore et par la mesure de l'absorbance sont comparables (Tableau 1) et les rapports des densités optiques  $\frac{260}{280}$  et  $\frac{260}{230}$  sont nettement améliorés.

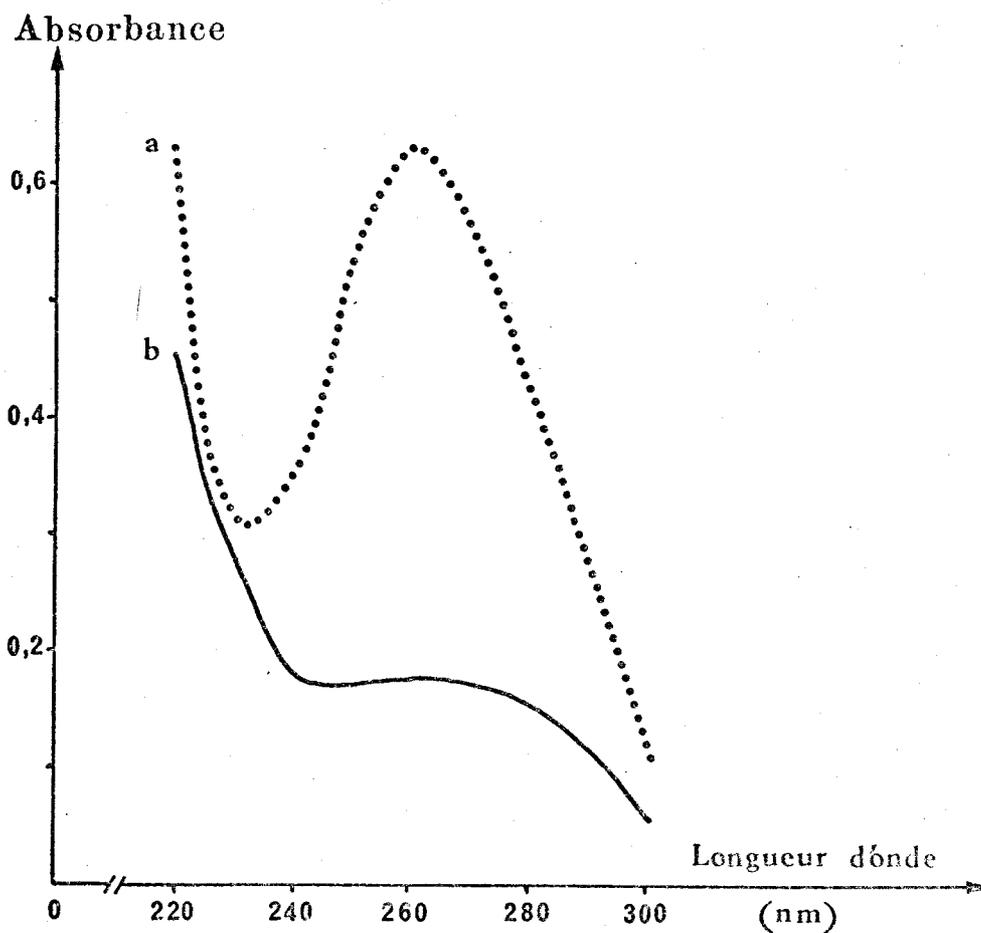


Figure 4 : Spectre d'absorption de l'acide ribonucléique obtenu par le procédé de FLECK et MUNRO.

L'ARN (a) est obtenu par contact des tissus 1 heure avec la solution de potasse à 0,3 N. Le résidu cellulaire est à nouveau extrait par la potasse pendant 16 heures (b).

Ce procédé donne donc de bons résultats. Par contre, la brièveté de l'hydrolyse potassique ne permet pas la libération quantitative des mononucléotides à partir de fragments polynucléotidiques.



### c) procédé de GUINN

En comparant différentes méthodes d'extraction, GUINN (1966) constate que les solutions de chlorure de sodium permettent d'extraire le maximum d'acides nucléiques avec un minimum d'impuretés.

Nous avons utilisé cette propriété de la manière suivante : les tissus sont d'abord traités par l'acétone à 80 %, par l'acide trichloracétique puis délipidés selon le protocole décrit précédemment (figure 2). La poudre sèche obtenue est traitée à deux reprises par une solution de chlorure de sodium à 10 % pendant 1 heure et à 100°C (figure 5). Après centrifugation, les surnageants refroidis sont réunis et les acides nucléiques sont précipités, pendant une nuit au congélateur, par deux volumes d'éthanol absolu froid, en présence d'acétate de potassium (SCHAEFFER et SHARPE, 1970). Le précipité centrifugé et séché, est hydrolysé par une solution de potasse 0,3 N pendant 16 heures à 37°C, suivant le procédé de SCHMIDT et THANNHAUSER.

Plus de 80 % des acides nucléiques sont extraits lors du premier traitement de une heure ( $S_1$ ) par la solution de NaCl. De plus, nous avons vérifié qu'après une deuxième extraction, le traitement des résidus cellulaires (2) par la potasse ou par le chlorure de sodium à chaud, ne solubilise plus d'acides nucléiques.

Les spectres d'absorption des ARN obtenus par ce procédé et par celui de FLECK et MUNRO présentent un profil identique. Cependant, pour l'ARN extrait selon le procédé de GUINN, les rapports des densités optiques à différentes longueurs d'onde sont plus élevés (Tableau 1), ce qui indique un degré de pureté supérieur. De même, les teneurs en ARN évaluées par le dosage du phosphore et par la mesure de la densité optique sont concordantes.

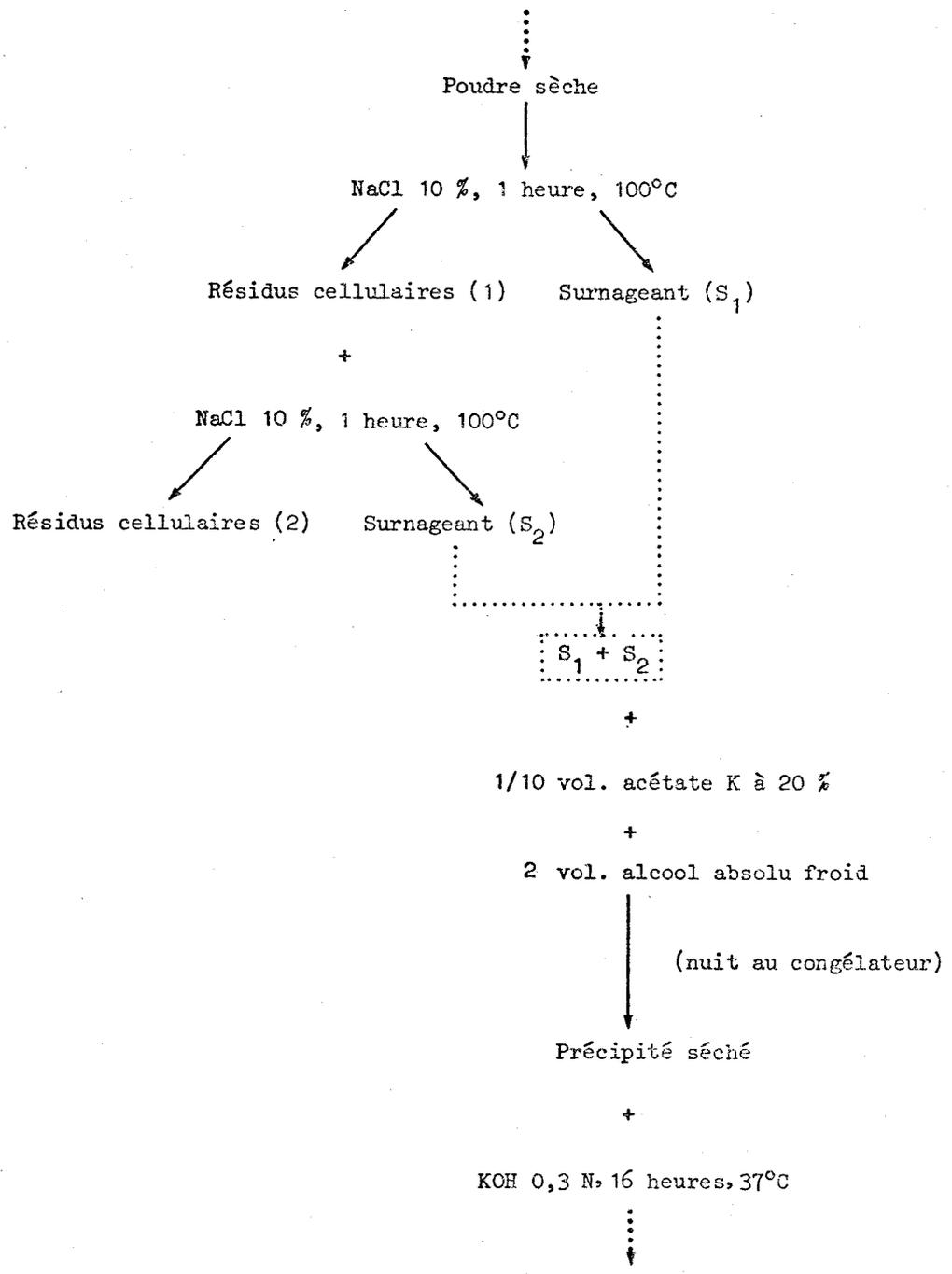


FIGURE 5

Schéma de l'extraction des acides nucléiques selon la méthode de GUINN (1966)



#### d) conclusion

Les résultats obtenus permettent quelques commentaires. Les spectres d'absorption de l'ARN extrait par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER (figure 3) mettent en évidence des contaminations plus importantes lorsque les tissus ont été cultivés pendant 12 jours. Parallèlement, la teneur en ARN augmente (Tableau 1). Cette augmentation pourrait résulter de l'accumulation de matériel non nucléotidique, venant interférer avec les méthodes de dosage des acides nucléiques. En fait, il n'en est pas ainsi, comme le prouvent les résultats obtenus à l'aide des autres méthodes d'extraction. Cela démontre néanmoins qu'il faut non seulement adapter les techniques au matériel utilisé, mais aussi tenir compte du stade de développement de la plante.

La solution d'ARN obtenue par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER est impropre à des dosages spectrophotométriques comme le montre la forme des spectres et les rapports des densités optiques (figure 3 ; Tableau 1). De nombreux tissus de plantes donnent des résultats semblables (HOLDGATE et GOODWIN, 1965). Toutefois, les modifications apportées à cette technique par FLECK et MUNRO ou par GUINN se sont révélées intéressantes. Elles permettent d'obtenir des solutions d'ARN dont les critères de pureté sont comparables à ceux trouvés dans la littérature et qui présentent une bonne concordance entre les mesures colorimétriques et spectrophotométriques.

Après hydrolyse potassique, il peut se produire une anomalie provenant de la précipitation incomplète de l'ADN après acidification de l'extrait par l'acide perchlorique (SMILLIE et KROTKOV, 1960). Cependant, les vérifications effectuées sur les fractions d'ARN à l'aide du réactif à la diphenylamine ont abouti à des résultats négatifs. Les solutions d'ARN semblent donc exemptes d'ADN.

Bien que le protocole expérimental soit relativement long, c'est la méthode préconisée par GUINN que nous avons retenue. Les extraits pré-

sentent une pureté suffisante et permettent l'étude de la composition ribonucléotidique.

### 3°) Méthodes de mesure des constituants biochimiques

#### a) mesures spectrophotométriques

L'ARN est dosé par spectrophotométrie d'absorption à la longueur d'onde de 260 nm en utilisant comme référence de l'ARN de levure (SIGMA, type XI) hydrolysé.

#### b) mesures colorimétriques

##### α) mesure du phosphore

Le phosphore est dosé selon la méthode de ALLEN (1940). Le principe consiste à détruire la matière organique par un mélange  $H_2SO_4 - HClO_4$  et à transformer l'acide phosphorique en acide phosphomolybdique que l'on réduit par l'amidol.

La minéralisation est effectuée dans des tubes pyrex à l'aide de 1 ml d'un mélange d'acide sulfurique (d : 1,83) et d'acide perchlorique (d = 1,61) dans les proportions volumiques 3 - 1. On ajoute 10 ml d'eau distillée et on porte à l'étuve à 100°C, pendant 2 heures, pour hydrolyser les polyphosphates. Après refroidissement, on introduit successivement : 1 ml de molybdate d'ammonium en solution à 8,3 % et 1 ml de solution réductrice, préparée extemporanément en dissolvant 1 g d'amidol (2,4 diaminophénol) dans 100 ml d'une solution aqueuse de sulfite de sodium anhydre à 20 %. Les tubes sont complétés à 15 ml et abandonnés à l'obscurité pendant 1 heure. Le dosage est alors effectué au photolorimètre à 725 nm. La courbe d'étalonnage est établie à l'aide de quantités variables de phosphore minéral anhydre ( $KH_2PO_4$ ).

### β) mesure de l'ADN

L'acide déoxyribonucléique est dosé selon la méthode de BURTON (1956) à l'aide du réactif à la diphénylamine. Dans des tubes à essais on verse 1 volume (1 à 2 ml) de la solution à doser en milieu  $\text{HClO}_4$  0,5 N et 2 volumes de réactif. La coloration se développe pendant 20 heures à 30°C. et à l'obscurité. La densité optique est mesurée au photocolorimètre à 600 nm. L'étalonnage est effectué à l'aide d'un ADN commercial.

Le réactif est obtenu en mélangeant 1,5 ml d'acide sulfurique concentré à une solution de diphénylamine à 1,5 % dans l'acide acétique ; il se conserve à l'obscurité. A 50 ml de ce réactif, il faut ajouter, au moment de l'emploi, 0,25 ml d'une solution aqueuse d'acétaldéhyde à 16 mg/ml.

### γ) mesure des protéines

Les protéines sont dosées selon la technique de LOWRY et Coll., (1951). Le principe est basé sur la détermination colorimétrique du complexe obtenu après réduction des protéines en présence du réactif phospho-tungstomolybdique de FOLIN et CIOCALTEU.

Le réactif se compose de plusieurs solutions :

- solution alcaline (a)

. carbonate de sodium anhydre	2 g
. tartrate de sodium et de potassium	0,02 g
. soude 0,1 N	Q.S.P. 100 ml

- solution cuivrique (b)

[ . sulfate de cuivre, 5 H <sub>2</sub> O	0,5 g
[ . acide sulfurique concentré	une goutte
[ . eau distillée	Q.S.P. 100 ml

- solution de FOLIN et CIOCALTEU

(réactif Merck, prêt à l'emploi)

A 1 ml d'une solution protéique, on ajoute 3 ml du réactif obtenu en mélangeant extemporanément 50 ml de la solution (a) et 1 ml de la solution (b). Après agitation, on laisse reposer 30 minutes à l'obscurité puis on ajoute 0,3 ml de réactif de FOLIN et CIOCALTEU dilué de moitié en agitant immédiatement. La densité optique des solutions obtenues est mesurée après 30 minutes à 750 nm. La courbe étalon, de 10 à 100 µg, est établie à partir d'une solution d'albumine de sérum de boeuf.

#### 4°) Détermination de l'activité ribonucléasique

Le principe consiste à suivre l'apparition de produits de dépolymérisation résultant de l'action d'un extrait enzymatique sur un substrat constitué par de l'acide ribonucléique (ARN de levure de boulanger, Sigma, type XI).

Le matériel végétal, préalablement congelé à l'azote liquide, est broyé dans un mortier en présence de sable lavé aux acides et d'une solution tampon (Tris-HCl 0,05 M de pH = 7,5 contenant 0,01 M de NaCl) à raison de 10 ml pour 5 fragments. Toutes les opérations sont effectuées à 4°C. Après centrifugation pendant 10 minutes à 3000 g, l'activité ribonucléasique est déterminée selon la méthode décrite par CWOZDZ (1973) qui a été adaptée aux tissus de feuilles d'endive. Le surnageant enzymatique (0,5 ml)

est incubé pendant 30 minutes à 37°C, en présence de 1,5 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M à pH = 5,0 et de 1 ml de substrat (solution d'ARN à 5 mg/ml dans du tampon acétate de sodium). La réaction est stoppée par l'addition de 1 ml d'une solution d'acétate d'uranyle à 0,75 % dans de l'acide trichloracétique. Les produits non dégradés sont précipités une heure dans un bain de glace (GRELLET et Coll., 1968) et éliminés par une centrifugation de 10 minutes à 20.000 g. Une fraction aliquote de 1 ml est prélevée du surnageant et diluée avec 7 ml d'eau distillée. La quantité des nucléotides acido-solubles est alors évaluée au spectrophotomètre à 260 nm.

L'activité enzymatique correspond à l'accroissement de densité optique entre l'essai et un témoin qui comprend tous les constituants du mélange réactionnel mais dans lequel la solution enzymatique n'est ajoutée qu'après l'incubation et après l'addition du mélange acétate d'uranyle-acide trichloracétique. On définit alors une unité enzymatique comme étant la quantité d'enzyme produisant une augmentation de densité optique de 0,1 à 260 nm pour une incubation de 30 minutes.

Les résultats sont exprimés en unités enzymatiques par mg de protéines contenues dans l'extrait (activité spécifique). Dans ce cas, le dosage des protéines est effectué sur la fraction de l'extrait qui n'a pas été utilisée pour la réaction enzymatique.

Les protéines sont d'abord précipitées par de l'acide trichloracétique dont la concentration dans le milieu sera de 5 %, puis centrifugées. Le culot est ensuite lavé deux fois par l'acide trichloracétique à 5 %, puis solubilisé par de la soude 1 N pendant 12 heures à 37°C. Après dilution par de l'eau distillée de manière à ce que la concentration finale en soude soit de 0,1 N, les protéines sont dosées par la méthode de LOWRY et Coll. (1951).

### 5°) Détermination de la composition ribonucléotidique

La solution d'ARN obtenue selon le procédé de GUINN a subi une hydrolyse par la potasse 0,3 N pendant 16 heures et comprend un mélange des 4 nucléotides 2' et 3' phosphates. Cette solution est acidifiée jusqu'à pH : 2 avec l'acide perchlorique 6 N à 0°C et le précipité de perchlorate de potassium est éliminé par centrifugation. Le surnageant, après neutralisation par la potasse et élimination du perchlorate, est réduit par évaporation sous vide puis amené à une concentration en HCl de 0,05 N.

Des parties aliquotes de 0,5 à 1 ml sont alors analysées selon la méthode de KATZ et COMB (1963). L'échantillon est déposé au sommet d'une colonne (0,9 cm de diamètre x 5 cm de hauteur) de résine cationique Dowex 50 x 4 (200 - 400 mesh) sous forme  $H^+$  équilibrée par HCl 0,05 N. La séparation des nucléotides est réalisée par le passage d'acide chlorhydrique 0,05 N pour l'acide uridylique et par l'eau distillée pour les autres nucléotides ; l'acide guanylique précède les acides adénylique et cytidylique qui sont élués ensemble. Une bonne résolution nécessite le dépôt de volumes inférieurs ou voisins de 1 ml, pour une quantité de ribonucléotides comprise entre 5 et 15 unités de densité optique. De plus, l'écoulement ne doit pas être supérieur à 1 ml/minute. L'élution des différentes fractions est suivie à l'aide d'un dispositif enregistreur Gilson (à 265 nm). Les nucléotides sont déterminés quantitativement par leur absorption en spectrophotométrie à 260 nm (UMP) et à 257 nm (GMP). Par ailleurs, un système d'équations, basé sur les propriétés particulières d'absorption des acides cytidylique et adénylique à 279 nm et à 257 nm respectivement, permet de définir la densité optique propre à chacun des constituants. En utilisant les coefficients d'extinction molaire des différents nucléotides cités par KATZ et COMB, les résultats seront exprimés en  $\mu$ moles de nucléotides pour 100  $\mu$ moles du mélange.

L'incorporation d'éléments radioactifs rend toutefois nécessaire la séparation des acides adénylique et cytidylique afin de déterminer la radioactivité propre à chacun d'eux. Dans ce cas, le mélange des deux nucléotides, en solution dans l'eau, est passé directement sur une petite colonne (0,9 cm de diamètre x 1 cm de hauteur) de résine Dowex 1 x 8 (200 - 400 mesh) sous forme formiate. La séparation est effectuée en passant de l'acide formique 0,05 N pour l'acide cytidylique et 0,4 N pour l'acide adénylique. On peut alors mesurer directement l'absorbance à 279 nm (CMP) et à 257 nm (AMP) ainsi que la radioactivité de chacune des fractions.

Contrairement aux autres méthodes basées sur l'utilisation de colonnes de résines échangeuses d'ions, la méthode de KATZ et COMB permet de séparer rapidement de petites quantités de nucléotides. Toutefois, une anomalie risque de se produire et consiste, comme le signale KATZ et COMB, en une radioactivité souvent excessive de la fraction UMP. Ceci serait dû à de petites quantités de polyphosphates-<sup>32</sup>P très radioactifs qui passent à travers la résine en même temps que l'acide uridylique. Afin de supprimer les possibilités d'erreurs dues à de telles interférences, nous avons passé nos extraits sur une colonne de charbon (BROWN, 1962 ; SHORT et Coll., 1969).

La solution de ribonucléotides neutralisée puis ajustée à un pH compris entre 3,5 et 4 avec de l'acide acétique est passée lentement sur une colonne (1,2 cm de diamètre) contenant un mélange de 250 mg de charbon Norit et de 400 mg de Celite Hyflo Supercel (Touzart et Matignon). La colonne est alors lavée avec de l'eau distillée jusqu'à ce que l'effluent soit à pH neutre. L'élution des nucléotides est ensuite réalisée à l'aide d'une solution d'éthanol à 25 % contenant 0,5 % (v/v) d'ammoniaque aqueux (d = 0,88). Il faut veiller essentiellement à ce que la colonne ne soit jamais à sec et que l'écoulement ne dépasse pas 0,1 ml/minute. L'éluat (25 ml environ) est évaporé à sec et les ribonucléotides dissous dans HCl 0,1 N sont ensuite amenés à

une concentration en HCl de 0,05 N avant d'être passés sur résines échangeuses d'ions. A partir d'un mélange témoin des quatre mononucléotides, nous avons pu vérifier que, dans ces conditions expérimentales, les pertes sont négligeables.

6°) Incorporation de précurseurs radioactifs et mesure de la radioactivité

a) incorporation de précurseurs radioactifs dans les acides nucléiques

Afin de déterminer les modalités d'incorporation de précurseurs radioactifs, nous avons choisi de suivre l'incorporation d'uracile-<sup>14</sup>C dans l'ARN. Le protocole expérimental est le suivant :

les explantats, sortis des tubes à culture, sont mis à incuber en présence d'uracile-<sup>14</sup>C (activité spécifique 42 mCi/mM) à la concentration de 1 µCi/ml dans la solution nutritive. L'incubation est réalisée à la lumière et à 22°C dans des boîtes de Pétri stériles ; chacune d'entr'elles contenant 19 fragments mis à tremper dans 10 ml de la solution radioactive. La présence de contaminations bactériennes étant une source non négligeable d'erreurs, toutes les opérations sont réalisées en conditions aseptiques. Après des temps d'incubation échelonnés de 30 minutes à 10 heures, les explantats, à raison de 12 par conditions, sont prélevés, rincés abondamment à l'eau, séchés puis congelés par immersion dans l'azote liquide. L'ARN est ensuite extrait, dosé et la radioactivité spécifique (en c.p.m/µg d'ARN) est déterminée.

L'activité spécifique augmente progressivement avec la durée de l'incubation mais la courbe (figure 6) fait apparaître deux phases distinctes. Pour des périodes d'incubation inférieures à 4 heures, l'activité spécifique de l'ARN ne croit que lentement alors qu'au delà de 4 heures, on note une augmentation beaucoup plus rapide.

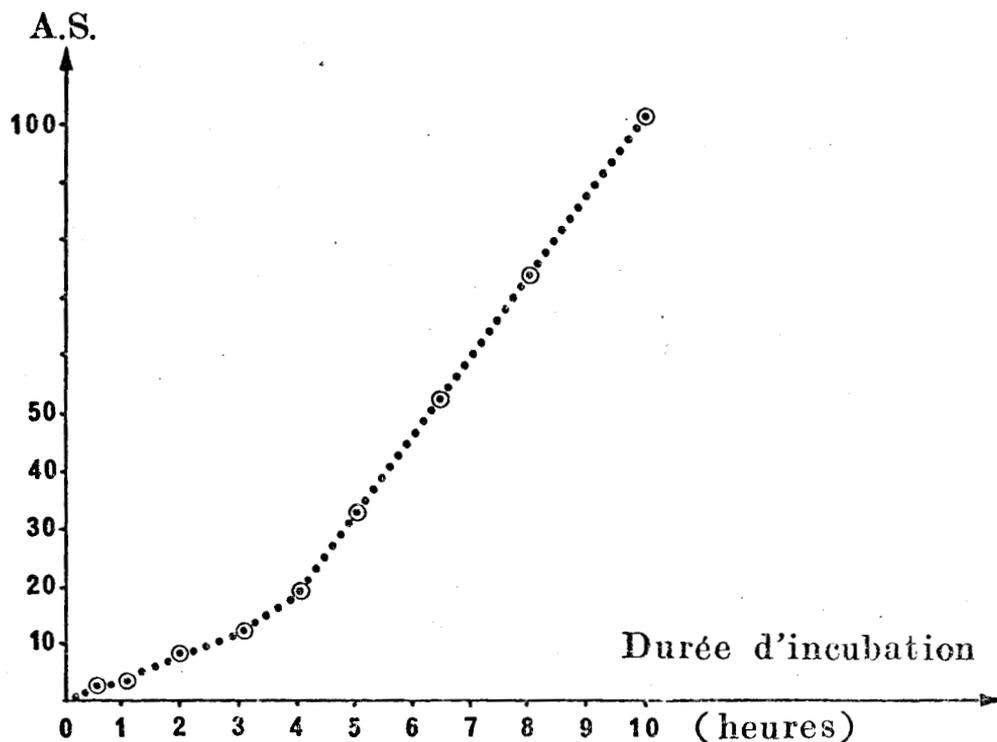


Figure 6 : Incorporation d'uracile- $^{14}\text{C}$  dans l'ARN de fragments de feuilles d'endive.

Les explantats sont incubés dans la solution d'uracile- $^{14}\text{C}$  (42 mCi/mM) à la concentration de  $1\mu\text{Ci/ml}$  pendant des temps variés. L'activité spécifique (A.S.) de l'ARN est exprimée en c.p.m./ $\mu\text{g}$  d'ARN.

Les résultats obtenus lors de la première période sont assez irréguliers ; en dehors du traumatisme créé par l'excision qui engendre probablement de fortes perturbations métaboliques, l'incorporation de l'élément radioactif dans l'ARN peut dépendre de sa vitesse de pénétration dans les tissus et/ou de la nécessité de la saturation d'un "pool" nucléotidique intratissulaire. Au cours de la seconde période par contre, l'incorporation du précurseur augmente proportionnellement à la durée de l'incubation. Compte tenu de ces observations, nous avons choisi de laisser incuber les tissus dans les solutions radioactives pendant 5 heures. Outre l'uracile- $^{14}\text{C}$ , nous avons employé d'autres précurseurs radioactifs dont les conditions d'utilisation sont généralement celles qui viennent décrites et qui seront, de toute manière, précisées dans le texte.

## b) évaluation de la radioactivité incorporée

Pour évaluer la radioactivité des solutions, des parties aliquotes (0,5 à 1 ml) sont mélangées à 15 ml de milieu de scintillation constitué par : 0,3 g de POPOP, 5 g de PPO et 100 g de naphthalène par litre de dioxane. Nous avons également utilisé de l'Instagel (Packard) qui présente l'avantage de pouvoir être mélangé à un plus grand volume de solution aqueuse. De plus, le comptage du  $^{32}\text{P}$  est souvent réalisé par effet CERENKOV (CLAUSEN, 1968 ; LAUCHLI, 1969 ; HAVILLAND et BIEBER, 1970) : dans ce cas, on mélange 1 ml de la solution à tester avec 10 ml d'eau désionisée.

Il est parfois nécessaire de précipiter les macromolécules avant d'en évaluer la radioactivité. On ajoute alors aux échantillons d'ARN, 100 µg/ml de sérum albumine bovine et un volume égal d'une solution glacée d'acide trichloracétique à 10 %. Après 15 minutes dans la glace, le précipité est filtré sur membrane "Millipore" (HAWP) de 0,45µ puis lavé par une solution d'acide trichloracétique à 5 %. Le filtre est ensuite séché et la radioactivité déterminée. Le milieu de scintillation utilisé comprend : 0,3 g de POPOP et 5 g de PPO par litre de toluène.

La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Intertechnique "ABAC" SL 40). Après soustraction du mouvement propre de l'appareil, les résultats sont donnés en nombre de coups par minute (c.p.m.).

## 7°) Extraction et fractionnement des différentes catégories d'ARN

### a) extraction des ARN

Si la présence de la paroi squelettique peut rendre malaisé l'obtention de différentes fractions cellulaires, il est toutefois assez facile d'obtenir des préparations d'ARN cytoplasmiques et d'ARN nucléaires en pratiquant une extraction thermique différentielle. L'extraction au phénol à

4°C, selon la méthode de KIRBY (1965), libère les ARN cytoplasmiques. Le traitement ultérieur de l'interphase riche en noyaux par le phénol à 60°C provoque leur éclatement et la libération des ARN nucléaires. Cette méthode au phénol chaud, décrite pour la première fois par SCHERRER et DARNELL (1962), a été modifiée par addition de chloroforme (PENMAN, 1966), ce qui permet de récupérer convenablement l'ARN messager (PERRY et Coll., 1972). Toutefois, afin de diminuer les phénomènes d'agrégation, l'extraction est réalisée à 55°C (WAGNER et Coll., 1967).

Les fragments de feuilles (100 en général, représentant 70 à 80 grammes de matière fraîche) sont congelés dans de l'azote liquide puis broyés au mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. On ajoute alors, par gramme de matière fraîche :

- 1 ml de tampon A	}	Tris-HCl 20 mM ; pH = 7,2
		NaCl 10 mM
		Acétate de magnésium 3 mM
		Macaloïde 0,2 %

et

- 1 ml de solution B	}	Phénol distillé 100 g
		8 - Hydroxyquinoléine 0,1 g
		Méta - Crésol 14 g
		Lauryl-sulfate de sodium 0,5 %
		Tampon A 25 ml

Le tout est homogénéisé trois fois pendant 15 secondes à 15000 tr/min. à l'aide de l'appareil "Ultra Turrax" et à 4°C. Entre chaque opération, le mélange est placé pendant deux minutes dans la glace. L'observation au microscope optique montre que dans ces conditions, il y a éclatement des cellules. La phase phénolique est éliminée par centrifugation. La phase

aqueuse, l'interphase et le culot sont alors agités 15 minutes à 4°C avec un volume égal de solution phénolique B. Le mélange est centrifugé et les opérations sont répétées deux fois. Il en résulte une phase aqueuse qui contient les acides nucléiques "extraits à froid". A cette fraction, on ajoute le lavage de l'interphase résiduelle et du culot provenant de la troisième déprotéinisation par la solution phénolique. Le lavage est effectué à deux reprises à l'aide de la solution C composée de :

{ Tampon acétate de sodium 10 mM ; pH = 5,4  
 { Acétate Mg 0,1 mM  
 { Polyvinyl sulfaté de potassium 50 µg/ml.

Le culot est alors mis en suspension dans 1 ml (par gramme de tissu frais) de chacune des solutions B et C. L'ensemble est agité 3 minutes à 55°C puis refroidi brutalement par immersion dans un mélange méthanol-glace. Après centrifugation, la phase phénolique est éliminée. La phase aqueuse, le culot et l'interphase sont traités pendant 3 minutes à 55°C avec un égal volume de chloroforme contenant 1 % d'alcool isoamylique. La phase aqueuse recueillie contient les acides nucléiques "extraits à chaud".

Ce protocole expérimental a été réalisé avec succès pour la séparation d'ARN d'origines différentes à partir de racines de lentille (TEISSERE, 1974) et de suspensions cellulaires d'érable (MIASSOD, 1974). Nous l'avons aussi employé pour analyser les acides nucléiques d'une suspension cellulaire de silène (RAMBOUR et Coll., 1977 ; VASSEUR et RAMBOUR, 1977). Toutefois, dans le cas des tissus d'endive, la quantité d'acide nucléique fournie par l'extraction "à chaud" est tellement faible (environ 2 % de la radioactivité totale) qu'elle est inutilisable pour des analyses ultérieures. Nous avons donc réuni les deux types d'extraits qui seront analysés ensemble ; mais pour ne pas être amené à extraire la totalité des acides nucléiques à la température de 55°C, nous avons préféré conserver les deux étapes successives de l'extraction.

Les acides nucléiques rassemblés et amenés à la concentration de 0,15 M en acétate de sodium, sont précipités par 2 volumes d'alcool absolu à  $-20^{\circ}\text{C}$ , pendant une nuit. Ils sont alors lavés à deux reprises par un mélange d'alcool à  $70^{\circ}\text{C}$  et d'acétate de sodium (150 mM) pour éliminer les traces de phénol qui pourraient subsister. On les dissout ensuite dans une solution tamponnée de Tris-HCl 10 mM, pH = 7,6 contenant 10 mM d'E D T A puis on les précipite à nouveau. Ces opérations de dissolution-précipitation, effectuées à  $4^{\circ}\text{C}$ , sont renouvelées jusqu'à ce que la radioactivité d'une partie aliquote, précipitée par l'acide trichloracétique (concentration finale : 5 %), demeure constante. Les acides nucléiques dissous dans une solution tampon pH = 7,2 (Tris-HCl 20 mM, NaCl 10 mM, Acétate Mg 5 mM), sont alors traités par la désoxyribonucléase I (Boehringer Mannheim, réf. 15.469 ; exempte d'activité ribonucléasique) à  $4^{\circ}\text{C}$  pendant 30 minutes, à raison de 5  $\mu\text{g}$  pour 100  $\mu\text{g}$  d'acides nucléiques. Les solutions d'ARN sont déprotéinisées par adjonction d'un volume égal du mélange chloroforme-alcool isoamylique (1 %). Après agitation et centrifugation, on répète les opérations de déprotéinisation sur la phase aqueuse isolée jusqu'à disparition de l'interphase constituée de protéines dénaturées. Les ARN sont ensuite précipités, en présence d'acétate de sodium, par l'alcool absolu à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### b) fractionnement des ARN sur colonne de MAK

Nous avons employé la méthode de chromatographie sur colonne de sérum-albumine adsorbée sur Kieselgühr (MAK = methylated albumin Kieselgühr) essentiellement pour deux raisons. La première, est que cette méthode est liée à la mise en évidence des ARN messagers des tissus de plantes et que beaucoup d'ARN à marquage rapide peuvent être retenus par la colonne qui favorise ainsi leur isolement. La seconde est d'ordre purement technique. Nous avons déjà signalé, en effet, que les solutions d'ARN obtenues sont contaminées par des composés polyphénoliques vraisemblablement liés aux ARN et qui sont pré-

cipités avec eux en présence d'alcool. Après plusieurs essais de purification dont certains sont restés infructueux alors que d'autres, obtenus en particulier à l'aide de colonnes de Sephadex G x 50 (Raafat El-Gewely et Tyson, 1974), ont permis d'éliminer une partie des contaminants, nous avons choisi d'utiliser les colonnes de MAK. Dans ces conditions, les substances colorées restent fixées sur la colonne et ne perturbent pas les mesures, en lumière ultraviolette, des différentes fractions recueillies.

Les colonnes de MAK sont préparées, selon la technique de MANDELL et HERSHEY (1960), simplifiée par SUEOKA et CHENG (1962) ; nous l'avons adaptée aux faibles quantités de matériel dont nous disposions.

#### *α) préparation de l'albumine méthylée*

On met en suspension 1 gramme d'albumine (fraction V ; N.B.C.) dans 100 ml d'alcool méthylique absolu et on ajoute 0,84 ml d'acide chlorhydrique 12 N. L'albumine se dissout puis précipite après un certain temps. Le mélange est incubé à 37°C, à l'obscurité, pendant 5 jours en agitant de temps en temps (HAYASHI et Coll., 1963). Il se forme alors un précipité blanc gélatineux que l'on centrifuge 15 minutes à 1.000 tr/min. On le lave deux fois avec du méthanol, puis avec de l'éther, jusqu'à ce que le surnageant soit neutre (2 à 3 lavages environ). Le précipité devenu granuleux est desséché sous vide en présence de KOH. Il sera utilisé en solution dans l'eau ; forme sous laquelle le produit est stable.

#### *β) préparation de la colonne de MAK*

On mélange 5 grammes de Kieselgühr à 25 ml de tampon phosphate de sodium (0,05 M ; pH = 6,7) contenant 100 mM de NaCl et 1,5 ml de la solution à 1 % d'albumine méthylée. Le mélange est agité doucement à 4°C par un agitateur magnétique pendant plusieurs heures, puis versé dans une colonne à double enveloppe de 1 cm de diamètre à la base de laquelle on a mis un

tampon de coton de verre surmonté d'une couche de cellulose. La partie supérieure de l'albumine méthylée est alors stabilisée par une nouvelle couche de poudre de cellulose, puis on lave avec 200 ml de tampon phosphate-NaCl 0,4 M à la vitesse d'environ 30 ml/heure pour équilibrer la colonne aux conditions de départ du gradient d'élution et éliminer l'excès d'albumine méthylée. Celle-ci peut être détectée par son spectre d'absorption, qui présente un maximum à 276 nm et un minimum à 250 nm. Lorsque l'absorption devient nulle, la colonne est prête à l'emploi et on peut la conserver sans altération sous cette forme quelques jours à 4°C.

### *γ) dépôt de l'échantillon et élution*

L'ARN à étudier (0,5 à 1 mg) est dissout dans le même tampon phosphate - NaCl 0,4 M et il est déposé au sommet de la colonne. L'élution est réalisée à 20°C par un gradient linéaire de NaCl 0,4 M (50 ml) à 1,2 M (50 ml) en solution dans le tampon phosphate de sodium (0,05 M ; pH = 6,7) contenant 1 mM d'E D T A. Le débit étant réglé à environ 30 ml/heure, on recueille des fractions de 1,5 ml dont 300 µl serviront à déterminer le taux de radioactivité et le reste à mesurer l'absorption dans l'ultraviolet à 260 nm.

Après le passage de la solution saline la plus concentrée, la colonne est lavée avec 20 ml de tampon phosphate sans chlorure de sodium, les ARN qui restent liés à l'albumine méthylée sont alors élués à la température de 70°C (ELLEM, 1966) par le même tampon, contenant 2 % de SDS et 1 mM d'EDTA. Des parties aliquotes des différentes fractions servent à déterminer la radioactivité soit directement, soit après précipitation des ARN par l'acide trichloracétique (concentration finale 5 %) à 0°C pendant 1 heure et filtration sur membrane "Millipore" (0,45 µ).

### 8°) Recherche d'ARN polyadénylés

Afin de choisir une méthode qui permette d'isoler spécifiquement des ARN liés à des séquences polyadényliques, nous en avons essayé plusieurs, parmi lesquelles : la filtration sélective sur filtre de nitrocellulose ("Millipore" HAWP ; 0,45  $\mu$ ) selon LEE et Coll.(1971), PHILIPSON et Coll.(1971), BRAWERMAN et Coll. (1972) ainsi que la liaison sur filtre GF/C - poly (U). Dans ce dernier cas, l'ARN polyadénylé est hybridé à l'acide polyuridylique fixé sur la membrane "Whatman" par irradiation ultra-violette (SHELDON et Coll., 1972 ; WEINBERG et Coll., 1972). Ces méthodes nécessitent toutes deux un tampon de liaison de force ionique élevée (KCl de 300 à 500 mM) et présentent certains inconvénients. Tout d'abord la capacité de fixation dépend en grande partie de la vitesse de passage de la solution à travers la membrane. Ensuite, on peut observer des phénomènes de rétention non spécifiques provenant de matériel absorbant en lumière ultra-violette, en particulier de petites quantités d'ARN ribosomal (BRAWERMAN et Coll., 1972). Enfin, par suite des résultats trop variables qu'elles fournissent, nous avons renoncé à ces méthodes. Nous avons alors essayé d'isoler les molécules polyadénylées par chromatographie d'affinité sur colonne de cellulose-oligo (d T) (EDMONDS et CAMELA, 1969 ; AVIV et LEDER, 1972 ; RHOADS, 1975) et sur colonne de sépharose-poly (U) (LINDBERG et PERSSON, 1972 ; ADESNIK et Coll., 1972). Les résultats, sensiblement identiques dans les deux cas, furent très satisfaisants. Pour cette étude, nous avons alors utilisé le sépharose-poly (U) ; méthode qui exploite l'hybridation sélective entre l'acide polyuridylique immobilisé sur le sépharose et la séquence polyadénylique complémentaire qui fait partie de la molécule d'ARN messager.

Le sépharose-poly (U) (4 B ; Pharmacia) est d'abord mis à gonfler (300 mg) dans une solution tampon de Tris à pH = 7,6 contenant 1 M/l de NaCl. Il est ensuite introduit dans une colonne à double enveloppe de 5 mm

de diamètre puis lavé par une solution tamponnée (pH = 7,6) contenant 10 mM de Tris, 100 mM de NaCl, 10 mM d'EDTA et 0,2 % de SDS. Les acides nucléiques, en solution dans ce même tampon (1 ml) sont déposés au sommet de la colonne maintenue à 20°C. Après le passage de l'extrait, la colonne est lavée progressivement par 20 ml du tampon de liaison mais dès le 15e ml, il n'y a plus d'éléments décelables, par leur densité optique ou leur radioactivité, à la sortie des colonnes. Cette fraction non retenue est donc constituée de molécules qui n'ont pas d'affinité pour le sépharose-poly (U). La température est alors amenée à 50°C (ESNAULT et Coll., 1975) et l'élution est effectuée par 10 ml de la solution précédente sans NaCl.

E

E

E

PREMIERE PARTIE

---

FORMATION DES BOURGEONS

EN FONCTION DE

CRITERES PHYSIOLOGIQUES

# CHAPITRE 1

## CONDITIONS D'UTILISATION

### DES DISQUES DE FEUILLES COMME

### TEST DE BOURGEONNEMENT

Cultivés "in vitro" sur le milieu préconisé par GAUTHERET, les fragments de feuilles d'endive donnent d'abord naissance à de petites pustules blanchâtres au niveau des nervures puis, par suite de la prolifération cellulaire, les mamelons grossissent et se soudent pour former un cal unique, homogène, toujours localisé à la partie basale des explantats. Les régions apicales et latérales ne manifestent aucun phénomène apparent de prolifération. Comme les organes prennent naissance au niveau du cal, la croissance et le développement des explantats sont donc nettement polarisés. Toutefois, cette polarité n'est pas absolue car un certain nombre de bourgeons peuvent prendre naissance dans la région apicale des explantats.

Dans les expériences qui vont suivre, les fragments sont placés horizontalement, la face ventrale ou interne, au contact du milieu de culture.

## A) PRELEVEMENT ET CULTURE DES EXPLANTATS

Dès le début de nos expériences, nous avons enregistré une grande variabilité des résultats obtenus sur des milieux de culture de composition identique. Il nous a donc fallu préciser l'influence exercée par des facteurs tels que : le stade de développement des bourgeons étiolés utilisés, le lieu de prélèvement des explantats ainsi que leur taille et leur mode d'ensemencement.

### 1°) Le stade de développement des bourgeons étiolés

Les feuilles externes du bourgeon d'endive parvenues à maturité ont une vingtaine de centimètres de longueur. Pour avoir des tissus plus jeunes, nous avons utilisé des bourgeons étiolés avant leur développement complet, lorsque les feuilles les plus grandes atteignent respectivement 5 et 10 cm. Nous avons alors comparé leurs propriétés organogènes à celles des feuilles de 20 cm de longueur. Dans tous les cas, des disques de 16 mm de diamètre sont prélevés au niveau de la nervure principale et dans la partie médiane des feuilles moyennes.

Les explantats prolifèrent d'autant mieux et produisent d'autant plus d'organes qu'ils sont issus de bourgeons étiolés plus petits (Tableau 2).

TAILLE DES BOURGEONS ETIOLES	NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS/EXPLANTAT	% D'EXPLANTATS		% DE BOURGEONS A L'APEX
		CAPABLES DE PROLIFERER	ORGANOGENES	
20 cm	2,32	86,4	67,1	20,5
10 cm	2,88	88,6	70,3	24,8
5 cm	3,99	95,4	78,9	31,6

TABLEAU 2 : Nombre de bourgeons néoformés par des fragments prélevés au milieu de feuilles moyennes de bourgeons étiolés de tailles différentes.

Les explantats sont déposés la face ventrale au contact du milieu de culture.

Parallèlement, il y a davantage de bourgeons qui apparaissent à la partie apicale des explantats. Les capacités de prolifération et d'organogenèse sont donc plus importantes sur les tissus jeunes.

On pouvait se demander s'il existait des variations semblables au sein d'un même bourgeon d'endive, en fonction du lieu de prélèvement des explantats.

## 2°) Le lieu de prélèvement des explantats

L'endive possède des feuilles régulièrement imbriquées, se recouvrant partiellement par verticille de trois. Cette disposition nous a permis de les prélever une à une en suivant leur ordre d'insertion. Nous les avons réparties en trois catégories : les feuilles externes, moyennes et centrales. Des explantats de 16 mm sont prélevés d'une part sur les feuilles moyennes dans la région basale (1), intermédiaire (2) ou apicale (3) et d'autre part en position intermédiaire sur les feuilles externes (E), moyennes (M) ou centrales (C).

Le nombre des bourgeons néoformés par les fragments prélevés sur les feuilles externes (E) est faible, il augmente considérablement (Tableau 3) en passant aux feuilles moyennes (M) puis à celles du centre (C). Il en est de même quoique de manière moins nette de la base (1) au sommet (3) des feuilles moyennes. De plus, la proportion des bourgeons qui apparaissent dans la région apicale des explantats est plus élevée sur les fragments issus du sommet des feuilles et sur ceux qui proviennent des plus jeunes feuilles du centre.

L'étude de la néoformation des racines (Tableau 4) fournit des résultats identiques. Dans ce cas cependant, étant donné le petit nombre de racines obtenues sur le milieu de base habituel, nous avons ajouté aux milieux de l'auxine à la concentration de  $10^{-6}$  M. Il faut toutefois noter qu'aucune racine n'apparaît dans la région apicale des explantats.

LIEU DE PRELEVEMENT DES EXPLANTATS	NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS/EXPLANTAT	% D'EXPLANTATS		% DE BOURGEONS A L'APEX	
		CAPABLES DE PROLIFERER	ORGANOGENES		
E	1,21	44,1	29,2	16,7	
M	1	1,46	52,7	41,8	22,2
	2	2,25	80,4	71,1	23,3
	3	2,71	89,2	78,7	28,6
C	3,83	99,6	84,3	32,8	

TABLEAU 3 : Influence du lieu de prélèvement des explantats sur la néoformation de bourgeons.

Les prélèvements sont effectués sur des feuilles externes (E), moyennes (M) ou centrales (C), ainsi que dans la région basale (1) moyenne (2) ou apicale (3) de la feuille. Les explantats sont déposés la face ventrale au contact du milieu de culture.

LIEU DE PRELEVEMENT DES EXPLANTATS	NOMBRE MOYEN DE RACINES/EXPLANTAT	% DE FRAGMENTS CAPABLES DE PROLIFERER	% DE RACINES A L'APEX	
E	0,70	40,9	0	
M	1	1,90	53,0	0
	2	2,75	78,3	0
	3	3,10	91,0	0
C	4,30	100,0	0	

TABLEAU 4 : Influence du lieu de prélèvement des explantats sur la néoformation de racines.

Les prélèvements sont effectués sur des feuilles externes (E), moyennes (M) ou centrales (C), ainsi que dans la région basale (1), moyenne (2) ou apicale (3) de la feuille. Les fragments sont ensemencés la face ventrale au contact du milieu nutritif qui est additionné d'acide indolyl-acétique ( $10^{-6}$  M/l).



Nous avons également montré (BOURIQUET et VASSEUR, 1973) que la néoformation des boutons inflorescentiels obéit aux mêmes règles.

Les fragments prélevés d'une part sur les feuilles du centre et d'autre part à l'apex des feuilles les plus externes possèdent donc la plus grande aptitude à se développer en culture "in vitro". Ces tissus semblent moins différenciés et possèdent une aptitude à proliférer plus intense. De plus, si l'on compare les tissus des feuillés centrales (C ; Tableau 3) des bourgeons arrivés à maturité à ceux issus des feuilles moyennes des plus petits bourgeons étiolés (5 cm ; Tableau 2), on constate que leurs capacités organogénétiques sont sensiblement identiques.

### 3°) La taille des explantats

Afin d'examiner l'influence de la taille des explantats sur la néoformation des bourgeons, nous avons prélevé au trocart des explantats de 4 mm à 20 mm de diamètre.

L'intensité de la prolifération cellulaire et du bourgeonnement (Tableau 5) augmentent parallèlement à la taille des explantats qui joue également un rôle dans la vigueur des néoformations : les fragments de grande taille portent les bourgeons aux feuilles les plus développées.

Cependant, les résultats obtenus avec des fragments de 4 mm de diamètre sont très variables. Plus de 40 % d'entr'eux sont incapables de se développer et se nécrosent alors que les autres ne présentent que quelques bourgeons issus d'un cal à peine visible, situé toutefois exclusivement à la partie basale. Comme DUHAMET (1953, 1955) l'avait déjà remarqué, la prolifération des explantats de petite taille est caractérisée par une grande variabilité.

Pour vérifier si l'augmentation du nombre des bourgeons était en rapport direct avec le diamètre des explantats ou si l'importance du cal

DIAMETRE DES EXPLANTATS (en mm)	NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS/ EXPLANTAT	% D'EXPLANTATS		% DE BOURGEONS A L'APEX	NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS PAR CM DE PERIMETRE
		CAPABLES DE PROLIFERER	ORGANOGENES		
20	2,90	83,3	83,3	11,6	0,46
18	2,50	85,9	75,2	20,9	0,44
16	2,25	85,1	74,3	21,5	0,44
14	2,15	82,3	70,4	21,4	0,48
12	2,10	76,2	69,8	23,1	0,55
10	1,95	77,5	67,5	25,7	0,62
08	1,80	75,0	65,0	26,4	0,71
06	1,85	70,7	57,7	26,3	0,98
04	0,85	58,3	29,2	37,5	0,66

TABLEAU 5 : Influence du diamètre des explantats sur la néoformation de bourgeons.

Les fragments de feuilles sont ensemencés, la face ventrale au contact du milieu de culture.

était prépondérante, nous avons calculé le nombre moyen de bourgeons pour 1 cm de périmètre. Nous observons alors que la densité des bourgeons diminue lorsque le périmètre augmente. Cela peut provenir du fait que l'importance du cal et corrélativement le nombre des bourgeons, augmente moins vite que l'importance des parties latérales pratiquement inactives.

Le nombre des bourgeons néoformés s'accroît donc lorsque le diamètre des explantats augmente. De plus, comme la prolifération cellulaire évolue dans le même sens, les deux phénomènes semblent étroitement liés. Dans le même temps, le pourcentage des bourgeons qui apparaissent à la partie apicale diminue.

A la suite de ces résultats, nous avons choisi d'utiliser des disques de feuilles de 16 mm de diamètre.

4°) Le mode d'ensemencement

Les explantats peuvent être posés la face ventrale (V) au contact du milieu de culture comme dans les expériences précédentes, mais ils peuvent également être à demi enfoncés dans le milieu de culture : soit par leur partie basale (ensemencement en sens normal, N) soit par leur partie apicale (ensemencement en sens inverse, I).

Lorsque les explantats sont placés horizontalement (V), on constate que 78,5 % des bourgeons apparaissent à la partie basale (Tableau 6). Par contre, si l'ensemencement est réalisé dans le sens normal (N), le cal se forme alors dans le milieu de culture et seulement 58,7 % des bourgeons naissent à ce niveau. Au contraire, si l'ensemencement est réalisé dans le sens inverse (I), la plupart des bourgeons apparaissent sur le cal qui est situé hors du milieu de culture. Le milieu aqueux exerce donc une action inhibitrice qui se manifeste non seulement sur la répartition des bourgeons mais encore en diminuant leur nombre.

Pour que la polarité puisse s'exprimer librement, il est nécessaire de placer les explantats horizontalement à la surface du milieu. Toutefois, dans ce cas, nous avons observé parfois des résultats assez irréguliers, dus

MODE D'ENSEMENCEMENT	NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS/EXPLANTAT	% D'EXPLANTATS		% DE BOURGEONS	
		CAPABLES DE PROLIFERER	ORGANOGENES	A L'APEX	A LA BASE
V	2,05	76,9	66,4	21,5	78,5
N	1,73	78,7	70,9	41,3	58,7
I	2,25	82,1	76,4	3,6	96,4

TABLEAU 6 : Influence du mode d'ensemencement sur les phénomènes d'organogenèse manifestés par des fragments de feuilles :

V : fragments ensemencés horizontalement : la face ventrale repose sur le milieu de culture

N : fragments dont la partie basale plonge dans le milieu de culture (sens normal par rapport à l'orientation sur la feuille entière)

I : fragment dont la partie apicale plonge dans le milieu de culture (sens inverse par rapport à l'orientation sur la feuille entière)

sans doute à la forme des explantats qui ne leur permet pas de reposer par toute leur surface sur le milieu de culture ; ce qui, avec l'épiderme, peut ralentir l'absorption de l'eau et des substances dissoutes. Les fragments ensemencés la face ventrale au contact du milieu nécessitent l'utilisation de concentrations dix fois plus élevées en substances de croissance que celles exigées par les explantats ensemencés en sens normal. De plus, nous pensons qu'il est préférable que les facteurs de croissance agissent directement à l'endroit où les organes sont néoformés c'est-à-dire au niveau du cal. Pour étudier l'action de substances stimulantes ou inhibitrices sur la formation des bourgeons, nous avons donc préféré ensemencer les explantats en sens normal. La mise en culture des fragments en sens inverse est certes la plus favorable à la prolifération et à l'organogenèse mais elle implique un transport des substances de la partie apicale qui plonge dans le milieu de culture vers la partie basale où prendront naissance les organes. Or, nous

avons vu (VASSEUR et BOURIQUET, 1969) que des substances comme l'hydrazide maléique sont difficilement transportées au sein des tissus.

Pour toutes ces raisons, nous avons choisi d'ensemencer les disques de feuilles soit horizontalement, pour étudier les phénomènes de polarité, soit dans le sens normal, pour analyser l'action de différentes substances de croissance.

## B) MILIEU DE CULTURE

Le milieu nutritif de base utilisé dans les expériences précédentes comprend du glucose (3 %), de la gélose (9 %) et les éléments minéraux de la solution de KNOP diluée au demi. Nous étudierons ici l'influence exercée par chacun de ces constituants.

### 1°) Le glucose

Les fragments de feuilles sont capables de produire des bourgeons en l'absence de glucose ; toutefois, leur nombre est restreint et leur taille réduite. Dans de telles conditions, les explantats prolifèrent mal et les cals demeurent à l'état de petites pustules. Lorsque le taux de glucose augmente (Tableau 7) la prolifération cellulaire et l'organogenèse augmentent parallèlement jusqu'à la concentration de 3 % qui s'avère optimale. Au-delà, le nombre de bourgeons diminue rapidement et la prolifération se ralentit ; l'inhibition est importante à partir de 6 % et totale après 8 %. Le pourcentage des bourgeons apicaux évolue de la même manière.

GLUCOSE (en %)	NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS PAR EXPLANTAT	% D'EXPLANTATS		% DE BOURGEONS APICAUX
		CAPABLES DE PROLIFERER	ORGANOGENES	
0	0,72	36,3	22,7	8,1
1	0,94	58,5	30,2	11,9
2	1,29	64,9	48,1	16,7
3	1,96	87,8	75,6	23,9
4	1,78	77,3	64,7	20,2
5	1,18	70,2	54,1	13,2
6	0,91	68,3	42,0	10,6
7	0,25	10,0	10,0	4,0
8	0,13	6,1	6,1	0
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0

TABEAU 7 : Influence de la concentration en glucose sur la néoformation des bourgeons.

Les fragments sontensemencés la face ventrale au contact d'un milieu de culture composé des éléments minéraux de la solution de KNOP diluée au demi et de gélose (9 %).



2°) La gélose

Les explantats sont placés la face ventrale au contact soit d'un milieu de concentration variable en gélose, soit de papier filtre sans cendres trempant dans la solution nutritive selon la méthode de Heller (1949). A part la gélose, la composition du milieu est la même dans tous les cas.

La néoformation des bourgeons est optimale pour une concentration en gélose de 9 ‰ (Tableau 8). Il y a ensuite, de part et d'autre de cette

GELOSE (en ‰)	NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS PAR EXPLANTAT	% D'EXPLANTATS		% DE BOURGEONS A L'APEX
		CAPABLES DE PROLIFERER	ORGANOGENES	
0	1,12	60,4	41,6	9,8
6	1,50	65,0	54,5	10,7
7	1,65	70,6	59,0	13,6
8	1,91	78,8	64,1	21,2
9	2,37	81,7	72,8	22,0
10	1,89	77,5	62,4	15,4
11	1,54	71,8	58,6	14,7
12	0,96	70,0	41,3	11,1

TABIEAU 8 : Influence de la concentration en gélose sur la néoformation des bourgeons.

Les fragments de feuilles sont ensemencés, la face ventrale au contact d'un milieu de culture composé des éléments minéraux de la solution de KNOP diluée au demi et de glucose (3 ‰).

concentration, une diminution lente mais régulière du nombre des bourgeons formés, ainsi que du pourcentage d'explantats capables de proliférer.

Nous constatons également que lorsque le nombre des bourgeons augmente, le pourcentage de ceux qui apparaissent à l'apex s'accroît et inversement.

Le milieu liquide réduit le nombre des bourgeons néoformés ainsi que le nombre des explantats capables de proliférer ou de produire des organes. De plus, sur ce milieu, les bourgeons n'apparaissent que le 17e jour c'est-à-dire avec 5 jours de retard environ et les cals présentent un aspect translucide dû à l'hyperhydraticité des cellules.

La nature du milieu peut donc jouer un rôle important dans la mesure où elle conditionne l'hydratation des tissus et corrélativement les phénomènes d'organogenèse.

3°) La solution nutritive

Grâce à leurs réserves, les tissus de feuilles sont capables de proliférer sur un milieu sans éléments minéraux mais dans ce cas (Tableau 9), le nombre des bourgeons néoformés ainsi que le pourcentage d'explantats capables de produire des organes restent faibles. Nous avons donc ajouté à nos milieux de culture des éléments minéraux.

Sans entreprendre l'analyse systématique des effets exercés par les sels minéraux sur la néoformation des bourgeons, nous avons voulu comparer l'action de quelques solutions nutritives fréquemment utilisées pour la culture des tissus végétaux ; d'une part, la solution préconisée par GAUTHERET (1942a et c) qui a été utilisée dans les essais précédents et qui est constituée des macro-éléments de la solution de KNOP diluée de moitié et des micro-éléments de la solution de BERTHELOT ; d'autre part, la

MILIEU DE CULTURE	NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS PAR EXPLANTAT	% D'EXPLANTATS		% DE BOURGEONS			
		CAPABLES DE PROLIFERER	ORGANOGENES	A LA BASE	SUR LES PARTIES LATERALES	A L'APEX	
Eau	0,47	50,9	25,0	82,4	0	17,6	
G.	2,40	78,5	71,6	77,4	0	22,6	
H.	2,70	79,2	72,4	78,6	0	21,4	
M.S.	1	3,95	85,6	78,4	76,2	0	23,8
	2	4,15	85,6	78,4	76,6	0	24,4
	3	3,75	87,9	78,8	75,9	0	24,1
	4	11,95	100,0	100,0	65,5	4,2	30,3
	5	19,10	100,0	100,0	30,6	39,6	29,8

TABLEAU 9 : Action comparée de différentes solutions nutritives sur la néoformation des bourgeons.

Les explantats sont ensemencés la face ventrale au contact d'un milieu de culture contenant du glucose (30 g/l) et de la gélose (9 g/l). Ce milieu témoin (eau) est enrichi soit de la solution minérale préconisée par GAUTHERET (G.), soit de celle de HELLER (H.), soit enfin, de celle de MURASHIGE et SKOOG (M.S.). De plus, au milieu simplement minéral de MURASHIGE et SKOOG (1), on ajoute d'abord des éléments organiques (2) (de l'hydrolysate de caséine, un acide aminé : glycocolle et des vitamines : aneurine, pyridoxine, acide nicotinique et méso-inositol) puis des substances hormonales : auxine à  $10^{-6}$  M (3) ou kinétine à  $10^{-5}$  M (4) ; employées séparément (3) (4) ou associées (5)



solution utilisée par HELLER (1953) tant pour les macro- que pour les micro-éléments ; enfin, le milieu mis au point par MURASHIGE et SKOOG (1962) pour les tissus de tabac. Ce dernier milieu est toutefois complexe et son effet difficilement comparable à celui des deux autres solutions purement minérales car il contient en outre tout un ensemble de substances organiques. Nous avons donc réalisé plusieurs essais (Tableau 9), soit uniquement en présence des éléments minéraux : macro- et micro-éléments (1), soit en présence des éléments organiques à l'exception des phytohormones (2), soit enfin additionné d'auxine (3) ou de kinétine (4). Dans leur solution type, MURASHIGE et SKOOG utilisent ces deux derniers facteurs à des concentrations variables suivant la nature des tissus utilisés. Cependant, compte tenu d'essais antérieurs, nous avons employé l'acide indolyl-acétique à la concentration de  $10^{-6}$ M et la kinétine à  $10^{-5}$ M. De plus, afin de pouvoir juger de leur efficacité, ces deux substances sont ajoutées aux milieux de culture seules ou associées (5).

Le milieu minéral de MURASHIGE et SKOOG (M.S. 1) augmente davantage la néoformation des bourgeons que le milieu de HELLER (H.) ou de GAUTHERET (G.) qui présentent à peu près la même efficacité (Tableau 9). Si au milieu minéral de MURASHIGE et SKOOG (1) on ajoute des éléments organiques (2) et même de l'acide indolyl-acétique (3), la formation des cals et des bourgeons n'en est guère améliorée. Par contre, le milieu de MURASHIGE et SKOOG complet (5) est nettement favorable à la prolifération cellulaire et stimule de manière très intense l'apparition des bourgeons dont le nombre est presque décuplé. La kinétine (4) serait en grande partie responsable de cette action.

Sur le milieu préconisé par GAUTHERET, les bourgeons apparaissent en majorité dans la région basale des explantats. L'analyse statistique des pourcentages de bourgeons apparus dans la région apicale des fragments

ensemencés horizontalement sur le milieu de culture a été effectuée sur 40 lots de 24 explantats. Les limites de l'intervalle de confiance obtenues selon la méthode de STUDENT-FISCHER dite "test T" (HELLER, 1968) pour une probabilité de 99 % sont de  $21,50 \% \pm 3,80$ . Ce pourcentage de bourgeons apicaux n'est guère modifié par le milieu de HELLER ni même par celui de MURASHIGE et SKOOG soit minéral (1) soit minéral et organique (2) en présence d'auxine (3). Toutefois, sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG complet (5), la prolifération cellulaire intéresse tout le pourtour des explantats y compris la face ventrale au contact du milieu de culture. Cette prolifération cellulaire intense dissimule alors totalement l'explantat d'origine. Les bourgeons, petits et très nombreux, se forment partout ; aussi bien dans la région basale que dans la région apicale et même sur les parties latérales.

### C) NATURE DES TISSUS

Dans les expériences précédentes, nous avons employé des explantats issus de la nervure médiane des feuilles étiolées. Nous avons ensuite voulu comparer leurs capacités organogènes à celles de fragments provenant soit du limbe de ces mêmes feuilles étiolées, soit des feuilles chlorophylliennes d'endive.

Lorsque les explantats sont prélevés au niveau de la nervure médiane des feuilles étiolées, le cal se forme dans la région basale et devient visible à partir du 6e jour de culture. La plupart des bourgeons apparaissent à ce niveau entre le 10e et le 12e jour de culture et quelques jours plus tard, on peut noter exceptionnellement la présence de racines. Contrairement aux bourgeons dont 20 % environ sont situés à la partie apicale des explantats, les racines apparaissent uniquement sur le cal, à la partie basale des explantats, leur néoformation présente donc une polarité très stricte.

Si les fragments sont prélevés sur le limbe des feuilles étiolées (Tableau 10), on observe d'abord l'apparition d'un cal au niveau de la nervure

NATURE DES TISSUS	NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS	NOMBRE MOYEN DE RACINES
nervure médiane	1,84	0,24
Feuilles étiolées .....		
limbe	0,26	1,40
Feuilles chlorophylliennes	0,08	1,95

TABLEAU 10 : Influence de la nature des tissus sur les phénomènes d'organogenèse.

Les explantats sont prélevés soit sur des feuilles étiolées, au niveau de la nervure médiane ou du limbe, soit sur des feuilles chlorophylliennes formées à partir de fragments de racines d'endive cultivés "in vitro".

la plus importante puis de petites masses cellulaires apparaissent au niveau des autres nervures. Ces amas de cellules se forment toujours à l'extrémité des nervures orientées vers la base de la feuille et sont d'autant plus volumineux que la nervure sur laquelle ils se forment est plus importante ; ils se soudent d'ailleurs rarement en un cal unique et produisent des racines entre le 12e et le 15e jour de culture. Des bourgeons, peu nombreux, apparaissent beaucoup plus tardivement (25e jour environ) sur les cals les plus importants.

A partir d'explantats prélevés sur des feuilles chlorophylliennes issues de bourgeons néoformés par des fragments de racine d'endive cultivés "in vitro", la prolifération est faible et il n'y a pratiquement que production de racines. Lorsque les fragments proviennent de feuilles chlorophylliennes prélevées en plein champ sur des plantes entières, les résultats obtenus sont identiques. De plus, dans un cas comme dans l'autre, la prolifération et la production des racines sont en relation avec l'importance des nervures.

## D) DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le milieu minéral de MURASHIGE et SKOOG favorise davantage les phénomènes de prolifération et d'organogenèse que les milieux de HELLER ou de GAUTHERET. De plus, le milieu de MURASHIGE et SKOOG complet provoque une croissance exubérante et supprime la polarité des fragments de feuilles. Parmi ces milieux, nous avons toutefois choisi d'utiliser celui préconisé par GAUTHERET car tout en permettant un développement correct des tissus de feuilles, il présente l'avantage d'être le plus simple. De plus, les oligo-éléments de la solution de BERTHELOT que nous avons utilisés simultanément aux macro-éléments de la solution de KNOP ne semblent pas indispensables au développement des tissus dont les capacités de prolifération et d'organogenèse restent inchangées en leur absence. Ceci n'est pas surprenant car les fragments d'organes renferment en général des réserves et de plus, les milieux de culture utilisés contiennent de la gélose qui apporte avec ses impuretés de nombreux oligo-éléments. C'est pourquoi nous avons, par la suite, limité les sels minéraux de nos milieux de culture aux seuls macro-éléments de la solution de KNOP diluée de moitié.

Le milieu de base tel que nous venons de le définir comprendra donc du glucose (3 %), de la gélose (9 %) et les macro-éléments de la solution de KNOP diluée au demi. Les explantats de 16 mm de diamètre seront prélevés dans la partie médiane des feuilles moyennes des bourgeons étiolés d'endive.

Par ailleurs, le gradient organogène que nous avons observé peut être mis en relation avec l'état initial des fragments de feuilles d'endive, avant l'ensemencement (VASSEUR et LEGRAND, 1972). En effet, le poids de matière sèche ainsi que la teneur en azote sont plus élevés à mesure que les fragments sont plus proches de l'apex des feuilles et des feuilles centrales (Tableau 11). Simultanément, on observe toutefois que par rapport à l'azote total, il y a une augmentation de la proportion d'azote protéique et une diminution de

l'azote soluble. Seul le poids de matière fraîche ne reflète pas la capacité des tissus à former des organes.

	P.F. mg/expl.	P.S. mg/expl.	P.S. % P.F.	N.T. µg/expl.	N.P. µg/expl.	N.S. µg/expl.	N.P. % N.T.	N.S. % N.T.	
E	591,3	32,3	5,4	712,2	120,4	591,8	16,9	83,0	
1	568,2	35,8	6,3	919,8	166,1	753,7	18,0	81,9	
M	2	689,0	44,9	6,5	965,4	178,2	787,3	18,4	81,5
3	646,5	44,2	6,8	1022,8	191,8	831,0	18,7	81,2	
C	640,3	49,1	7,6	1154,1	255,7	898,5	22,1	77,8	

TABLEAU 11 : Poids de matière fraîche (P.F.), de matière sèche (P.S.) et teneurs en azote total (N.T.), protéique (N.P.) et soluble (N.S.) de fragments de feuilles d'endive selon leur lieu de prélèvement.

Le poids de substance sèche et la teneur en composés azotés augmentent parallèlement de la base (1) à l'apex (3) des feuilles moyennes (M) et des feuilles externes (E) aux feuilles centrales (C) du bourgeon d'endive. Toutefois, par rapport à l'azote total, l'azote protéique augmente et l'azote soluble diminue.

Les teneurs en ADN et en ARN suivent celles des protéines (Tableau 12) ; la quantité d'ARN en particulier varie du simple à plus du double quand on passe des feuilles externes à celles du centre. Les rapports ARN/protéines et surtout ARN/ADN, plus élevés au niveau des feuilles centrales et à la partie apicale des feuilles sont dus en grande partie à la richesse de ces tissus en ARN. Les potentialités organogènes des tissus de feuilles sont donc en relation avec leur teneur initiale en acides nucléiques et en protéines.

		ARN µgP/explantat	ADN µgP/explantat	Protéines µg /explantat	$\frac{\text{ARN}}{\text{ADN}}$	$\frac{\text{ARN}(\mu\text{gP})}{\text{Protéines}(\text{mg})}$
E		5,08	0,43	752,78	11,77	6,75
M	1	7,37	0,51	1038,44	14,45	7,09
	2	7,65	0,51	1113,65	14,75	6,87
	3	8,41	0,54	1198,55	15,36	7,02
C		13,96	0,60	1597,88	22,92	8,73

TABLEAU 12.: Teneurs en acide ribonucléique (ARN), en acide déoxyribonucléique (ADN) et en protéines de fragments de feuilles selon leur lieu de prélèvement. Les résultats sont exprimés en microgrammes de phosphore (µgP) ou de protéines par explantat.

La teneur en ARN augmente progressivement des feuilles externes (E) à celles du centre (C) du bourgeon d'endive. L'ADN plus stable provoque une augmentation du rapport  $\frac{\text{ARN}}{\text{ADN}}$ .

Pour les tissus d'endive, la production des organes a toujours lieu à partir d'un cal dont la formation est liée à la présence de nervures. L'évolution des néoformations est ensuite différente. Il est en effet possible, en fonction de la nature des tissus, d'obtenir essentiellement soit des bourgeons (nervures médianes des feuilles étiolées) soit des racines (limbe des feuilles étiolées et feuilles chlorophylliennes). Cette capacité rhizogène des feuilles vertes d'endive a d'ailleurs déjà été signalée par BESEMER et Coll. (1969) et par PROFUMO et DAMERI (1969). Les organes formés varient donc d'un tissu à l'autre mais la polarité de leur développement ainsi que l'ordre dans lequel ils apparaissent peuvent également être différents.

Une des premières études sur les possibilités de bouturage de fragments de feuilles isolées a été publiée en 1931 par HAGEMAN. Parmi un grand nombre d'espèces répertoriées, 66 % environ d'entr'elles forment soit uniquement des racines, soit des racines et des bourgeons, 32 % ne présentent aucun signe d'organogenèse et 2 % seulement ne forment que des bourgeons. Toutefois, malgré les nombreuses recherches suscitées par le bouturage des feuilles, l'analyse de la polarité n'a pas fait l'objet d'études particulières. Seul CHOUARD (1930 ; 1931) sur des feuilles d'*Endymion nutans* et d'*Alloplectus linkii*, puis PREVOT (1939a) sur *Begonia rex* mettent bien en évidence le phénomène. Plus récemment, BIGOT (1965) publie un travail important dans lequel il compare les facultés de bouturage de quelques espèces appartenant essentiellement à quatre familles : Begoniacées, Gesneriacées, Piperacées et Liliacées. Les résultats obtenus par ces auteurs ainsi que nos propres observations suggèrent un certain nombre de remarques.

Les fragments de limbe des feuilles étiolées réagissent pratiquement de la même manière que les feuilles vertes d'endive. Or, ce limbe qui présente un aspect jaunâtre avant la mise en culture, devient rapidement chlorophyllien à la lumière ; il possède donc l'équipement nécessaire à la photosynthèse. Dans les deux cas, il y a production de racines puis de bourgeons au niveau du cal néoformé à la partie basale des explantats. La polarité du développement ainsi que l'ordre dans lequel apparaissent les organes correspondent aux cas les plus couramment rencontrés. De plus, s'il y a peu d'exemples où les bourgeons soient seuls présents, le nombre des espèces ne produisant que des racines est élevé. Cela a souvent conduit à admettre que les racines sont nécessaires à la formation des bourgeons. Par opposition, il nous a paru alors intéressant de noter en quoi consiste l'originalité du développement des explantats utilisés, issus de la partie médiane charnue des feuilles étiolées d'endive.

Sur le milieu de base tel que nous l'avons défini, les racines apparaissent toujours sur le cal mais, par contre, 20 pour 100 environ des bourgeons sont formés à la partie apicale. La polarité du développement des bourgeons est donc moins marquée que celle des racines. Les bourgeons naissent en premier, suivis un peu plus tard de quelques racines. La formation des bourgeons semble donc indépendante du système racinaire. Il arrive même parfois que certaines racines apparaissent à la base des bourgeons néoformés. Une telle succession dans la formation des organes a été observée dans un certain nombre de cas. CHOUARD en 1938 avait déjà signalé que quelques monocotylédones forment des bourgeons sans apparition préalable de racines. Il en est de même de l'épiderme isolé de feuilles de bégonia (PREVOT, 1939b) ainsi que des écailles de lis (WALKER, 1940 ; GODDEN et WATSON, 1962).

Le développement des tissus d'endive semble se rapprocher de celui des fragments d'écailles de lis. La comparaison ne s'arrête pas à une différenciation organogénétique identique mais nous pouvons penser que la similitude de leur comportement est due à l'absence de chlorophylle. Un argument supplémentaire est fourni par BIGOT (1971) qui observe que l'aptitude à bourgeonner des écailles de lis se perd au moment de la différenciation des feuilles aériennes.

33

33

33

## CHAPITRE 2

# ACTION DE FACTEURS CHIMIQUES

## SUR LE BOURGEONNEMENT

La néoformation des bourgeons et des racines est influencée par des facteurs chimiques et physiques. Ces derniers ayant fait l'objet d'une étude particulière (BOURIQUET, 1966a ; LEGRAND, 1972; 1974), nous nous sommes intéressé aux facteurs chimiques. Les explantats sont ensemencés dans le sens normal ; cependant, dans certains cas et afin de permettre à la polarité de se manifester librement, nous les avons déposés la face ventrale au contact du milieu nutritif.

### A) ACTION DE QUELQUES REGULATEURS DE CROISSANCE

Pour tenter de préciser les conditions susceptibles de modifier le bourgeonnement des tissus de feuilles d'endive, nous avons examiné l'action exercée par des substances appartenant respectivement au groupe des auxines, des gibbérellines et des cytokinines. Ces régulateurs de croissance ont donné lieu à un grand nombre de travaux parmi lesquels nous avons

retenu plus particulièrement ceux qui analysent les phénomènes de prolifération cellulaire et d'organogenèse.

### 1°) Les auxines

Les nombreuses études réalisées sur les auxines naturelles ou synthétiques ont fait l'objet de mises au point très détaillées (GAUTHERET, 1947 ; 1959 ; BOURIQUET, 1960 ; PILET, 1961a ; GUILLOT, 1967 ; LEROUX, 1973).

On admet généralement que les auxines possèdent la propriété d'induire la formation des racines et d'inhiber celle des bourgeons ; nous avons tenu à vérifier cette action sur les tissus de feuilles d'endive.

#### a) action de l'acide indolyl-acétique

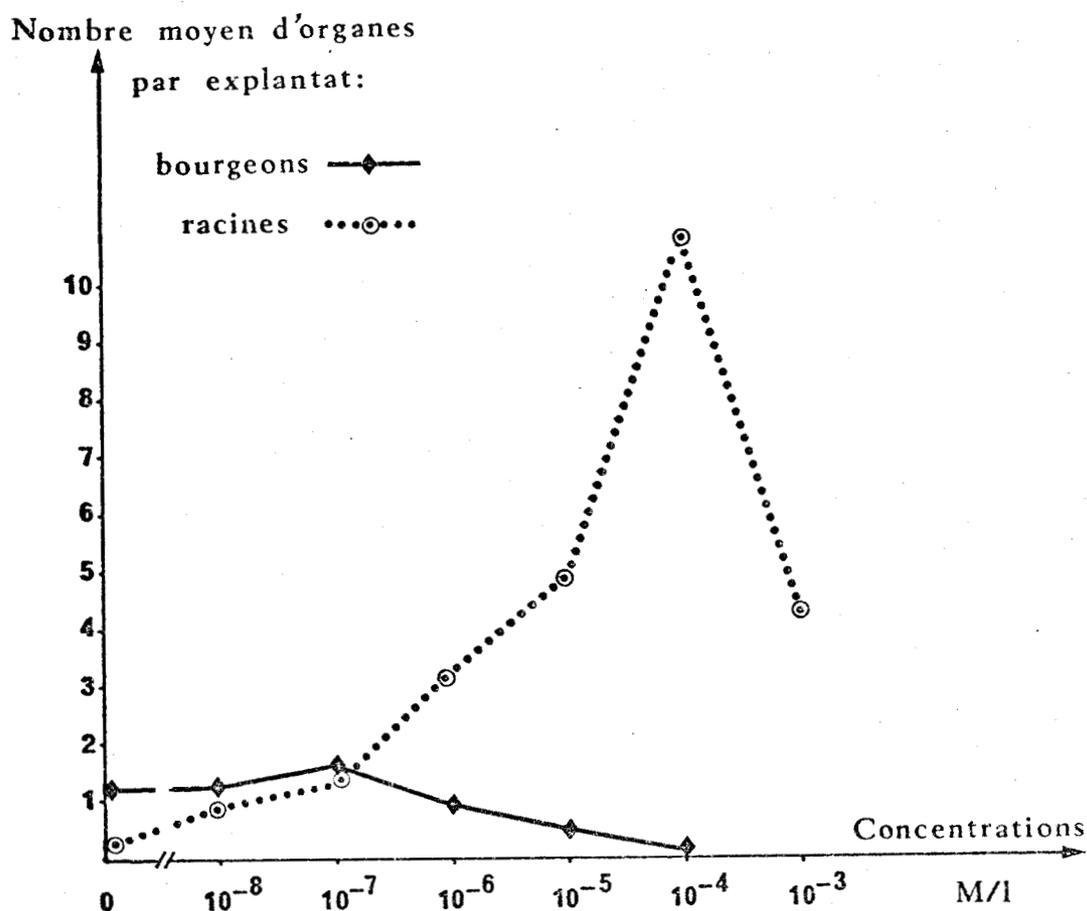


Figure 7 : Action de l'acide indolyl-acétique sur le nombre de bourgeons et de racines produits par des fragments de feuilles d'endive.

L'acide indolyl-acétique, aux faibles concentrations, n'a que très peu d'effet mais il inhibe la néoformation et le développement des bourgeons aux doses égales ou supérieures à  $10^{-6}$  M (Figure 7). La formation des racines est au contraire stimulée de manière importante ; la dose optimale est voisine de  $10^{-4}$  M. A cette concentration, les racines qui apparaissent dans le milieu de culture sont épaisses et leur croissance est ralentie. Une dose plus élevée provoque l'apparition de cals translucides, aux cellules hyperhydriques.

b) action de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

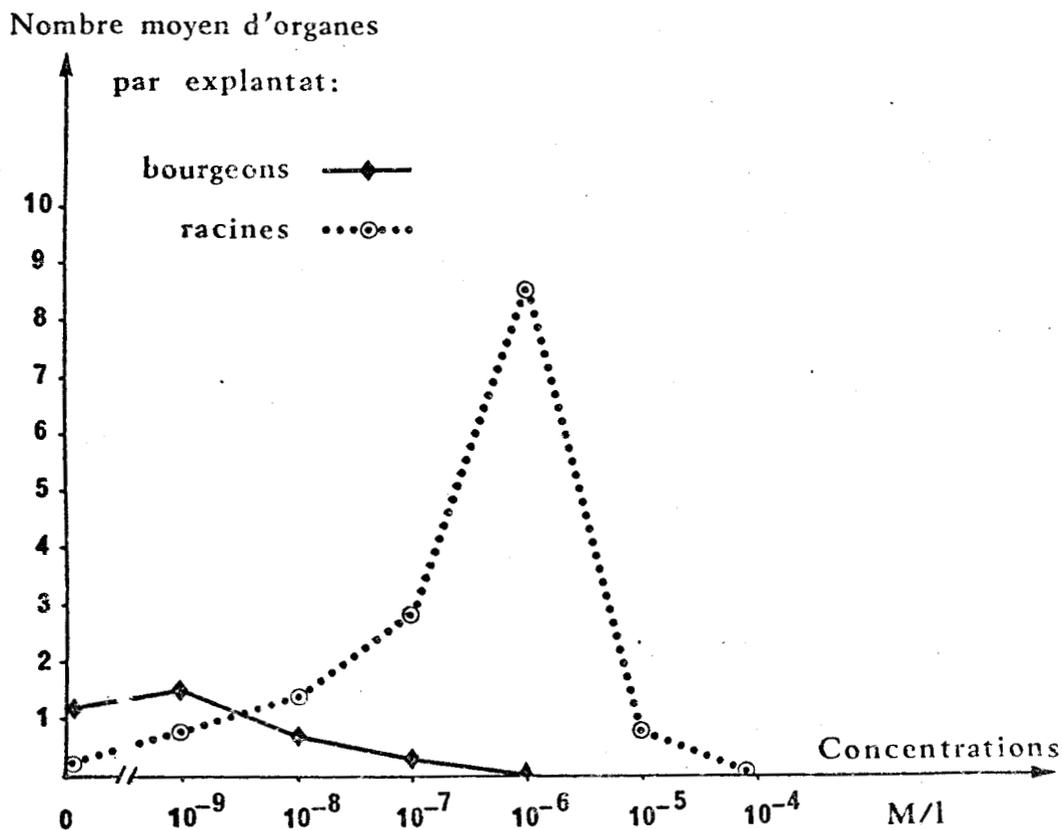


Figure 8 : Action de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique sur le nombre de bourgeons et de racines produits par des fragments de feuilles d'endive.

L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique diminue le nombre des bourgeons formés à partir de  $10^{-8}$  M et à  $10^{-6}$  M, l'inhibition est totale (Figure 8).

Il stimule par contre la rhizogenèse jusque  $10^{-6}$  M, concentration au-delà de laquelle il y a inhibition et formation de cals hyperhydriques. A la dose de  $6.10^{-6}$  M, les cals néoformés sont volumineux et renferment un très grand nombre d'ébauches racinaires qui ne se développent pas.

## 2°) Les gibbérellines

En 1926, KUROSAWA montre que le dérèglement de la croissance de certaines plantules de riz est dû à la présence d'un champignon parasite : le *Gibberella fujikuroi* et que ce sont les gibbérellines secrétées par le champignon qui sont responsables de son action. Depuis, ces substances ont donné lieu à de très nombreux travaux qui soulignent la diversité de leurs propriétés physiologiques (BRIAN, 1960 ; MONTUELLE, 1962 ; PALEG, 1965 ; BERNIER et Coll., 1967 ; LANG, 1970 ; JONES, 1973).

Les effets des gibbérellines sur la néoformation des bourgeons sont variés ; il peut y avoir :

### - *Stimulation* :

- . *Cardamine pratensis* (PAULET et NITSCH, 1959)
- . *Chondrilla juncea* (KEFFORD et CASO, 1972)

### - *Pas d'effet ou légère inhibition* :

- . *Cichorium intybus* (REINERT et BESEMER, 1967 ;  
tissus de racines)
- . *Datura innoxia* (ENGVILD, 1973)

### - *Inhibition* :

- . *Begonia rex* (SCHRAUDOLF et REINERT, 1959)  
(BIGOT et NITSCH, 1968)  
(PREVOT et CHLYAH, 1968)
- . *Bryophyllum tubiflorum* (MARCELLE, 1970)
- . *Cichorium intybus* (BESEMER et Coll., 1969 ;  
tissus de feuilles vertes)

- . *Nicotiana tabacum* (MURASHIGE, 1964)  
(THORPE et MEIER, 1973)
- . *Plumbago indica* (NITSCH et NITSCH, 1967).

On note la même diversité des réponses en ce qui concerne la néoformation des racines ; ainsi, l'acide gibbéréllique peut être inactif (SPANJERSBERG et GAUTHERET, 1964 ; BESEMER et Coll., 1969) ; inhibiteur (KATO, 1953, 1958 ; PREVOT et CHLYAH, 1968 ; GAUTHERET, 1969 ; HEIDE, 1969) ou stimulant (LEROUX, 1968 ; ANAND et Coll., 1972).

Ces différents résultats nous ont incité à étudier l'action de cette substance sur notre matériel.

a) action de l'acide gibbéréllique

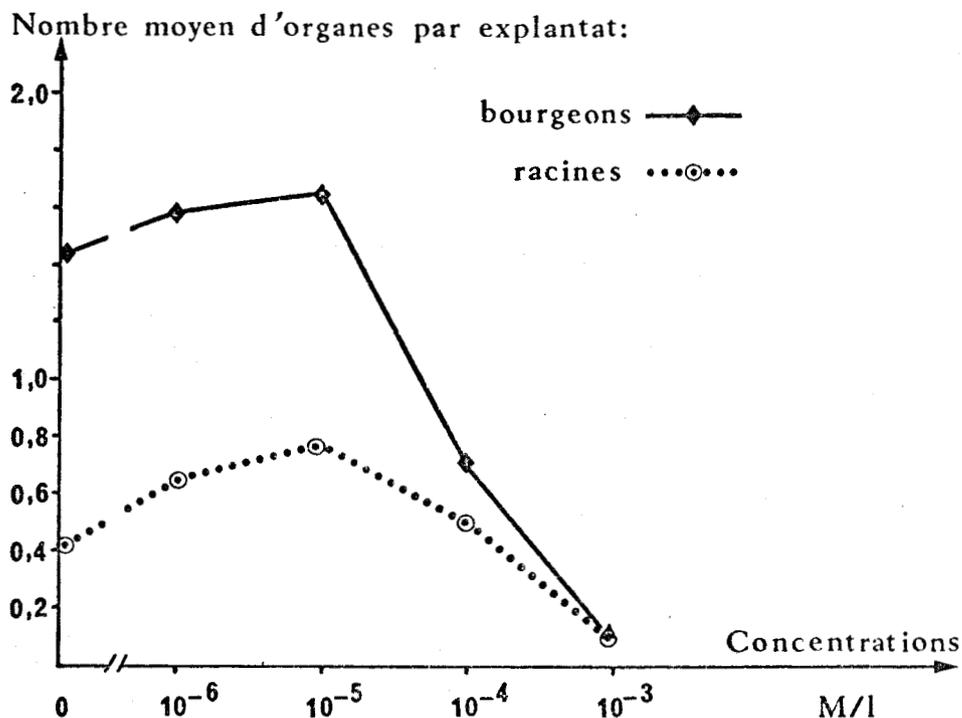


Figure 9 : Action de l'acide gibbéréllique sur la néoformation des bourgeons et des racines par les fragments de feuilles d'endive.

Le nombre des bourgeons obtenus aux concentrations d'acide gibbérellique égales à  $10^{-6}$  M et  $10^{-5}$  M n'est que légèrement supérieur à celui du lot témoin (Figure 9). Par contre, pour les doses plus fortes, on constate une nette inhibition du bourgeonnement.

Sur la production des racines, l'acide gibbérellique agit de la même manière. Il y a d'abord une faible augmentation de la rhizogénèse jusqu'à  $10^{-5}$  M et au-delà de cette concentration, le nombre des racines néoformées diminue.

#### b) Interaction acide gibbérellique-auxine

Le mode d'action de l'acide gibbérellique est encore mal connu mais on sait que dans certains cas, il augmente la teneur en auxine endogène des plantes traitées (NITSCH et NITSCH, 1959a ; GOUKOVA et FAUSTOV, 1962 ; BOUILLENNE-WALRAND, 1962 ; KURAIISHI et MUIR, 1964). Cela pourrait d'ailleurs correspondre à une stimulation de la synthèse d'auxine (HAYASHI et MURAKAMI, 1953 ; VARGA, 1971) ou à un effet protecteur de l'auxine, l'acide gibbérellique inhibant l'activité auxine-oxydasique (PILET, 1957 ; PILET et COLLET, 1959 ; 1960 ; WATANABE et STUTZ, 1960 ; BUTENKO et Coll., 1962 ; GASPAR, 1965). C'est pourquoi nous avons voulu vérifier l'action exercée par l'acide indolyl-acétique associé à l'acide gibbérellique.

Le nombre des bourgeons obtenus en présence d'auxine, quelle que soit la concentration employée, est légèrement supérieur lorsque l'acide gibbérellique est associé à la dose de  $10^{-6}$  M (Tableau 13). Par contre, les doses plus élevées d'acide gibbérellique ( $10^{-5}$  M à  $10^{-3}$  M) renforcent l'effet inhibiteur de l'auxine.

Sur la néoformation des racines, la présence simultanée des deux hormones (Tableau 14) permet de mettre en évidence des actions synergiques. Cela se traduit par une exaltation de la rhizogénèse aux doses infra-optimales ou optimales et par une toxicité accrue aux doses supérieures.

Acide indolyl-acétique  
(M/l)

		0	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$
Acide gibbérellique (M/l)	0	1,20	1,40	1,00	0,60	0,10	0
	$10^{-6}$	1,50	1,60	1,30	0,80	0,20	0
	$10^{-5}$	1,52	1,40	0,80	0,35	0	0
	$10^{-4}$	0,70	0,42	0	0	0	0
	$10^{-3}$	0,10	0	0	0	0	0

TABLEAU 13: Action conjuguée de l'acide gibbérellique et de l'acide indolyl-acétique sur le nombre moyen de bourgeons produits par des fragments de feuilles d'endive.

Acide indolyl-acétique  
(M/l)

		0	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$
Acide gibbérellique (M/l)	0	0,40	1,30	3,20	4,80	9,70	5,70
	$10^{-6}$	0,70	1,50	4,27	7,26	10,40	4,08
	$10^{-5}$	0,74	1,90	5,73	8,15	6,70	3,03
	$10^{-4}$	0,50	0,80	2,95	3,60	2,76	1,64
	$10^{-3}$	0,10	0,30	1,02	0,72	0,88	0,69

TABLEAU 14: Action conjuguée de l'acide gibbérellique et de l'acide indolyl-acétique sur le nombre moyen de racines produites par des fragments de feuilles d'endive.



### 3°) Les cytokinines

La première étude consacrée à l'organogenèse des tissus de tabac cultivés "in vitro" a été publiée par SKOOG en 1944. Le matériel végétal utilisé allait s'avérer fécond puisqu'il devait permettre la découverte des cytokinines. Ce sont MILLER, SKOOG, VON SALTZA et STRONG en 1955 qui réussirent à isoler, à partir d'un extrait de levure, un principe actif sur la croissance des tissus médullaires de tabac. Peu après MILLER et Coll., (1955 ; 1956) caractérisent ce composé comme étant un dérivé de l'adénine, la 6-furfurylaminopurine ou furfuryladénine et lui donnent le nom de kinétine. DAS et Coll. (1956) étudient l'action de la kinétine sur la multiplication des cellules de moelle de tabac, puis SKOOG et MILLER (1957) expérimentant sur des fragments de tiges émettent la théorie selon laquelle la division des cellules exige à la fois la présence d'auxine et de cytokinines, l'équilibre de ces deux facteurs réglant par ailleurs l'orientation des phénomènes d'organogenèse.

Les effets exercés par les cytokinines au cours de la croissance et du développement des plantes ont été décrits par de nombreux chercheurs (DEYSSON, 1959 ; BEAUCHESNE, 1960 ; MILLER, 1963 ; GUERN, 1967 ; SRIVASTAVA, 1967 ; XHAUFFLAIRE et GASPARD, 1968 ; NITSCH, 1968a ; SKOOG et ARMSTRONG, 1970. ; HALL, 1973).

Actuellement, on sait que des substances ayant des propriétés analogues à la kinétine existent naturellement chez les végétaux. Parmi les cytokinines celles qui ont été le plus couramment utilisées sont la kinétine et la 6-benzylaminopurine. Nous avons donc comparé leurs actions respectives.

a) action de la kinétine et de la 6-benzylaminopurine

Ces deux cytokinines stimulent la néoformation des bourgeons (Figure 10), à toutes les concentrations utilisées jusqu'à  $10^{-4}$  M.

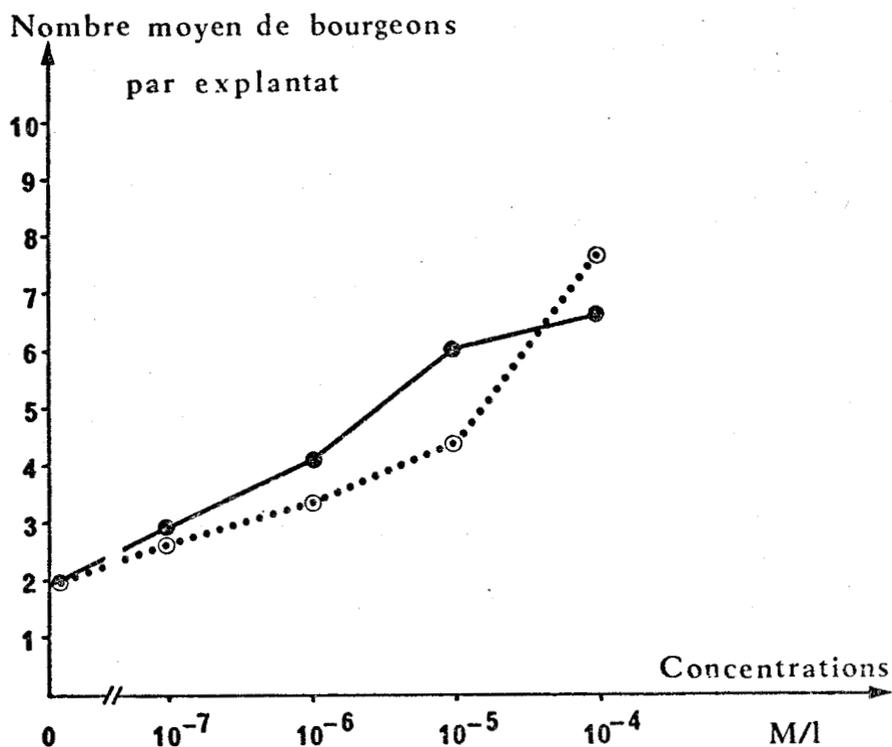


Figure 10 : Action comparée de la kinétine [—] et de la 6 benzylaminopurine [.....] sur le nombre de bourgeons produits par des fragments de feuilles d'endive.

A mesure que les concentrations augmentent, on note toutefois que le développement des bourgeons est de plus en plus faible. Ce qui peut résulter du rôle limitant joué par les facteurs trophiques du milieu.

Compte tenu de la similitude d'action de ces deux composés, nous avons choisi d'utiliser la kinétine

b) action de la kinétine associée à l'auxine

L'intervention de la kinétine sur la division cellulaire a été démontrée à maintes reprises, mais dans la plupart des cas, l'effet stimulateur n'est significatif qu'en présence d'auxine (DAS et Coll., 1956 ; SKOOG et MILLER, 1957 ; PATAU et Coll., 1957 ; NITSCH et NITSCH, 1960 ; GAUTHERET, 1960a et b ; 1963 ; 1966 ; JOUANNEAU, 1971 ; PEAUD-LENOEL et JOUANNEAU, 1971 ; JOUANNEAU et TANDEAU de MARSAC, 1973). Nous avons donc vérifié l'action exercée par ces substances de croissance sur la néoformation des bourgeons.

La kinétine et l'auxine employées séparément n'augmentent guère l'importance des cals alors qu'associées, ces deux substances favorisent la prolifération des fragments de feuilles d'endive. De plus, si l'auxine inhibe la formation des bourgeons, associée à la kinétine, elle renforce très nettement l'effet stimulant de cette dernière (Tableau 15). Le nombre le plus important de bourgeons est obtenu en présence de  $10^{-6}$  M d'auxine et de  $10^{-5}$  M de kinétine.

Acide indolyl-acétique  
(M/l)

		0	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
Kinétine (M/l)	0	2,0	2,70	1,30	0,80	0,10
	$10^{-7}$	2,60	2,80	3,30	1,60	0,10
	$10^{-6}$	3,05	3,10	3,80	1,90	0,20
	$10^{-5}$	3,40	4,90	7,05	5,60	0,40
	$10^{-4}$	4,10	5,20	5,10	5,10	0,75

TABLEAU 15 : Action conjuguée de la kinétine et de l'acide indolyl-acétique sur le nombre moyen de bourgeons produits par des fragments de feuilles d'endive.

Ces substances interviennent également sur l'expression de la polarité des fragments de feuilles d'endive (Tableau 16). La cytokinine, en effet, augmente de plus du double le pourcentage des bourgeons apicaux. L'auxine exerce une action encore plus nette puisqu'à  $10^{-4}$  M, la totalité des bourgeons apparaissent à la partie apicale des explantats

		NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS PAR EXPLANTAT	% DE BOURGEONS	
			A L'APEX	A LA BASE
Témoin		2,05	21,0	79,0
K	$10^{-6}$ M	2,80	22,0	78,0
	$10^{-5}$ M	3,10	38,1	61,9
	$10^{-4}$ M	3,80	44,6	55,4
A I A	$10^{-6}$ M	1,45	19,0	81,0
	$10^{-5}$ M	0,90	36,4	63,6
	$10^{-4}$ M	0,25	100,0	0

TABLEAU 16 : Influence de la kinétine (K) et de l'acide indolyl-acétique (A I A) sur la polarité manifestée par des explantats de feuilles ensemencés la face ventrale au contact du milieu de culture.

### c) action de la kinétine associée à l'acide gibbérellique

L'acide gibbérellique, dont nous avons déjà signalé l'intervention probable sur le métabolisme auxinique, peut jouer un rôle important dans les phénomènes d'organogenèse (LANG, 1970 ; ENGELKE et Coll., 1973 ; KATO et HONGO, 1974). C'est pourquoi nous nous sommes proposé d'analyser ses effets en présence de kinétine.

L'acide gibbérellique n'a que peu d'action sur le bourgeonnement des fragments de feuilles d'endive alors que la kinétine augmente très net-

tement le nombre des bourgeons formés. En présence des deux régulateurs de croissance, les résultats obtenus (Tableau 17) montrent que l'acide gibbérellique interfère avec la kinétine dont il réduit l'effet stimulant.

		Acide gibbérellique (M/l)				
		0	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$
Kinétine (M/l)	0	1,48	1,50	1,65	0,83	0,37
	$10^{-6}$	3,23	2,67	2,14	1,35	0,73
	$10^{-5}$	3,60	3,50	2,90	1,19	1,03
	$10^{-4}$	3,90	3,62	2,32	0,86	0,91

TABLEAU 17: Action conjuguée de la kinétine et de l'acide gibbérellique sur le nombre moyen de bourgeons produits par des fragments de feuilles d'endive.

#### d) action comparée de la kinétine et de l'adénine

Les cytokinines étant toutes des adénines substituées sur l'azote 6, on peut se demander si la kinétine (6-furfuryl-aminopurine) n'agit pas comme un dérivé de l'adénine (6-aminopurine) et si son rôle sur la néoformation des bourgeons est bien spécifique. Sur les tissus de tabac par exemple, SKOOG (1950) montre que l'addition d'adénine peut supprimer l'effet inhibiteur de faibles concentrations d'acide indolyl-acétique. Selon cet auteur, l'adénine peut être considérée comme une substance induisant la formation des bourgeons. Par ailleurs, l'adénine qui intervient sur la division des cellules (DEYSSON, 1954) et stimule la formation des bourgeons (SKOOG, 1944 ; SKOOG et TSUI, 1948 ; STERLING, 1950 ;

JACQUIOT, 1951 ; MAYER, 1956 ; PLUMMER et LEOPOLD, 1957 ; PLUMMER, 1957 ; PAULET et NITSCH, 1959 ; STICHEL, 1959 ; GINSBURG, 1966 ; MENHENETT, 1970), peut agir en synergie avec les cytokinines (SKOOG et MILLER, 1957 ; NITSCH et NITSCH, 1967 ; NITSCH et Coll., 1967 ; SKOOG, 1970).

Nous avons d'abord comparé l'action de l'adénine employée sous forme sulfate, qui est souvent la plus utilisée, et sous forme de base libre. Puis, nous avons vérifié si cette base était capable d'augmenter les effets produits par la kinétine et si, en présence d'auxine elle se comportait comme une cytokinine.

a) action de l'adénine et du sulfate d'adénine

Ces substances ne modifient pas la prolifération cellulaire et le développement des cals est identique à celui observé sur les explantats témoins. Par contre, la formation des bourgeons est stimulée ; elle est optimale à  $10^{-5}$  M et au-delà, des phénomènes d'inhibition se manifestent (Figure 11).

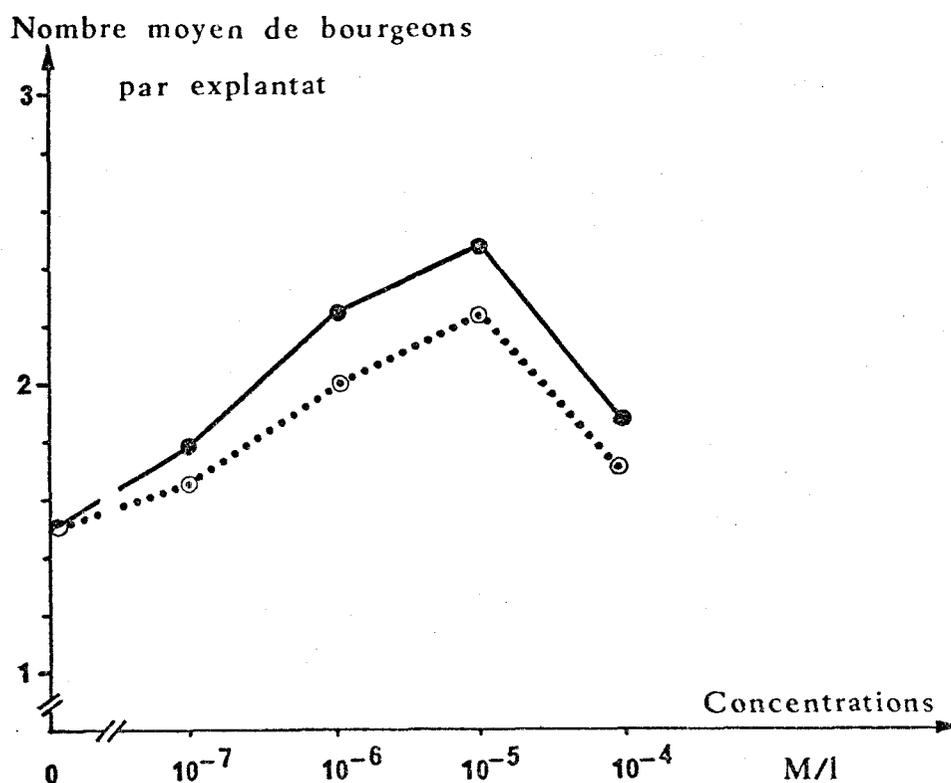


Figure 11 : Action de l'adénine [—] et du sulfate d'adénine [.....] sur le nombre de bourgeons produits par des fragments de feuilles d'endive.

Le bourgeonnement étant un peu plus important en présence de la base libre, c'est cette forme que nous avons choisie d'utiliser pour les expériences ultérieures.

*β) interaction adénine - auxine*

		Acide indolyl-acétique (M/l)				
		0	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
Adénine (M/l)	0	1,30	1,70	1,20	0,30	0
	$10^{-7}$	1,40	1,60	1,30	0,20	0,10
	$10^{-6}$	1,50	1,90	1,30	0,80	0,10
	$10^{-5}$	2,01	2,60	1,40	0,90	0,20
	$10^{-4}$	1,70	2,10	1,20	1,10	0,20

TABLEAU 18 : Action conjuguée de l'adénine et de l'acide indolyl-acétique sur le nombre moyen de bourgeons produits par des fragments de feuilles d'endive.

L'action de l'adénine n'est pratiquement pas modifiée en présence d'auxine, tout au plus la base peut-elle réduire les effets inhibiteurs de l'auxine (Tableau 18). Cela est donc très différent de ce que l'on observe avec la kinétine (Tableau 15).

*γ) interaction adénine - kinétine*

L'adénine est moins efficace que la kinétine (Tableau 19) et

		Adénine (M/l)				
		0	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
Kinétine (M/l)	0	1,40	1,55	2,01	2,48	1,95
	$10^{-7}$	2,00	1,82	2,59	2,66	1,89
	$10^{-6}$	2,90	2,85	2,94	2,62	2,01
	$10^{-5}$	3,63	3,68	3,49	2,88	2,38
	$10^{-4}$	3,80	4,01	3,53	3,20	3,18

TABEAU 19 : Action conjuguée de l'adénine et de la kinétine sur le nombre moyen de bourgeons produits par des fragments de feuilles d'endive.

associée à cette dernière elle n'en modifie guère l'action à l'égard de la néoformation des bourgeons.

*δ) action de l'adénine et du nitrate de sodium*

L'adénine n'agit pas toujours comme une cytokinine. Dans le cas des disques de feuilles de begonia par exemple, MENHENETT (1970) suggère que l'adénine n'aurait pas de rôle spécifique mais interviendrait comme source d'azote. Etant donné que l'adénine a une efficacité nettement plus faible que la kinétine sur les tissus de feuilles d'endive et qu'elle ne manifeste pas d'effets cumulatifs avec la cytokinine, on pouvait se demander également

	NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS PAR EXPLANTAT	% D'EXPLANTATS	
		CAPABLES DE PROLIFERER	ORGANOGENES
a) Témoïn .....	1,36	72,7	63,6
Adénine 10 <sup>-6</sup> .....	1,61	71,4	57,6
" 10 <sup>-5</sup> .....	2,43	86,4	78,2
" 10 <sup>-4</sup> .....	1,97	77,3	66,2
" 10 <sup>-3</sup> .....	1,22	66,7	54,2
NaNO <sub>3</sub> 10 <sup>-6</sup> .....	1,75	74,2	58,3
" 10 <sup>-5</sup> .....	2,01	74,3	58,1
" 10 <sup>-4</sup> .....	2,37	80,0	69,7
" 10 <sup>-3</sup> .....	2,65	86,9	78,3
b) Témoïn .....	0,53	52,2	26,1
Adénine 10 <sup>-6</sup> .....	0,64	53,1	28,6
" 10 <sup>-5</sup> .....	0,96	65,0	32,2
" 10 <sup>-4</sup> .....	0,77	46,7	29,2
" 10 <sup>-3</sup> .....	0,73	29,2	25,0
NaNO <sub>3</sub> 10 <sup>-6</sup> .....	0,76	54,5	27,2
" 10 <sup>-5</sup> .....	0,86	58,5	33,0
" 10 <sup>-4</sup> .....	1,11	66,7	47,5
" 10 <sup>-3</sup> .....	1,40	71,8	53,6

TABLEAU 20: Action comparée de l'adénine et du nitrate de sodium (concentrations molaires) sur le bourgeonnement de fragments de feuilles d'endive.

Des quantités d'azote (NaNO<sub>3</sub>) équivalentes aux différentes concentrations d'adénine sont ajoutées aux milieux de culture.

- a) les milieux de culture contiennent initialement les éléments minéraux de la solution de Knop diluée au demi.  
 b) les milieux sont dépourvus d'éléments minéraux.



si cette base n'était pas simplement utilisée comme source azotée.

Pour cette étude, nous avons réalisé des milieux contenant, soit de l'adénine à des concentrations de  $10^{-6}M$  à  $10^{-3}M$ , soit du nitrate de sodium en quantités d'azote équivalentes à celles présentes lors des essais effectués avec les différentes doses d'adénine. Le nitrate de sodium ne présente pas de concentration optimale d'action, mais augmente le bourgeonnement à toutes les doses employées (Tableau 20 [a]) ; de plus, il est plus favorable à la néoformation des bourgeons que l'adénine. La présence initiale d'éléments minéraux dans les milieux de culture pouvait cependant fausser la mise en évidence des phénomènes.

Nous avons donc renouvelé cette expérience sur un milieu gélosé, additionné de glucose mais sans apport d'éléments minéraux autres que ceux fournis éventuellement sous forme de nitrate de sodium ; dans ces conditions, il apparaît (Tableau 20 [b]) que l'adénine n'intervient pas simplement comme source d'azote; sinon on comprendrait mal qu'elle puisse être inhibitrice au-delà de  $10^{-5}M$ , alors que la quantité d'azote correspondante ne l'est pas.

#### 4°) Action du lait de coco

La composition du lait de coco (endosperme de noix immatures) est complexe et mal définie. On sait cependant qu'en plus d'acides aminés, d'acides organiques, de sucres, de vitamines .... il contient également une substance de type auxinique ainsi que des cytokinines. Pour cette raison, nous avons vérifié l'action qu'il exerce sur les tissus de feuilles d'endive.

Ce liquide naturel stimule la prolifération cellulaire ; il y a formation de cals volumineux surtout lorsque les milieux sont enrichis à 50 %. La néoformation des bourgeons va de pair avec l'importance du cal (Tableau 21) ; elle est d'abord stimulée puis inhibée au-delà de la concentration de 50 %. A cette dose, les bourgeons paraissent cependant plus

LAIT DE COCO ( EN % )	NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS PAR EXPLANTAT	% D'EXPLANTATS CAPABLES DE		LONGUEUR MOYENNE DES FEUILLES
		PROLIFERER	ORGANOGENES	
0	1,40	68,7	59,4	1,2
25	3,70	100,0	88,9	4,5
50	4,10	100,0	89,5	4,9
75	2,90	100,0	88,2	5,0

TABLEAU 21 : Action du lait de coco sur les phénomènes de prolifération et d'organogenèse manifestés par des fragments de feuilles d'endive.

vigoureux et la taille de leurs feuilles est supérieure à celle observée sur les explantats des lots témoins.

## B) ACTION DES PURINES ET DES PYRIMIDINES

Les résultats de SILBERGER et SKOOG (1953), confirmés par de nombreux chercheurs montrent qu'il existerait une relation entre les phénomènes de multiplication cellulaire et d'organogenèse d'une part et la capacité des tissus de synthétiser des acides nucléiques d'autre part. De même, selon NITSCH (1966), toute substance qui perturbe le métabolisme nucléaire, modifie le bourgeonnement. Nous nous sommes donc proposé de vérifier si les différentes bases entrant dans la composition des acides nucléiques pouvaient influencer sur la formation des bourgeons. Nous avons ensuite testé l'action exercée par quelques analogues structuraux susceptibles de perturber le métabolisme nucléaire.

### 1°) Action des bases puriques et pyrimidiques

L'adénine, l'uracile, la thymine ou la cytosine sont ajoutés au milieu de culture sous forme de solutions aqueuses. La guanine, peu soluble

dans l'eau, est solubilisée en milieu alcalin.

Aucune des bases n'affecte le développement des cals. Sur la formation des bourgeons, c'est l'adénine qui est la plus active, suivie par l'uracile et la thymine (Tableau 22) ; la guanine et la cytosine n'ayant pratiquement pas d'effets.

CONCENTRATIONS (en M/l)	0	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$
Adénine	1,60	2,53	2,81	2,05	1,49
Guanine	-	1,70	1,90	1,80	1,30
Acide inosinique	-	2,27	2,53	2,49	1,73
Uracile	-	1,96	2,55	2,43	1,77
Thymine	-	2,10	2,35	1,90	1,60
Cytosine	-	1,65	1,84	1,80	1,70
Acide orotique	-	1,85	2,14	2,28	1,81
Kinétine	-	3,60	4,10	4,20	-

TABLEAU 22 : Action des bases puriques et pyrimidiques ainsi que des acides inosinique et orotique sur le nombre moyen de bourgeons formés par des fragments de feuilles d'endive cultivés sur le milieu de base.

Nous avons également utilisé deux précurseurs, l'un, des bases puriques : l'acide inosinique et l'autre, des bases pyrimidiques : l'acide orotique (Tableau 22). Ils ont tous deux une action faible sur le bourgeonnement et toujours inférieure à celle de la base correspondante la plus active.

Les résultats obtenus mettent l'accent sur l'action exercée par l'adénine d'une part et par l'uracile et la thymine d'autre part. Ces composés stimulent la néoformation des bourgeons mais leur efficacité est nettement plus faible que celle de la kinétine.

Nous avons renouvelé ces expériences en employant un milieu nutritif plus riche, préconisé par MURASHIGE et SKOOG (1962) pour les tissus de tabac.

Nous avons utilisé l'auxine à la concentration de  $10^{-6}$  M et nous avons remplacé éventuellement la kinétine par les différentes bases dont nous désirions étudier l'action (Tableau 23). Dans ces conditions, la cytosine,

CONCENTRATIONS (en M/l)	0	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$
Adénine	3,7	4,0	4,4	6,9	6,0
Guanine	-	4,0	4,3	4,5	4,2
Uracile	-	4,3	6,1	6,0	5,2
Thymine	-	4,1	4,5	4,5	4,0
Cytosine	-	3,7	3,9	3,6	3,7
Kinétine	-	7,2	30,9	33,4	-

TABLEAU 23 : Action comparée des bases puriques et pyrimidiques sur le nombre moyen de bourgeons formés par des fragments de feuilles d'endive cultivés sur le milieu de Murashige et Skoog renfermant  $10^{-6}$  M/l d'AIA.

la guanine et la thymine sont pratiquement sans effet alors que l'uracile et l'adénine favorisent le bourgeonnement. Les stimulations observées sont cependant nettement plus faibles que celles manifestées par la kinétine.

Le fait que l'adénine et l'uracile soient les bases les plus actives et que la thymine, spécifique de l'ADN, le soit moins, laisse supposer que le rôle de l'ARN est prépondérant. Nous avons toutefois observé que les mélanges équimolaires des bases constitutives de l'ARN, à différentes concentrations, ne stimulent pas plus la néoformation des bourgeons que chacune des bases prises isolément. Par ailleurs, nous avons fait agir sur des fragments de feuilles d'endive de l'ARN de transfert qui possède une activité de type "cytokinine" sur certains tissus (KOVOOR et RUCH, 1964 ; HALL et Coll., 1967 ; HALL et SRIVASTAVA, 1968 ; RAVELOMANANA et Coll., 1975 ; RIEDEL et Coll., 1977). Cet ARN de transfert (ARN de levure de boulanger, Boehringer Mannheim réf. 15363), hydrolysé ou non, est pratiquement sans effet

sur les phénomènes d'organogenèse, quelles que soient les doses utilisées. Cela confirme l'expérience précédente réalisée en présence de mélanges équimolaires de bases mais souligne également que les bases mineures, à activité de type "cytokinine" qui entrent dans la composition de ces ARN de transfert, ne semblent pas agir sur la formation des bourgeons. Leur spécificité (KOVOR, 1968) pourrait expliquer leur manque d'activité sur le matériel utilisé. Il a d'ailleurs été montré que l'isopentenyladénine n'a qu'une action faible sur le bourgeonnement des tissus de feuilles d'endive (THOMAS et Coll., 1971).

#### 2°) Action de quelques analogues puriques et pyrimidiques

Une autre méthode pour préciser le rôle des bases puriques et pyrimidiques, consiste à bloquer les mécanismes dans lesquels elles sont impliquées par des analogues structuraux. Ces composés provoquent la formation d'acides nucléiques anormaux en s'intégrant à la place des bases correspondantes. Le principe consiste donc à essayer de bloquer les phénomènes d'organogenèse par ces substances et à tenter de lever l'inhibition par un excès de la base normale correspondante. En cas de réussite, cela montre que l'analogue intervient en tant qu'antimétabolite et on peut raisonnablement admettre que la base concernée joue un rôle essentiel dans le phénomène envisagé.

Des expériences préliminaires ont montré que lorsque les analogues suppriment totalement le bourgeonnement, les essais de reversion des inhibitions donnent des résultats très hétérogènes et même, dans bien des cas, s'avèrent infructueux. C'est pourquoi, de manière générale, nous employons les substances à des concentrations qui laissent subsister 20 % au moins des bourgeons par rapport aux explantats témoins. C'est également pour cette raison que BLAYDES (1966) par exemple, utilise les analogues dans la limite où l'inhibition produite est proportionnelle à la dose utilisée.

a) analogues puriques

α) action de la 2,6-diaminopurine et de la 8-azaguanine

Ces deux analogues des bases puriques réduisent la formation des bourgeons pour des concentrations relativement peu élevées (Figure 12).

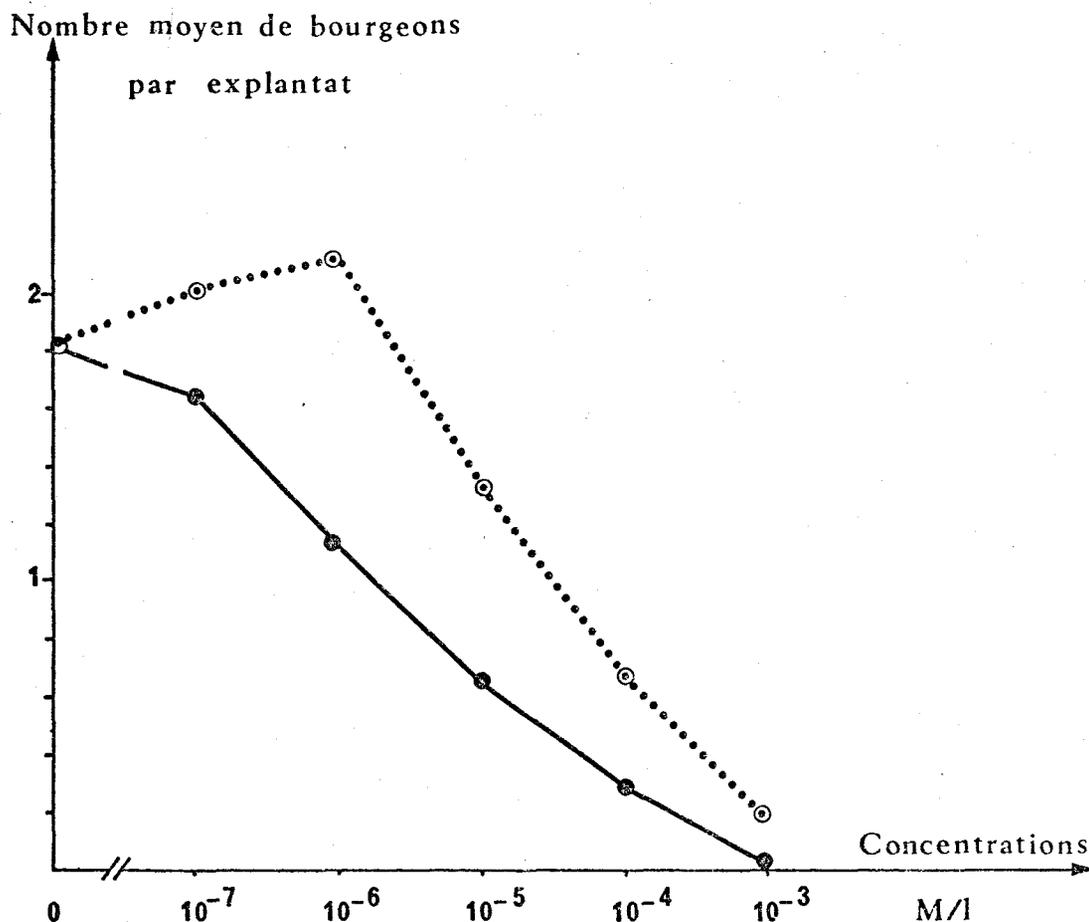


Figure 12 : Action de la 8-azaguanine [—] et de la 2,6-diaminopurine [.....] sur le bourgeonnement de fragments de feuilles d'endive.

La 2,6-diaminopurine provoque d'abord une petite augmentation du nombre des bourgeons puis l'inhibition se manifeste pour des concentrations supérieures à 10<sup>-6</sup> M. A partir de 10<sup>-5</sup> M, la prolifération cellulaire se ralentit et progressivement le nombre des explantats capables de proliférer diminue ; l'inhibition est totale à 10<sup>-3</sup> M. Bien qu'avec des modalités d'action voisines,

la 8-azaguanine s'est révélée être la plus active : ainsi, à  $10^{-7}$  M, il y a déjà une diminution de la formation des bourgeons.

*β) essais de suppression des inhibitions*

A  $10^{-4}$  M, la 2,6-diaminopurine (Tableau 24) réduit d'environ de

	NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS PAR EXPLANTAT	% D'EXPLANTATS	
		CAPABLES DE PROLIFERER	ORGANOGENES
Témoin .....	1,81	95,0	70,0
2,6-diaminopurine $10^{-4}$ .....	0,76	66,7	57,1
" " " + adénine $10^{-5}$ .....	1,47	13,6	13,6
" " " + adénine $10^{-4}$ .....	1,63	52,9	52,9
" " " + " $10^{-3}$ .....	0,71	36,4	18,2
" " " + adénosine $10^{-3}$ .....	1,99	90,9	66,7
" " " + acide adénylique $10^{-3}$ .....	1,79	88,4	63,2
Adénine ..... $10^{-5}$	2,31	86,7	69,6
" ..... $10^{-4}$	1,85	91,3	52,2
" ..... $10^{-3}$	1,26	86,7	48,1
Adénosine ..... $10^{-3}$	2,53	86,9	73,9
Acide adénylique ..... $10^{-3}$	2,84	90,9	90,9

TABLEAU 24: Action comparée de l'adénine et de ses dérivés (concentrations molaires) sur l'inhibition du bourgeonnement produite par la 2,6-diaminopurine employée à  $10^{-4}$  M/l.

moitié le nombre des bourgeons néoformés et diminue le nombre des explantats capables de proliférer et de former des organes. Cet effet peut être éliminé en grande partie par adjonction simultanée d'adénine ( $10^{-4}$  M) et en totalité par l'adénosine ou l'acide adénylique employés à  $10^{-3}$  M. Par ailleurs, l'inhibition produite par la 8-azaguanine (Tableau 25) peut être levée partiellement par la guanine et en totalité par la guanosine ou l'acide guanylique lorsque ces composés sont employés à des concentrations dix fois supérieures à celles de l'analogue.

	NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS PAR EXPLANTAT	% D'EXPLANTATS	
		CAPABLES DE PROLIFERER	ORGANOGENES
Témoin .....	1,81	93,3	79,2
8 - azaguanine $10^{-5}$ .....	0,65	45,0	45,0
" " " + guanine $10^{-4}$ .....	1,33	85,7	71,5
" " " + guanosine " .....	1,84	94,1	76,5
" " " + acide guanylique " .....	2,09	95,4	90,9
Guanine ..... $10^{-4}$	1,70	91,3	82,6
Guanosine ..... "	2,10	95,6	82,6
Acide guanylique ..... "	2,36	79,2	75,0

TABLEAU 25 : Action comparée de la guanine et de ses dérivés (concentrations molaires) sur l'inhibition du bourgeonnement produite par le 8-azaguanine employée à  $10^{-5}$ M/l.

La 2,6-diaminopurine et la 8-azaguanine peuvent donc être considérées comme des antimétabolites pour les tissus de feuilles d'endive puisque les dérivés de l'adénine dans un cas et de la guanine dans l'autre sont susceptibles de supprimer les inhibitions produites. Notons également que les inhibitions se manifestent en même temps sur la formation des bourgeons et sur le développement des cals, sans qu'il soit possible de dissocier les deux phénomènes.

b) analogues pyrimidiques

α) action du 6-azauracile et du 5-fluorouracile

A faibles concentrations, ces analogues augmentent légèrement le nombre des bourgeons mais sont inhibiteurs pour des doses égales ou supérieures à  $10^{-5}$ M ; le 6-azauracile étant plus actif que le 5-fluorouracile (Figure 13)

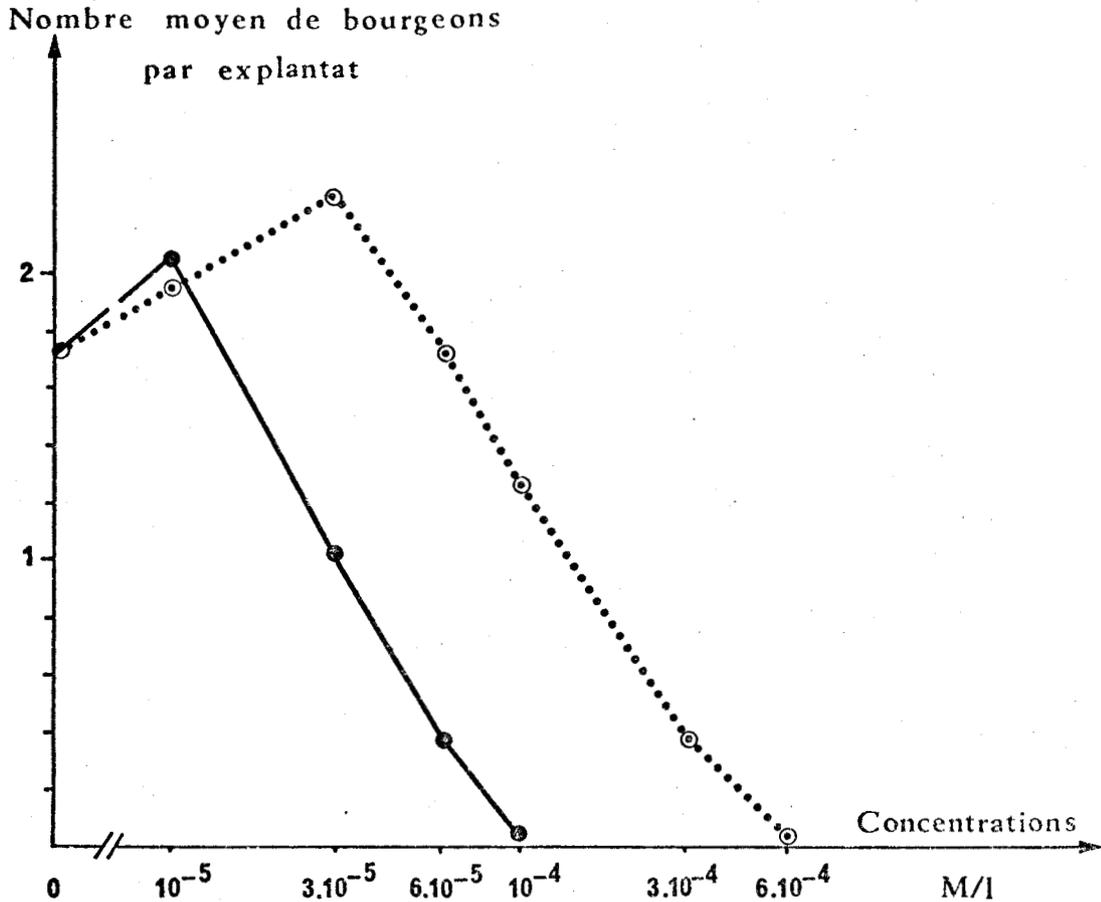


Figure 13 : Action du 6-azauracile [—] et du 5-fluorouracile [.....] sur le bourgeonnement de fragments de feuilles d'endive.

### *β) essais de suppression des inhibitions*

Employé à  $5 \cdot 10^{-5}$  M, le 6-azauracile réduit le bourgeonnement ainsi que le pourcentage des explantats capables de proliférer (Tableau 26). Cette action peut être totalement éliminée par les bases pyrimidiques ou leurs nucléosides ainsi que par l'acide orotique, précurseur de ces mêmes bases. Seules la cytosine et la thymine n'ont pas d'effet ; la thymidine ne lève que partiellement l'inhibition produite. C'est donc l'uracile, l'uridine, la cytidine et l'acide orotique qui suppriment le plus efficacement l'effet inhibiteur du 6-azauracile.

	NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS PAR EXPLANTAT	% D'EXPLANTATS	
		CAPABLES DE PROLIFERER	ORGANOGENES
Témoin .....	1,71	95,0	68,3
6 - azauracile $5 \cdot 10^{-5}$ .....	0,50	25,0	25,0
" " " + uracile $5 \cdot 10^{-4}$ .....	2,33	95,2	71,4
" " " + uridine " .....	1,69	69,6	56,5
" " " + cytosine " .....	0,74	52,2	43,5
" " " + cytidine " .....	1,66	80,8	53,3
" " " + thymine " .....	0,75	54,8	47,4
" " " + thymidine " .....	1,13	60,2	53,5
" " " + acide orotique " .....	2,17	91,7	83,3
Uracile ..... $5 \cdot 10^{-4}$	1,98	95,2	71,4
Uridine ..... "	1,82	86,4	56,3
Cytosine ..... "	1,74	83,3	62,5
Cytidine ..... "	1,83	82,6	65,5
Thymine ..... "	1,92	86,9	47,4
Thymidine ..... "	1,69	86,7	53,5
Ac. orotique ..... "	1,87	85,0	64,2

TABLEAU 26 : Action comparée des bases pyrimidiques, de leurs nucléosides et de l'acide orotique (concentrations molaires) sur l'inhibition du bourgeonnement produite par la 6-azauracile employée à  $5 \cdot 10^{-5}$  M/l.

La diminution du nombre des bourgeons, obtenue en présence de 5-fluorouracile à  $3 \cdot 10^{-4}$  M (Tableau 27), ne peut, par contre, être supprimée que partiellement par l'uridine, la cytidine et l'acide orotique ; les autres bases ou leurs nucléosides sont sans effet.

L'emploi des analogues pyrimidiques montre également que l'inhibition du bourgeonnement est liée à celle du cal.

	NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS PAR EXPLANTAT	% D'EXPLANTATS	
		CAPABLES DE PROLIFERER	ORGANOGENES
Témoin .....	1,73	95,4	68,2
5-fluorouracile $3 \cdot 10^{-4}$ .....	0,40	21,7	21,7
" " + uracile $3 \cdot 10^{-4}$ .....	0,67	45,8	29,2
" " + " $3 \cdot 10^{-3}$ .....	0,43	34,3	34,3
" " + uridine $3 \cdot 10^{-4}$ .....	1,04	56,5	47,8
" " + " $3 \cdot 10^{-3}$ .....	1,35	63,5	54,8
" " + cytosine $3 \cdot 10^{-4}$ .....	0,70	50,5	50,5
" " + " $3 \cdot 10^{-3}$ .....	1,45	90,5	80,9
" " + cytidine $3 \cdot 10^{-4}$ .....	0,71	60,0	60,0
" " + " $3 \cdot 10^{-3}$ .....	1,28	85,1	85,1
" " + thymidine $3 \cdot 10^{-4}$ .....	0,46	38,3	4,2
" " + " $3 \cdot 10^{-3}$ .....	0,52	38,3	8,3
" " + acide orotique $3 \cdot 10^{-4}$ .....	1,17	82,6	56,5
" " + " $3 \cdot 10^{-3}$ .....	1,58	91,7	83,3
Uracile ..... $3 \cdot 10^{-4}$	1,65	88,3	69,6
" ..... $3 \cdot 10^{-3}$	1,25	66,7	45,8
Uridine ..... $3 \cdot 10^{-4}$	1,74	95,6	72,7
" ..... $3 \cdot 10^{-3}$	2,43	100,0	90,5
Cytosine ..... $3 \cdot 10^{-4}$	1,88	90,9	63,6
" ..... $3 \cdot 10^{-3}$	1,70	81,8	72,7
Cytidine ..... $3 \cdot 10^{-4}$	1,73	94,1	70,6
" ..... $3 \cdot 10^{-3}$	2,23	92,9	64,7
Thymidine ..... $3 \cdot 10^{-4}$	1,30	88,6	86,9
" ..... $3 \cdot 10^{-3}$	1,56	73,9	60,9
Acide orotique ..... $3 \cdot 10^{-4}$	1,92	95,8	66,7
" " ..... $3 \cdot 10^{-3}$	1,39	82,6	56,5

TABLEAU 27 : Action comparée des bases pyrimidiques, de leurs nucléosides et de l'acide orotique (concentrations molaires) sur l'inhibition du bourgeonnement produite par le 5-fluorouracile employée à la concentration de  $3 \cdot 10^{-4}$  M/l.



c) influence de la kinétine sur l'inhibition produite par les différents analogues

Nous nous sommes ensuite demandé si la kinétine qui stimule nettement la formation des bourgeons, pouvait elle aussi réduire les effets inhibiteurs exercés par les différents analogues utilisés.

Les résultats obtenus (Tableau 28) montrent que la kinétine est

	NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS PAR EXPLANTAT	% D'EXPLANTATS	
		CAPABLES DE PROLIFERER	ORGANOGENES
Témoin .....	1,70	95,4	68,2
2,6-diaminopurine $10^{-4}M$ .....	0,76	66,7	57,1
"          " + kinétine $10^{-4}M$ .....	3,74	85,2	78,9
8 - azaguanine $10^{-5}M$ .....	0,65	45,0	45,0
"          " + kinétine $10^{-4}M$ .....	2,96	94,9	90,1
5 - fluorouracile $3 \cdot 10^{-4}M$ .....	0,40	21,7	21,7
"          " + kinétine $10^{-4}M$ .....	1,86	86,7	86,7
6 - azauracile $5 \cdot 10^{-5}M$ .....	0,50	25,0	25,0
"          " + kinétine $10^{-4}M$ .....	2,29	91,7	83,3
Kinétine ..... $10^{-4}M$	3,95	94,7	94,7

TABLEAU 28 : Influence de la kinétine sur l'inhibition du bourgeonnement produite par les analogues puriques ou pyrimidiques.

capable de lever les inhibitions produites par les analogues puriques et pyrimidiques. Toutefois, dans nos conditions expérimentales, le bourgeonnement n'atteint la valeur observée en présence de kinétine seule qu'avec l'emploi de 2,6-diaminopurine.

d) action de l'hydrazide maléique

L'hydrazide maléique découvert en 1949 par SCHOENE et HOFFMAN est un isomère de l'uracile et peut être considéré comme un analogue. Les effets biologiques de cette substance sont très variés et ont été énumérés dans

des travaux de mises au point (PILET, 1956a ; HOFFMAN et PARUPS, 1964)

On admet généralement que les propriétés inhibitrices de l'hydrazide maléique proviennent d'une action sur la division cellulaire (GREULACH et ATCHISON, 1950 ; DARLINGTON et Mc LEISH, 1951 ; GREULACH et HAESLOP, 1954 ; GIFFORD, 1956 ; HABER et WHITE, 1960 ; SACHS et LANG, 1961 ; NOODEN, 1969) où l'on observe souvent des anomalies chromosomiques (LOVELESS, 1953 ; Mc LEISH, 1953 ; CARLSON, 1954 ; MUKHERJEE, 1961 ; SLOTOVA et Coll., 1971). Le mécanisme d'action est encore mal connu et si l'hydrazide maléique semble présenter des effets multiples sur le métabolisme, trois hypothèses essentiellement peuvent être retenues. Il pourrait intervenir :

. Sur le métabolisme général : au niveau des sucres (GORIS et BOURIQUET, 1953 ; WIGGANS, 1954 ; ARNAULD et Coll., 1956) , des anthocyanes (CLEJJO et GASPAS, 1969) , de l'azote (NAGUIB, 1966), de l'activité respiratoire (NAYLOR et DAVIS, 1951 ; BAKER, 1961 ; BUSH et SIMS, 1974) et de certains systèmes enzymatiques (MOREL et DEMETRIADES, 1955 ; NOODEN, 1973 ; DENCHEVA et Coll., 1974).

. Sur le métabolisme auxinique et jouerait alors le rôle d'une anti-auxine (LEOPOLD et KLEIN, 1952). Cette interprétation qui semble dépendre de la nature des tissus (GAUTHERET, 1952a et b ; ABERG, 1953 ; FORESTER et Coll., 1955 ; HABER et WHITE, 1960 ; TAYLORSON et HOLM, 1961 ; HOFFMAN et PARUPS, 1964) est par ailleurs fort controversée (PILET, 1956a et b ; GALSTON et PURVES, 1960 ; GASPAS et CLEJJO, 1969).

. Sur le métabolisme nucléique : comme un antimétabolite de l'uracile (POVOLOTSKAYA et Coll., 1960 ; BUTENKO et BASKAKOV, 1961 ; BUTENKO, 1968 ; COUPLAND et PEEL, 1972) ou de la thymine (KIM et GREULACH, 1963).

Il pourrait être incorporé dans l'ARN (CALLAGHAN et Coll., 1962 ; COUPLAND et PEEL, 1971) et bloquer les synthèses d'acides nucléiques (POVOLOTSKAYA, 1961 ; BISWAS et Coll., 1968 ; RAKITIN et STRELNIKOVA, 1970 ; LOBOV, 1971 ; NOODEN, 1972 ; RAKITIN et Coll., 1974).

Nous nous sommes proposé de vérifier si cette substance pouvait être considérée comme un antimétabolite d'une des bases entrant dans la composition des acides nucléiques et si elle pouvait modifier l'efficacité de l'auxine sur la formation des racines. Nous avons ensuite essayé d'agir sur les phénomènes d'inhibition observés en associant l'hydrazide maléique à la kinétine.

*a) action conjuguée de l'hydrazide maléique et de différentes bases*

L'hydrazide maléique (Tableau 29) stimule le bourgeonnement jusqu'à la dose de  $10^{-6}$  M et au-delà, il y a inhibition, qui devient totale à  $10^{-4}$  M. Par ailleurs, nous avons déjà signalé (Tableau 22) que l'uracile augmente le nombre des bourgeons néoformés jusqu'à la concentration optimale de  $10^{-4}$  M.

		Hydrazide maléique (M/l)					
		0	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$10^{-4}$
Uracile (M/l)	0	2,20	1,87	3,17	2,08	0,37	0
	$10^{-6}$	2,54	2,08	3,26	2,86	0,17	0
	$10^{-5}$	3,32	2,50	3,95	5,47	0,34	0,10
	$10^{-4}$	3,95	4,17	4,37	3,66	1,47	0,10
	$10^{-3}$	3,23	3,33	4,26	3,81	1,04	0,15

TABEAU 29: Action conjuguée de l'hydrazide maléique et de l'uracile sur le nombre moyen de bourgeons produits par des fragments de feuilles d'endive.

En associant ces deux substances (Tableau 29), les résultats obtenus diffèrent selon les concentrations d'hydrazide maléique employées.

. Lorsque l'hydrazide maléique augmente le nombre des bourgeons néoformés, l'uracile peut en renforcer l'action.

. Quand l'hydrazide maléique réduit la formation des bourgeons, l'action de l'uracile dépend de l'importance de l'inhibition exercée. Si elle est faible ( $10^{-5}M$ ), l'uracile peut, non seulement la supprimer, mais aussi provoquer une nette augmentation du nombre des organes. Si elle est plus accentuée ( $5.10^{-5}M$ ), l'uracile ne la lève que partiellement. Enfin, à  $10^{-4}M$ , la toxicité de l'hydrazide maléique l'emporte et l'uracile n'a plus aucune efficacité.

Afin de préciser le rôle de l'uracile et de vérifier s'il exerce bien une action spécifique, nous avons cultivé les fragments de feuilles d'endive en présence de concentrations inhibitrices d'hydrazide maléique ( $2.10^{-5}M$  et  $5.10^{-5}M$ ) auxquelles nous avons associé différentes bases puriques et pyrimidiques ainsi que leurs nucléosides.

. A  $2.10^{-5}M$ , l'hydrazide maléique diminue de plus de moitié le nombre des organes formés (Tableau 30). L'inhibition est supprimée en grande partie par l'uracile et en totalité par l'uridine. La cytosine, la thymine et la thymidine n'ont que peu d'effet ; les autres bases ou nucléosides sont sans action.

	NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS PAR EXPLANTAT	% D'EXPLANTATS	
		CAPABLES DE PROLIFERER	ORGANOGENES
Témoin .....	2,55	71,4	71,4
Hydrazide maléique $2,5 \cdot 10^{-5}$ .....	1,03	76,5	47,1
" " " + uracile $2,5 \cdot 10^{-4}$ .....	2,20	80,0	75,0
" " " + uridine " .....	2,46	80,9	72,7
" " " + cytosine " .....	1,09	76,4	51,8
" " " + cytidine " .....	1,31	74,2	36,8
" " " + adénine " .....	1,25	75,0	50,0
" " " + adénosine " .....	1,48	76,2	52,4
" " " + guanine " .....	1,30	73,3	52,2
" " " + guanosine " .....	1,44	78,9	58,4
" " " + thymine " .....	1,42	75,0	52,5
" " " + thymidine " .....	1,50	78,2	59,1
Uracile ..... $2,5 \cdot 10^{-4}$	2,41	90,9	81,8
Uridine ..... "	2,64	77,3	68,2
Cytosine ..... "	2,61	77,8	61,1
Cytidine ..... "	2,81	85,7	61,9
Adénine ..... "	2,40	85,0	75,0
Adénosine ..... "	2,38	83,3	66,6
Guanine ..... "	1,92	69,9	60,9
Guanosine ..... "	2,05	85,7	76,2
Thymine ..... "	2,33	83,3	72,2
Thymidine ..... "	2,53	100,0	90,0

TABLEAU 30: Action comparée des bases puriques et pyrimidiques et de leurs nucléosides (concentrations molaires) sur l'inhibition du bourgeonnement produite par l'hydrazide maléique à la concentration de  $2,5 \cdot 10^{-5}$  M/l.

. En présence de  $5 \cdot 10^{-5}$  M d'hydrazide maléique, l'uracile et l'uridine ne réduisent que partiellement l'inhibition (Tableau 31) et les autres précurseurs d'acides nucléiques sont totalement inefficaces.

Suivant les concentrations utilisées, la diminution du bourgeonnement peut donc être supprimée totalement ou partiellement par l'uracile ou son nucléoside. On notera également que l'hydrazide maléique à  $2,5 \cdot 10^{-5}$  M n'agit pas sur la prolifération cellulaire ; en effet, il n'affecte pas le pourcentage des explantats capables de proliférer (Tableau 30). Les levées d'inhibition concernent donc essentiellement la néoformation des bourgeons.

	NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS PAR EXPLANTAT	% D'EXPLANTATS	
		CAPABLES DE PROLIFERER	ORGANOGENES
Témoin .....	2,55	71,4	71,4
Hydrazide maléique $5 \cdot 10^{-5}$ .....	0,42	58,4	26,9
" " " + uracile $5 \cdot 10^{-4}$ .....	1,49	70,6	50,4
" " " + uridine " .....	1,65	72,0	56,0
" " " + cytosine " .....	0,63	68,4	31,6
" " " + cytidine " .....	0,56	68,2	18,2
" " " + adénine " .....	0,26	47,8	13,0
" " " + adénosine " .....	0,43	47,6	23,8
" " " + guanine " .....	0,35	70,0	35,0
" " " + guanosine " .....	0,49	73,7	32,6
" " " + thymine " .....	0,62	72,3	27,3
" " " + thymidine " .....	0,52	74,9	38,1
Uracile..... $5 \cdot 10^{-4}$	1,78	78,3	69,6
Uridine .....	2,10	89,5	78,9
Cytosine .....	1,71	77,8	61,1
Cytidine .....	2,05	80,0	60,0
Adénine .....	1,87	72,2	61,1
Adénosine .....	2,05	75,0	65,0
Guanine .....	1,91	85,7	85,7
Guanosine .....	2,06	88,5	71,9
Thymine .....	2,13	90,0	90,0
Thymidine .....	2,27	92,0	92,0

TABLEAU 31 : Action comparée des bases puriques et pyrimidiques et de leurs nucléosides (concentrations molaires) sur l'inhibition du bourgeonnement produite par l'hydrazide maléique à la concentration de  $5 \cdot 10^{-4}$  M/l.

B) action conjuguée de l'hydrazide maléique et de l'acide indolyl - acétique

L'auxine inhibe la formation des bourgeons et stimule celle des racines. C'est pourquoi nous avons analysé l'action de cette hormone associée à l'hydrazide maléique, à la fois sur le bourgeonnement et la rhizogénèse des tissus de feuilles d'endive.



Les résultats obtenus sur la néoformation des bourgeons (Tableau 32) montrent, dans leur ensemble, que l'acide indolyl-acétique diminue le nombre des bourgeons obtenus en présence d'hydrazide maléique.

		Hydrazide maléique (M/l)					
		0	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$
Acide indolyl-acétique (M/l)	0	2,41	2,87	3,68	2,67	1,22	0,39
	$10^{-7}$	3,15	2,67	2,27	2,29	1,95	0,32
	$10^{-6}$	1,42	1,46	1,58	2,37	1,67	0,21
	$10^{-5}$	1,30	1,48	1,50	2,10	1,96	0,50
	$10^{-4}$	0,35	0,39	0,39	0,46	0,50	0,42

TABLEAU 32 : Action conjuguée de l'hydrazide maléique et de l'acide indolyl-acétique sur le nombre moyen de bourgeons produits par des fragments de feuilles d'endive.

Les effets produits sur la formation des racines sont différents (Tableau 33). L'hydrazide maléique augmente de manière faible mais reproductible le nombre des racines néoformées jusqu'à  $10^{-6}$  M et au-delà, il y a inhibition qui est totale à  $2,5 \cdot 10^{-5}$  M. Associée à de faibles concentrations d'hydrazide maléique (inférieures ou égales à  $10^{-6}$  M), l'auxine n'a guère d'influence sur la formation des racines dont le nombre est tout au plus légèrement accru. Par contre, les fortes concentrations d'hydrazide maléique diminuent nettement le nombre des racines obtenues en présence d'auxine.

		Hydrazide maléique (M/l)					
		0	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$
Acide indolyl-acétique (M/l)	0	0,42	0,74	0,77	0,65	0	0
	$10^{-7}$	1,45	1,46	1,22	0,80	0	0
	$10^{-6}$	1,92	2,21	1,29	1,09	0,50	0
	$10^{-5}$	2,07	1,92	2,41	1,80	1,17	0
	$10^{-4}$	7,15	7,56	7,83	5,87	3,78	0,29

TABLEAU 33 : Action conjuguée de l'hydrazide maléique et de l'acide indolyl-acétique sur le nombre moyen de racines produites par des fragments de feuilles d'endive.

### *γ) action conjuguée de l'hydrazide maléique et de la kinétine*

Si en présence de kinétine on obtient d'autant plus de bourgeons que la dose est plus élevée, les effets de l'hydrazide maléique, comme nous les avons décrits, sont très différents.

L'association de ces substances entraîne la formation de bourgeons en nombre plus important lorsque les concentrations d'hydrazide maléique sont stimulantes (Tableau 34). De plus, la kinétine réduit les effets inhibiteurs de l'hydrazide maléique et provoque même l'apparition de bourgeons en présence de  $10^{-4}$  M d'hydrazide maléique, dose qui empêche normalement la formation des organes.

		Hydrazide maléique (M/l)					
		0	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$10^{-4}$
Kinétine (M/l)	0	2,30	2,91	3,85	1,98	0,51	0
	$10^{-6}$	3,93	5,30	5,70	4,84	0,99	0
	$10^{-5}$	4,70	6,82	6,51	5,70	1,44	0,98
	$10^{-4}$	5,07	4,94	5,03	6,04	4,70	2,12

TABLEAU 34 : Action conjuguée de l'hydrazide maléique et de la kinétine sur le nombre moyen de bourgeons produits par des fragments de feuilles d'endive.

### C) DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les composés auxiniques, employés à faibles doses, stimulent faiblement la prolifération cellulaire et par conséquent la néoformation des bourgeons mais, pour des doses plus importantes, ils augmentent considérablement le nombre des racines néoformées. La kinétine, au contraire, favorise nettement la néoformation des bourgeons. En associant de faibles doses d'acide indolyl-acétique à de la kinétine, on constate que le nombre de bourgeons s'accroît fortement. La kinétine peut également lever l'inhibition produite par des concentrations élevées d'auxine. Par ailleurs, comme c'est classique, la kinétine réduit le nombre des racines formées en présence d'auxine et peut même, à fortes doses, supprimer presque totalement l'effet stimulateur de l'auxine (VASSEUR, 1965a). De nombreux travaux, dont ceux de TOPONI (1963b) confirment les résultats que nous avons obtenus et sont en accord avec la théorie de SKOOG. En effet

si la kinétine peut, à faibles concentrations, avoir des effets rhizogènes (SKINNER et SHIVE, 1955 ; ALLSOPP et SZWEYKOWSKA, 1960 ; FRIES, 1960), le plus souvent elle inhibe la formation des racines (HUMPHRIES, 1960 ; PILET, 1961b ; TORREY, 1962 ; BONNET et TORREY, 1965 ; HEIDE, 1965 ; BIGOT, 1966a ; GUILLOT, 1967 ; LEROUX, 1973) et favorise la formation des bourgeons (TORREY, 1956 ; DANCKWARDT-LILLIESTROM, 1957 ; PLUMMER et LECPOLD, 1957 ; SCHRAUDOLF et REINERT, 1959 ; HEIDE, 1965, BIGOT, 1966a, BIGOT et CHLYAH, 1970 ; VENVERLOO, 1973 ; HUNAUULT, 1974). De plus, les tissus végétaux réagissent souvent qualitativement au mélange auxine-kinétine (MILLER et SKOOG, 1953 ; SKOOG, 1954 ; DE ROPP, 1956 ; SKOOG et MILLER, 1957 ; DANCKWARDT-LILLIESTROM, 1957 ; GAUTHERET, 1960a et b, 1966 ; TOPONI, 1963b ; SOROKIN et THIMANN, 1964 ; HEIDE, 1965 ; FAULET, 1966 ; RINGE et NITSCH, 1968 ; YONEDA, 1969 ; BHOJWANI et JOHRI, 1970 ; MAROTTI, 1970 ; TRAN THANH VAN et DRIRA, 1970 ; RAO et Coll., 1973 ; TRAN THANH VAN et Coll., 1974 ; LUTZ et BELIN, 1974 a et b ; KARTHA et Coll., 1975 ; PIERIK et STEGMANS, 1975 ; WELANDER, 1977 ; ...). L'énumération de ces travaux montre bien que dans de très nombreux cas, la régulation des phénomènes d'organogenèse nécessite la présence simultanée d'auxine et de cytokinine. Des résultats différents ont néanmoins été obtenus par GWOZDZ et SZWEYKOWSKA (1967) sur des fragments de racines d'endive. Ces auteurs constatent qu'à faibles concentrations, la kinétine stimule le bourgeonnement et la néoformation des racines, alors que pour des doses plus fortes, elle inhibe la formation des organes. Il est cependant possible que ces différences soient le reflet de la teneur des tissus en substances de croissance endogènes.

La kinétine et l'auxine peuvent également intervenir sur la polarité manifestée par les tissus de feuilles d'endive. La cytokinine provoque l'apparition d'un nombre de bourgeons proportionnellement plus

important à l'apex des explantats. Cela est peut-être la conséquence du rôle exercé par la kinétine sur la prolifération cellulaire ou la circulation des substances de croissance endogènes. Le pourcentage des bourgeons apicaux augmente aussi lorsque les concentrations d'auxine s'élèvent et à  $10^{-4}$  M les quelques bourgeons qui apparaissent sont uniquement situés à la partie apicale des fragments. On peut penser, dans ce cas, que si l'auxine circule de l'apex vers la base des explantats, c'est au niveau du cal où elle s'accumule que les bourgeons sont inhibés en premier. De manière générale, le pourcentage des bourgeons apicaux s'accroît lorsque les conditions sont défavorables ou au contraire très favorables.

Le lait de coco, dont les propriétés stimulantes ont été découvertes pour la première fois par VAN OVERBECK et Coll. (1941), favorise généralement la prolifération cellulaire (DUHAMET, 1951 ; 1952 ; KOBLITZ, 1958) et a permis la culture de nombreux tissus de dicotylédones (NOBECOURT, 1957 ; GAUTHERET, 1952c ; 1959). Il peut exercer également une action favorable sur l'organogénèse des tissus de tabac (SKOOG et TSUI, 1948) et comme nous l'avons montré, augmenter le bourgeonnement des tissus de feuilles étiolées d'endive. Ce serait la présence d'auxines et de cytokinines au sein de ce liquide naturel (STEWART et SHANTZ, 1959 ; KOVOOR, 1962 ; 1964) qui expliquerait en grande partie ses propriétés organogènes.

En présence de gibbérellines, les effets biologiques observés sont très variés. DIGBY et WAREING (1966) montrent que l'acide gibbérellique intensifie la prolifération cellulaire alors que l'auxine favorise la différenciation (WAREING, 1958) ; mais, selon KATO (1953 ; 1958), l'acide gibbérellique n'est pas capable d'induire la formation des cals sur des explantats de tomate ou de tournesol. De même, NETIEN (1959) constate que

cette substance ne peut activer la prolifération du parenchyme vasculaire de topinambour et ceci quelle que soit la dose utilisée. SPANJERSBERG et GAUTHERET (1964) aboutissent à des conclusions semblables sur des fragments de rhizome de topinambour : l'acide gibbérellique à lui seul ne provoque aucune prolifération mais renforce les propriétés callogènes de l'acide naphtyl-acétique et n'agirait donc qu'en présence d'auxine. Si dans certains cas, l'acide gibbérellique stimule la formation des bourgeons (PAULET et NITSCH, 1959 ; KEFFORD et CASO, 1972), il semble, de manière générale, qu'il puisse être considéré comme une substance inhibant le bourgeonnement. En présence d'auxine aussi, les effets observés sont très variables. L'acide gibbérellique lève l'inhibition du bourgeonnement produite par l'acide indolyl-acétique (KEFFORD et CASO, 1972) ou l'acide naphtyl-acétique (HEIDE, 1969). De plus, l'acide gibbérellique réduit le nombre des racines formées en présence d'acide naphtyl-acétique (HEIDE, 1969). Par opposition, SCHRAUDOLF et REINERT (1959) montrent que le 2,4-D restaure, non seulement la formation des racines, mais aussi celle des bourgeons sur des feuilles de begonia traitées par l'acide gibbérellique ; fait d'autant plus curieux, qu'à la dose employée, le 2,4-D, à lui seul, inhibe le bourgeonnement. Sur les tissus de feuilles d'endive, l'acide gibbérellique stimule faiblement la formation des racines sans avoir d'effet marqué sur le bourgeonnement et au-delà de  $10^{-5}$ M, cette substance devient inhibitrice. En présence d'auxine, elle accentue les effets observés sur la formation des bourgeons et des racines.

Dans un certain nombre de cas, l'AG<sub>3</sub> bouleverse profondément le métabolisme auxinique et ses effets peuvent être interprétés comme des modifications de la teneur en auxine endogène. Toutefois, l'hypothèse selon laquelle l'acide gibbérellique aurait un rôle protecteur de l'auxine n'explique pas tout; certes, cette hypothèse peut être invoquée quand

il y a synergie entre auxine et gibbérelline (cas de nos résultats en particulier) mais c'est plus difficile quand il s'agit d'antagonisme et impossible quand les hormones ont des effets qualitativement différents. Ainsi, KATO et KATSUMI (1958) pensent que l'AG<sub>3</sub> n'exercerait pas d'action inhibitrice sur la destruction "in vitro" de l'auxine et même que cette hormone n'agirait pas par l'intermédiaire de l'auxine (KATO, 1958). HILLMAN et PURVES (1961) montrent également que les actions primaires de l'acide gibbérellique et de l'auxine ne sont pas liées. Le mode d'action de l'acide gibbérellique est sans doute plus complexe et peut intervenir à de multiples niveaux du métabolisme (LABORIE, 1963 ; JONES, 1973). Sur des feuilles de Begonia rex par exemple (CHLYAH, 1972) une simple addition de saccharose (3 %) peut supprimer partiellement l'inhibition de la formation des bourgeons provoquée par l'acide gibbérellique. On peut donc penser que l'inhibition due à l'acide gibbérellique est liée au métabolisme glucidique, comme elle pourrait l'être également avec d'autres facteurs tels que la lumière (GAUTHERET, 1969). Certains auteurs suggèrent également que si les gibbérellines n'interviennent pas directement sur le métabolisme auxinique, leur rôle régulateur pourrait se faire par l'intermédiaire de composés phénoliques (GORTNER et Coll., 1958 ; GALSTON et WARBURG, 1959 ; LEYH et Coll., 1963 ; GASPAR et Coll., 1964 ; 1965).

Les résultats obtenus à l'aide des analogues structuraux des bases puriques et pyrimidiques ont mis en relief un certain nombre de faits. A faibles doses, les analogues employés augmentent le nombre des bourgeons. Une telle stimulation par les faibles concentrations d'analogues des bases semble d'ailleurs un phénomène assez général (SCHAEFFER et SOROKIN (1966). A doses plus importantes, il y a inhibition qui peut être supprimée, selon la nature de l'analogue utilisé.

Les analogues puriques : 2,6-diaminopurine et 8-azaguanine inhibent la formation des bourgeons, inhibition qui peut être empêchée par l'adénine et la guanine. Bien que le mécanisme d'action au niveau cellulaire soit encore mal connu, il est établi, chez les végétaux supérieurs, que les analogues puriques sont des inhibiteurs de la synthèse des purines et peuvent être incorporés dans l'ARN (OTAKA et Coll., 1961 ; HEYES, 1963b ; RAGHAVAN, 1965 ; WEINSTEIN et GRUNSBURG, 1965 ; LEVIN, 1966 ; KEY, 1966 ; ZIMMERMAN, 1968) ou dans l'ADN (MANDEL et Coll., 1954 ; SMITH et MATTHEWS, 1957). Nos résultats sont en accord avec ceux de MILLER (1953), PAULET (1965), DOERSCHUG (1968) et BIGOT (1971). De manière générale, les effets de ces analogues sont supprimés par un apport du métabolite normal. Par contre, les réversions des inhibitions produites par les analogues pyrimidiques sont souvent plus complexes.

Les travaux concernant les effets inhibiteurs du 6-azauracile sont assez peu nombreux et portent par exemple sur les bourgeons axillaires de tabac (SCHAEFFER et SOROKIN, 1965), les gamétophytes d'*Asplenium nidus* (RAGHAVAN, 1965) ou la floraison de *Xanthium pennsylvanicum* (COLLINS et Coll., 1963 ; SEARLE, 1965). Le plus souvent, les inhibitions peuvent être supprimées par l'uracile ou l'uridine. Dans le cas des tissus de tabac, la croissance arrêtée par le 6-azauracile peut être rétablie totalement par l'uridine et l'acide orotique et en partie seulement par l'uracile (SCHAEFFER et SOROKIN, 1966). Chez *Spirodela pennsylvanicum*, la division, l'élongation et la différenciation cellulaire peuvent être bloquées par le 6-azauracile. La thymine peut réverser l'inhibition exercée sur la division cellulaire mais elle est incapable d'éliminer celle produite sur l'élongation et la différenciation cellulaire. L'uracile par contre, peut rétablir l'ensemble des processus (RIMON et GALUN, 1967). Par ailleurs, selon GUILLOT (1966b),



la possibilité de supprimer l'inhibition de la formation des racines dépend de la concentration en 6-azauracile qui a servi au traitement des segments d'hypocotyles de jeunes plants de tomate. Les différences de comportement semblent donc liées essentiellement à la nature des phénomènes observés, au matériel utilisé, ainsi qu'à la concentration de l'analogue employé. Les résultats obtenus avec les fragments de feuilles d'endive cultivés en présence de  $10^{-5}$ M de 6-azauracile, montrent que la diminution du nombre des bourgeons peut être éliminée par l'apport simultané d'uracile ou d'uridine mais aussi par la cytidine ou l'acide orotique. Le 6-azauracile intervenant dans le métabolisme des nucléotides et des acides nucléiques (ROSS, 1964 ; BUIATTI, 1968 ; HOWLAND et YETTE, 1975), serait un antimétabolite au sens large. Son action pourrait consister en une suppression de la synthèse d'uridine 5'-monophosphate ainsi qu'en une inhibition de la décarboxylation de l'acide orotique qui s'accumulerait alors dans les tissus (BROCKMAN et ANDERSON, 1963 ; ROSS, 1964).

Le 5-fluorouracile peut perturber la synthèse d'ARN (CHERRY et HUYSTEE, 1965 ; KEY, 1966 ; GRESSEL et GALUN, 1966 ; RIMON et Coll., 1969 ; PARANJOTHY et WAREING, 1971 ; ROSE et SETTERFIELD, 1971) et d'ARN (ZEEVART, 1962 ; BONNER et ZEEVART, 1962 ; NITSAN et LANG, 1965). Il peut s'incorporer à la place de l'uracile (HEIDELBERGER, 1965) et son action s'exerce souvent au niveau du métabolisme de l'uracile et de la thymine (COHEN et Coll., 1958). Les effets observés en présence de cet analogue sont souvent très variables. Si dans certains cas, il n'est pas inhibiteur (ROSE et Coll., 1970), dans d'autres, il freine ou arrête la croissance des végétaux tels que les protonemas d'*Asplenium nidus* (COHEN et BARNER, 1956), les algues unicellulaires (KIM et GREULACH, 1963), les feuilles de *Xanthium* (CHERRY et HUYSTEE, 1965) et les fragments de topinambour (ROSE et SETTERFIELD, 1971). Par ailleurs, il a été montré que le 5-fluorouracile perturbe les divisions cellulaires (DEYSSON et

TRUHAUT, 1962) ralentit la rhizogenèse des fragments de topinambour cultivés "in vitro" en présence d'acide naphthyl-acétique (GINSBURG, 1966) ainsi que la morphogenèse des prothalles d'*Asplenium nidus* (RAGHAVAN, 1968).

L'efficacité des différentes bases pyrimidiques sur les inhibitions produites par cet analogue varie également en fonction de la nature des tissus. Ainsi, avec des fragments de pomme de terre, l'arrêt de la croissance exercé par le 5-fluorouracile est levé partiellement par l'uracile et non par la thymine ou l'acide orotique (OKASAWA, 1969). La prolifération d'explantats de topinambour est supprimée par cet analogue mais seule l'adénine peut en empêcher l'effet ; les autres bases puriques ou pyrimidiques n'ont qu'une action faible (GARESTIER et Coll., 1970). De même, la croissance de *Chlorella pyrenoidosa* (KIM et GREULACH, 1963) peut être rétablie par différentes bases dont l'ordre d'efficacité est le suivant : guanine, cytosine, adénine, uracile et thymine qui est la moins active. Enfin, si le 5-fluorouracile peut affecter la division cellulaire et la différenciation de *Spirodela oligorrhiza*, cet effet ne peut être éliminé ni par l'uracile, ni par la thymine (RIMON et GALUN, 1967). De plus, l'efficacité de cet analogue sur des fragments de tige de tabac dépend des concentrations utilisées (PAULET, 1965). Ainsi, à  $10^{-5}$ M, le 5-fluorouracile affecte à la fois la néoformation des bourgeons et le développement des cals. L'addition d'uracile ou d'acide orotique permet de rétablir la formation des cals mais pas celle des bourgeons ; l'apport de thymine ou de cytosine est inefficace. A  $10^{-3}$ M, le développement des cals est supprimé totalement. L'adjonction d'acide orotique lève cette inhibition mais laisse subsister celle exercée sur la formation des bourgeons. Les résultats que nous avons obtenus, en présence de cet analogue, représentent alors un élément supplémentaire à ajouter à la diversité des effets produits. En effet, si l'inhibition de la formation des bourgeons ne peut être éliminée que partiellement, elle l'est aussi bien par l'uracile que par la cytidine et l'acide orotique.

En plus de l'absence de spécificité de ces analogues pyrimidiques, il faut noter que dans le cas du 5-fluorouracile, les suppressions d'inhibition ne sont que partielles. Il est alors permis de se demander si l'analogue n'intervient pas dans le métabolisme autrement que par son rôle d'antimétabolite. Dans la plupart des cas, les analogues doivent être transformés en nucléosides et en nucléotides et subissent, comme les bases normales employées simultanément, des transformations métaboliques importantes. En outre, ces substances sont vraisemblablement absorbées à des vitesses différentes. Il n'est donc guère possible, sans étude biochimique détaillée, de donner une explication des levées partielles d'inhibition.

Un isomère de l'uracile, l'hydrazide maléique que nous avons étudié en même temps que les analogues structuraux des bases, présente des effets qui ont donné lieu à quelques hypothèses. Parmi celles-ci, nous avons cherché à vérifier si cette substance peut agir par l'intermédiaire de l'auxine ou des acides nucléiques. L'hydrazide maléique ne manifeste pas d'interactions spectaculaires avec l'auxine. On peut cependant retenir qu'il accentue l'effet inhibiteur de l'acide indolyl-acétique sur la néoformation des bourgeons et qu'employé à fortes concentrations, il diminue nettement son effet rhizogène. Toutefois, les résultats obtenus ne permettent pas de conclure avec certitude que l'hydrazide maléique intervient ou non par l'intermédiaire du métabolisme auxinique. Par contre, il peut être considéré comme un antimétabolite de l'uracile car cette base est la seule à pouvoir empêcher les inhibitions. L'hydrazide maléique présente aussi la particularité, contrairement aux autres analogues employés, de pouvoir réduire le nombre des bourgeons sans affecter le développement du cal.

La kinétine supprime les inhibitions du bourgeonnement dues à l'hydrazide maléique et aux différents analogues utilisés. Quelques travaux seule-

ment font état des résultats obtenus en présence d'inhibiteurs et de kinétine. Par exemple, sur les tissus de soja (BLAYDES, 1966), la diminution du bourgeonnement produite par le 2,6-diaminopurine ne peut être reversée par la kinétine, pas plus que celle exercée sur les fragments de feuilles de begonia ne peut être levée par la 6-benzylaminopurine (BIGOT et NITSCH, 1968). Par contre, la réduction de la formation des bourgeons produite par la 2,6-diaminopurine sur des segments de *Chondrilla juncea* (KEFFORD et CASO, 1972) est supprimée par la kinétine. Les inhibitions dues à la 8-azaguanine ont également pu être empêchées dans un certain nombre de cas (MOEVUS, 1959 ; KATSUMI, 1963 ; BLAYDES, 1966). De la même manière, nos résultats montrent que la kinétine peut stimuler la néoformation des bourgeons par un processus normalement bloqué par différents analogues.

E

E

E

Ces résultats dans leur ensemble précisent donc l'intervention des hormones végétales dans les phénomènes d'organogenèse des tissus de feuilles d'endive et confirment le lien existant entre la formation des bourgeons et le métabolisme nucléaire.

DEUXIEME PARTIE

---

FORMATION DES BOURGEONS

EN FONCTION DE

CRITERES BIOCHIMIQUES

# CHAPITRE 1

## ETUDE DE CRITERES BIOCHIMIQUES

### AU COURS DU BOURGEONNEMENT

Jusqu'à présent, nous nous sommes efforcé de montrer l'action exercée, sur la néoformation des bourgeons, par différentes substances de croissance ajoutées au milieu de culture. Pour avoir une idée plus précise des mécanismes liés à la morphogenèse, il est nécessaire d'essayer de préciser les modifications qui se produisent au sein des tissus. L'analyse cinétique de toutes les transformations biochimiques n'étant pas possible, nous nous sommes limité à l'étude de quelques critères même si leur choix pouvait paraître parfois assez arbitraire. La croissance étant généralement définie comme une augmentation irréversible de taille et de poids, nous avons suivi l'évolution du poids de matière fraîche et de matière sèche au cours de la culture des fragments de feuilles. De plus, il nous a paru utile de préciser l'évolution des constituants fondamentaux tels que l'azote et les acides nucléiques, en nous attachant plus particulièrement au métabolisme de l'ARN qui semble orienter les phénomènes d'organogenèse.

## A) EVOLUTION DES CRITERES UTILISES

### 1°) Evolution du poids de matière fraîche et de matière sèche

Le poids de matière sèche augmente régulièrement au cours de la culture, alors que le poids de matière fraîche diminue (Figure 14). Cette baisse reflète en fait la déshydratation des tissus au cours de la culture.

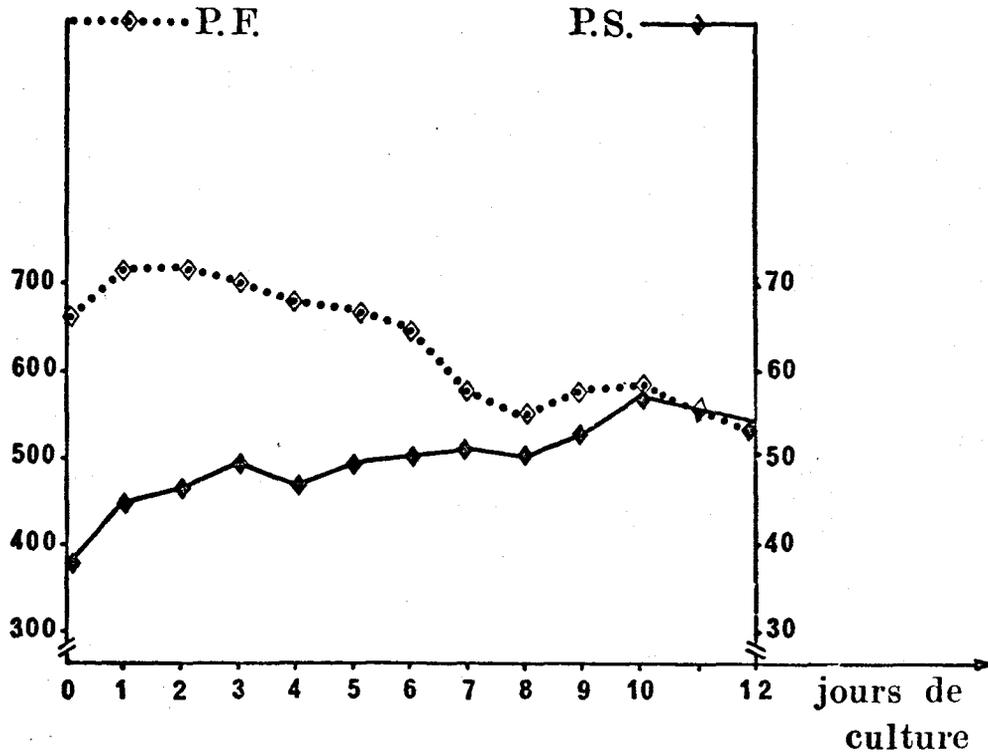


Figure 14 : Evolution du poids de matière fraîche (P.F.) et du poids de matière sèche (P.S.) au cours de la culture de fragments de feuilles d'endive. Les résultats sont exprimés en mg/explantat.

### 2°) Evolution des teneurs en azote

La quantité d'azote total augmente jusqu'au 10<sup>e</sup> jour de culture puis baisse ensuite légèrement (Figure 15). Cette augmentation est due tantôt à l'azote soluble, tantôt à l'azote protéique. Afin de préciser leurs variations relatives, nous avons évalué l'azote protéique par rapport à l'azote total (Figure 16). Pendant le 1<sup>er</sup> jour, il y a une baisse de la quantité d'azote protéique qui retrouve sa valeur initiale dès le 2<sup>e</sup> jour.

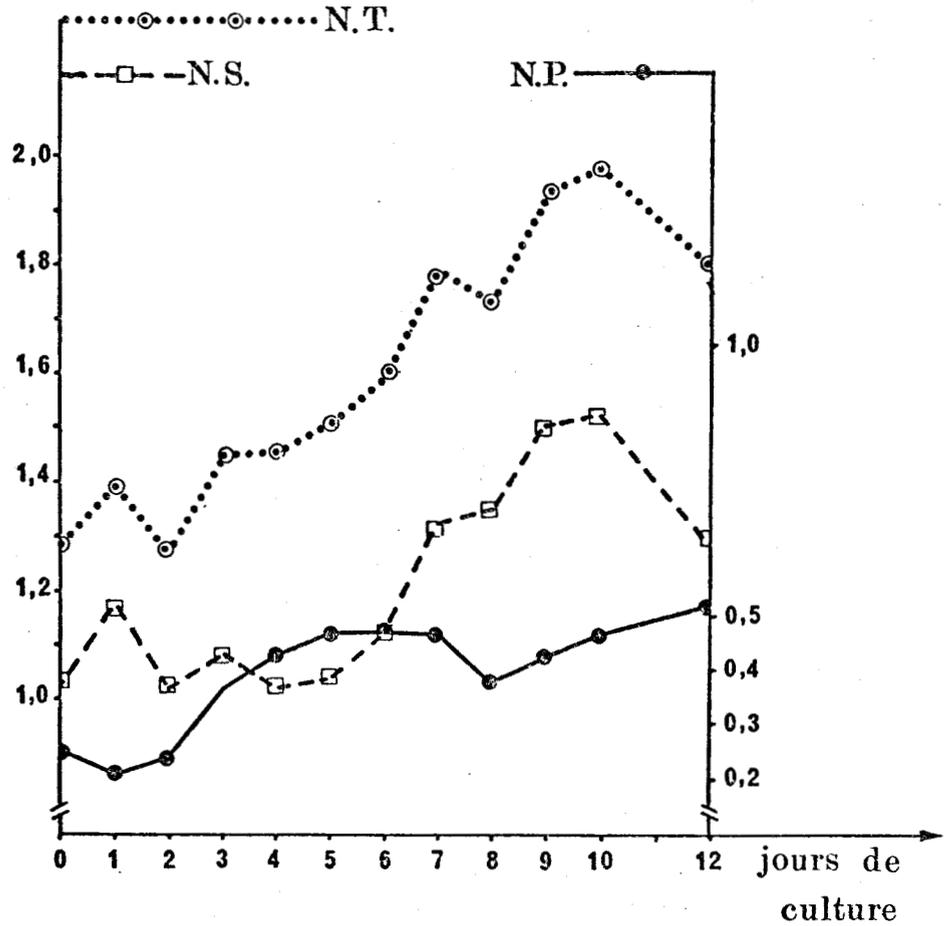


Figure 15 : Evolution des teneurs en azote total (N.T.), soluble (N.S.) et protéique (N.P.) au cours de la culture de fragments de feuilles d'endive. Les résultats sont exprimés en mg/explantat.

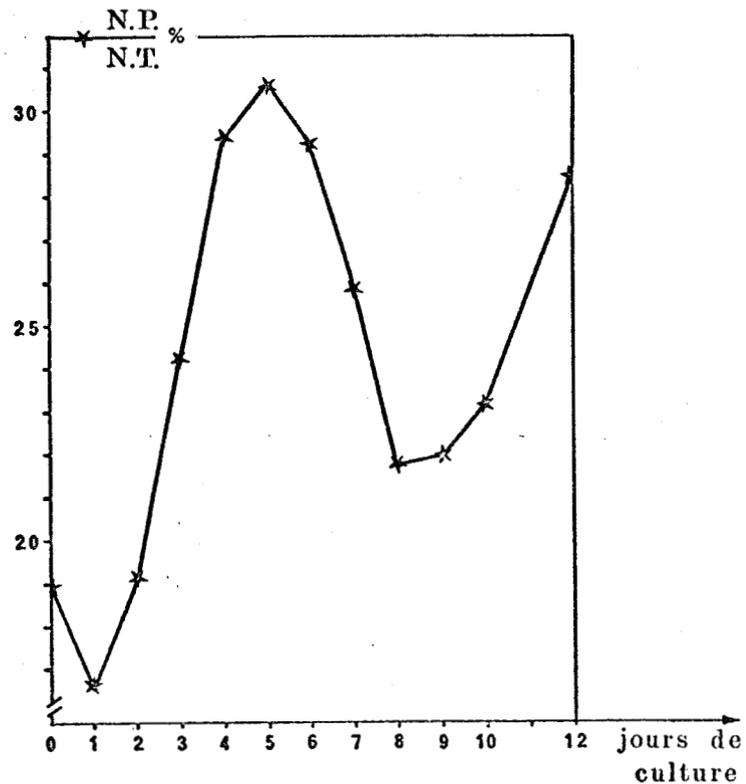


Figure 16 : Evolution, dans les fragments de feuilles d'endive cultivés "in vitro", de la quantité d'azote protéique évaluée en pourcentage de la quantité d'azote total ( $\frac{NP}{NT} \%$ ).

Cette diminution qui coïncide avec une augmentation de l'azote soluble, peut correspondre à des phénomènes de lyse liés au prélèvement et à l'ensemencement des explantats. Il y a ensuite deux périodes où le pourcentage d'azote protéique augmente considérablement. La première se manifeste du 2e au 8e jour, avec un optimum au 5e jour de culture, la seconde débute au 8e jour et se caractérise par une remontée de la teneur en azote protéique.

### 3°) Evolution de l'ADN

L'incorporation de thymine-<sup>3</sup>H dans l'ADN au cours de la culture des tissus de feuilles se caractérise par : (Figure 17)

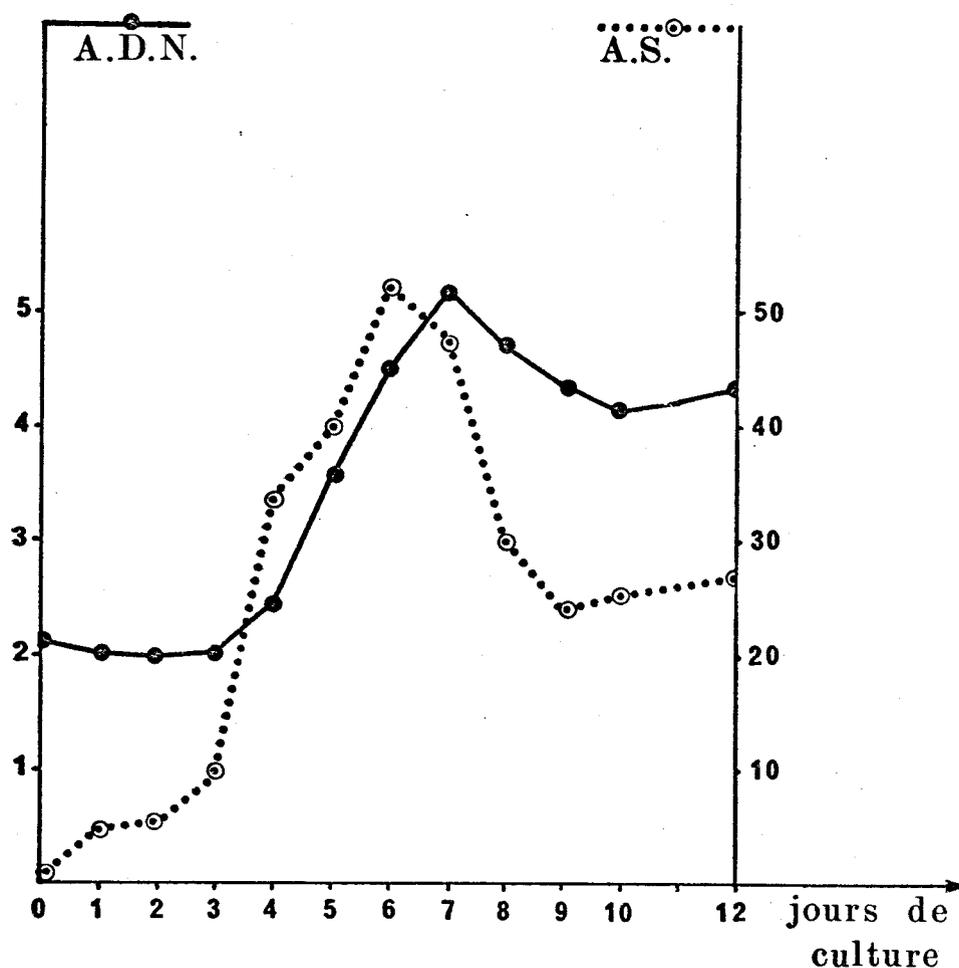


Figure 17 : Evolution, dans les fragments de feuilles d'endive cultivés "in vitro", de l'A.D.N. (en µg/explantat) et de son activité spécifique (A.S. en c.p.m./µg d'A.D.N.).

Après des temps échelonnés de 0 à 12 jours, les explantats sont mis à incuber à la lumière, pendant 5 heures, en présence d'une solution de thymine-<sup>3</sup>H (17 Ci/mM) à 10 µCi/ml.

- une phase de latence, durant les trois premiers jours, au cours de laquelle l'activité spécifique augmente faiblement alors que la teneur en ADN diminue légèrement puis se stabilise. L'accroissement de l'incorporation du précurseur radioactif est donc contrebalancée, surtout au 1er jour de culture, par une intensification de l'activité nucléasique qui explique la stabilité de la teneur en ADN et implique l'absence de division cellulaire.

- une phase d'incorporation importante du 3e au 6e jour de culture, accompagnée d'une augmentation, de plus du double, de la teneur en ADN ; ce qui correspond à une période de synthèse d'ADN et de divisions cellulaires intenses.

Il y a ensuite diminution progressive des activités de synthèse qui se stabilisent à partir du 9e jour de culture, à un niveau qui reste assez élevé.

#### 4°) Evolution de l'ARN total

La teneur en ARN total et son activité spécifique mesurée par incorporation de  $^{32}\text{P}$ , évoluent au cours de la culture (Figure 18). Pendant les deux premiers jours, il y a une synthèse active suivie d'une accumulation d'ARN après 5 jours. L'activité spécifique diminue brutalement à partir du 3e jour de culture, puis est stimulée à nouveau vers le 7e jour ; elle est alors suivie d'une petite augmentation de la quantité d'ARN au-delà du 8e jour. Bien que d'amplitude beaucoup plus faible, nous avons retrouvé constamment cette deuxième phase de synthèse, au cours d'expériences successives, quel que soit le précurseur radioactif utilisé. Pour déterminer les activités de synthèse, il faut parfois tenir compte du "pool" des nucléotides solubles dont les variations peuvent se répercuter sur l'intensité de l'incorporation au niveau des acides nucléiques (SAGHER, 1966). Le calcul du pourcentage de radioactivité incorporée dans l'ARN par rapport

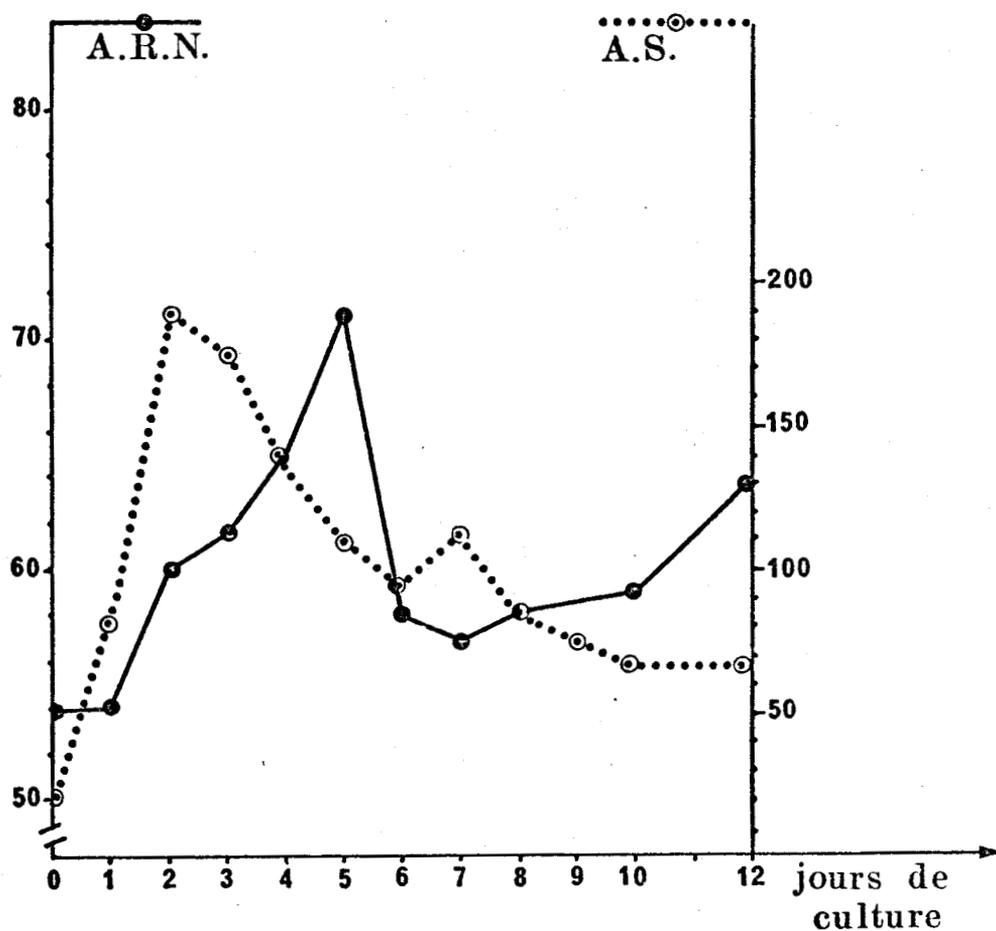


Figure 18 : Evolution, dans les fragments d'endive cultivés "in vitro", de l'A.R.N. (en  $\mu\text{g}/\text{explantat}$ ) et de son activité spécifique (A.S. en c.p.m./ $\mu\text{g}$  d'A.R.N.).

Les explantats sont incubés pendant 5 heures, à la lumière, en présence d'une solution de phosphate de sodium ( $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ ) à  $40 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ .

à la radioactivité totale absorbée (au niveau des nucléotides solubles et dans l'ARN) peut servir de critère pour comparer la fréquence d'incorporation aux sites de synthèse et dans le "pool" des nucléotides solubles. Les expériences réalisées à l'aide d'uracile- $^{14}\text{C}$  et d'acide orotique- $^{14}\text{C}$  (VASSEUR, 1972) ont confirmé la prédominance de l'incorporation au niveau de l'ARN.



### 5°) Evolution de l'activité ribonucléasique

Nous avons exprimé l'activité ribonucléasique par rapport à la quantité de protéines ainsi qu'en fonction de la teneur en ARN (Figure 19). Ce dernier mode de représentation nous a paru susceptible de traduire de manière plus précise le métabolisme de l'acide ribonucléique au cours de la culture. Toutefois, quel que soit le mode d'expression, nous constatons pendant les deux premiers jours de culture, une exaltation de l'activité ribonucléasique suivie d'une baisse, qui correspond à la période d'accumula-

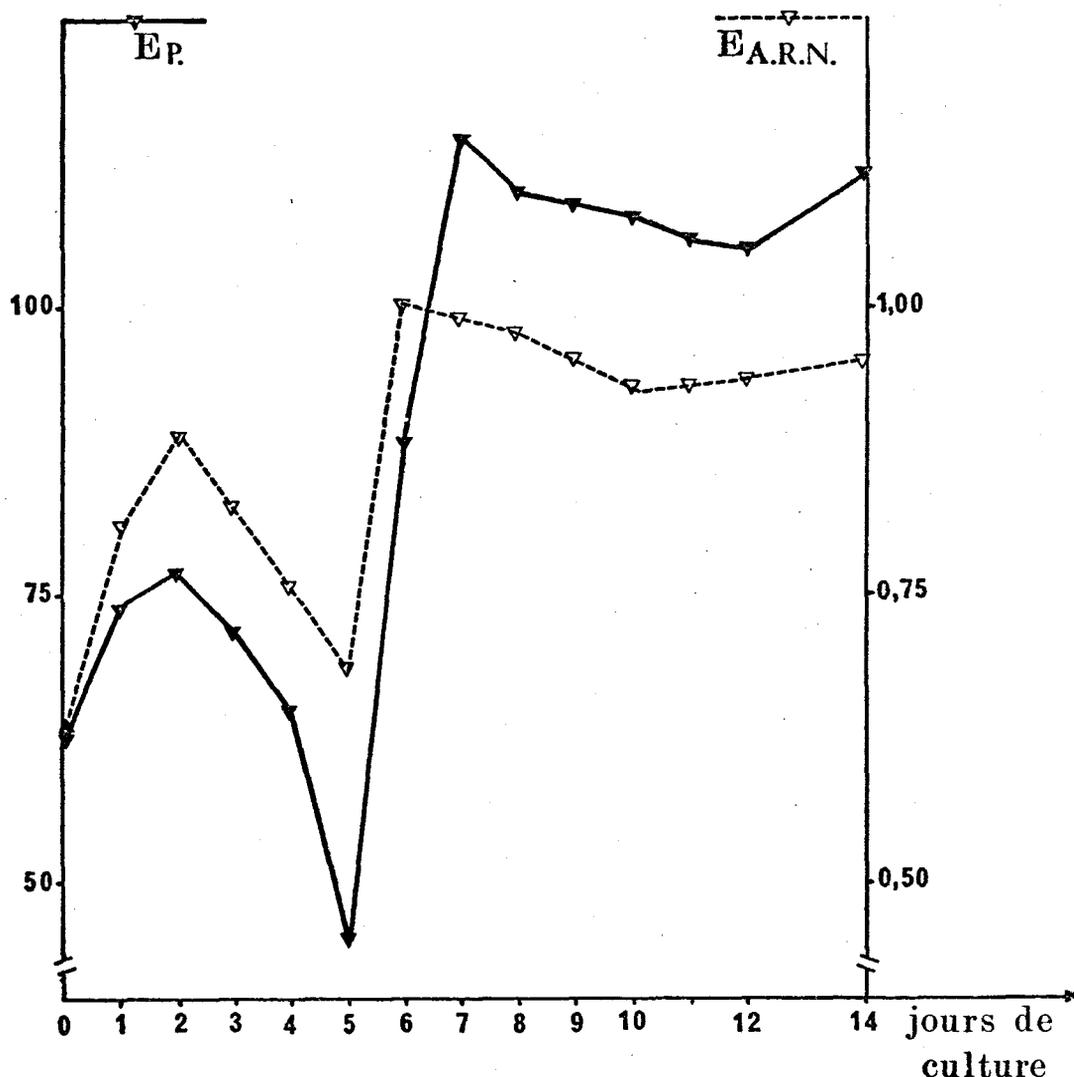


Figure 19 : Evolution, au cours de la culture de fragments de feuilles d'endive, de l'activité ribonucléasique exprimée en unités enzymatiques par mg de protéines (Ep) ou en unités enzymatiques par µg d'A.R.N. (EA.R.N.)

tion de l'ARN (figure 18). L'activité catabolique croît à nouveau à partir du 5e jour de culture et se poursuit le 6e et le 7e jour ; elle correspond alors à une mise en disponibilité de nucléotides nécessaires à la deuxième phase de synthèse d'ARN. L'activité nucléasique se ralentit ensuite pour s'accroître à nouveau à partir du 12e jour de culture.

L'activité ribonucléasique présente donc deux optimums qui correspondent l'un, au début de la culture, à la mise en disponibilité des nucléotides nécessaires aux mitoses, et l'autre à un départ progressif des précurseurs d'ARN vers les bourgeons au fur et à mesure de leur formation.

#### 6°) Evolution des nucléotides de l'ARN total

Le métabolisme de l'ARN total varie au cours de la culture des tissus de feuilles. Parallèlement aux différences quantitatives, on peut penser qu'il y a des variations d'ordre qualitatif soulignant la présence de synthèses nouvelles au moment où se manifestent les processus morphogénétiques. Dans certains cas, en effet, une relation entre la formation des organes et la composition en nucléotides des ARN totaux a été mise en évidence. Ainsi, en plus d'une élévation de la quantité d'ARN, le bourgeonnement peut être accompagné soit d'une augmentation du rapport AMP/GMP (SCHNEIDER et Coll., 1969), soit d'une diminution (CHLYAH et Coll., 1971). Dans d'autres cas, il n'y a pas de changement dans la répartition des différents nucléotides ; il en est ainsi entre les bourgeons végétatifs et floraux de *Xanthium* par exemple (ROSS, 1962).

La composition nucléotidique de l'ARN total des tissus de feuilles d'endive est assez semblable à celle d'autres tissus (CLICK et HACKETT, 1966, LOENING, 1968, POULSON et BEEVERS, 1973, IBRAHIM et Coll., 1975) avec en particulier une teneur élevée en acide guanylique. Les rapports entre les différents nucléotides, y compris le rapport AMP/GMP ne changent guère

au cours de la culture (Tableau 35). Seule l'uridine monophosphate, se distingue des autres nucléotides par un appauvrissement en début de culture suivi d'un enrichissement à partir du 5e jour, mais les écarts observés restent faibles.

TEMPS DE CULTURE (en jours)	A M P	C M P	G M P	U M P	A M P	A M P
					G M P	U M P
0	20,19	20,20	31,31	28,30	0,64	0,71
1	20,60	20,29	31,17	27,94	0,66	0,74
2	20,96	20,86	32,02	26,16	0,65	0,80
3	21,06	21,31	32,50	25,13	0,62	0,84
4	20,87	21,44	32,84	24,85	0,63	0,84
5	20,39	21,55	32,28	25,78	0,63	0,79
6	21,06	21,91	30,79	26,24	0,68	0,80
7	22,11	22,03	29,75	26,11	0,74	0,85
8	22,31	21,55	29,80	26,33	0,75	0,85
10	20,96	20,87	30,80	27,36	0,68	0,77
12	20,76	20,14	31,51	27,59	0,66	0,75

TABLEAU 35 : Evolution, en fonction du temps de culture, de la composition nucléotidique de l'ARN global (en nombre de moles d'un nucléotide pour 100 moles du mélange). Les valeurs numériques représentent la moyenne de trois mesures.



L'utilisation du phosphore- $^{32}\text{P}$  (Tableau 36) montre que le pourcentage de radioactivité incorporée au niveau de l'acide adénylique diminue après 3 jours de culture. L'acide uridylique par contre, évolue en sens inverse ; après avoir diminué en début de culture, le pourcentage de radioactivité incorporée au niveau de ce nucléotide augmente à partir du

TEMPS DE CULTURE (en jours)	A M P	C M P	G M P	U M P	A M P	A M P
					— G M P	— U M P
0	28,33	21,52	26,05	24,10	1,09	1,17
1	30,39	22,52	25,91	21,28	1,17	1,43
2	30,57	22,29	25,49	21,65	1,20	1,41
3	30,98	23,68	25,22	20,12	1,23	1,54
4	26,97	22,47	26,91	23,65	1,00	1,14
5	26,43	21,26	26,55	25,76	0,99	1,03
6	25,63	21,40	26,34	26,63	0,97	0,96
7	22,71	22,88	27,05	27,36	0,84	0,83
8	23,92	21,97	24,97	29,14	0,96	0,82
10	25,80	21,59	23,85	28,75	1,08	0,89
12	24,53	19,10	26,62	29,75	0,92	0,82

TABLEAU 36 : Evolution du pourcentage de radioactivité incorporé dans les nucléotides de l'ARN total. Après des temps de culture échelonnés de 0 à 12 jours, les explantats ont été mis à incuber pendant 5 heures, à la lumière, en présence d'une solution de phosphate de sodium- $^{32}\text{P}$  à 40  $\mu\text{Ci/ml}$ .



4e jour. Les fluctuations dans l'incorporation concernent donc essentiellement l'acide adénylique et l'acide uridylique. Les rapports entre les différents nucléotides reflètent ce phénomène. En particulier, le rapport AMP/UMP s'élève en début de culture et présente un optimum ( $=1,54$ ) vers le 3e jour puis diminue jusqu'au 7e ou 8e jour ( $=0,80$ ) et se stabilise. Le rapport AMP/GMP évolue de la même manière mais avec une amplitude nettement plus faible.

L'activité spécifique des différents nucléotides évaluée en fonction du temps de culture (Figure 20), confirme que si le métabolisme de l'adénine

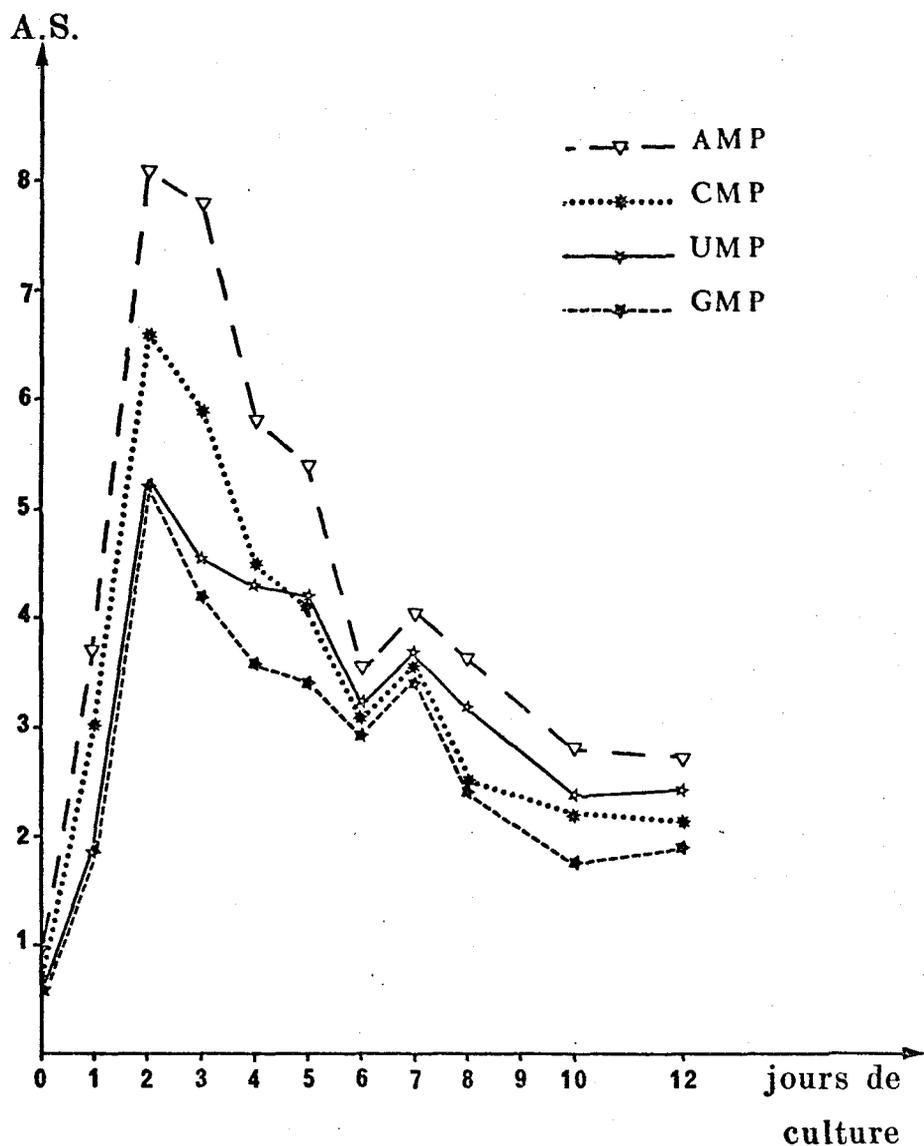


Figure 20 : Evolution de l'activité spécifique (A.S. en c.p.m.  $\times 10^{-4}$  /  $\mu$ mole de nucléotide) des nucléotides de l'ARN total. Après des temps échelonnés de 0 à 12 jours, les explantats ont été mis à incuber pendant 5 heures, à la lumière, en présence d'une solution de phosphate de sodium  $^{32}\text{P}$  à  $40 \mu\text{Ci/ml}$ . Acide adénylique (A M P), acide cytidylique (C M P) acide guanylique (G M P) et acide uridylique (U M P).

monophosphate est prépondérant, celui de l'uridine monophosphate est modifié à partir du 4<sup>e</sup> jour de la culture.

## B) EVENEMENTS MORPHOGENETIQUES ET CRITERES

### BIOCHIMIQUES

La prolifération des disques de feuilles d'endive débute à l'extrémité basale des faisceaux cribro-vasculaires par de petites pustules qui se développent pour former un cal au sein duquel prennent naissance les bourgeons. Dans les conditions habituelles de culture, l'épiderme et le parenchyme ne sont pas des éléments indispensables à la néoformation des bourgeons. Afin de préciser le rôle des différents tissus, nous avons réalisé un certain nombre d'essais.

Si on enlève l'épiderme et un peu de parenchyme sur les deux faces des explantats, le nombre des bourgeons néoformés ainsi que leur développement sont identiques à ce que l'on peut observer sur des fragments témoins.

Des fragments d'épiderme ou de parenchyme ensemencés sur le milieu de base habituel se nécrosent sans avoir proliféré. Toutefois, s'il reste au sein du parenchyme, des morceaux de faisceaux libéro-ligneux, il y a, à ce niveau, prolifération et apparition d'ébauches de bourgeons. La prolifération peut même gagner les tissus parenchymateux, si les tissus vasculaires sont suffisamment importants.

Les faisceaux cribro-vasculaires isolés donnent naissance à des excroissances qui apparaissent de façon polarisée à l'extrémité basale des nervures. On observe également de minuscules zones blanchâtres tout au long de la nervure qui peuvent, exceptionnellement sur le milieu de base, mais plus

régulièrement sur un milieu plus riche (MURASHIGE et SKOOG par exemple) , donner naissance à de petits bourgeons. La présence de ces petites zones de prolifération et leur pouvoir organogène expliquent l'apparition de bourgeons en des endroits inhabituels, ces bourgeons sont toujours en relation avec un faisceau cribro-vasculaire. De même, si au cours de la mise en culture on met à nu un élément vasculaire, la prolifération cellulaire est favorisée à ce niveau.

Sur le milieu de base, les faisceaux cribro-vasculaires sont donc indispensables à la prolifération cellulaire et à la formation d'organes ; les épidermes et le parenchyme sont inertes. Toutefois, ces tissus, sur des milieux plus riches, sont doués de propriétés organogènes (LIEBERT et TRAN THANH VAN, 1972). Ce fait fut d'ailleurs confirmé par COUILLEROT (1973) qui a montré que sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG, additionné de lait de coco et de 6-benzylaminopurine, la prolifération des épidermes de feuilles étiolées ou non est possible mais leur pouvoir organogène dépend de leur origine ; ceux prélevés sur des feuilles chlorophylliennes sont plus rhizogènes.

Différents auteurs ont fait l'étude histologique de ces cultures. TOPONI (1963a et b) s'est intéressée aux modifications provoquées par des substances de croissance (AIA ; 2,4-D ; kinétine). PROFUMO (1967), PROFUMO et DAMERI (1969) ont recherché les cellules responsables de la prolifération cellulaire. Quoique le matériel utilisé soit différent, ces auteurs ont souligné une relation entre l'importance du cal et celle des nervures. COUILLEROT et Coll. (1978) ont étudié systématiquement le devenir des différents tissus au cours de la culture des fragments de feuilles étiolées d'endive. Ce travail met en évidence le rôle des tissus conducteurs dans les phénomènes de prolifération et précise les modifications histologiques qui correspondent d'une part, à l'apparition des divisions cellulaires

et d'autre part, à l'initiation des méristèmes caulinaires.

Ainsi, dès le 2e jour de culture, les cellules du parenchyme vasculaire situées entre les vaisseaux du xylème, présentent des noyaux volumineux. La prolifération de ce parenchyme vasculaire débute effectivement au 3e jour, elle affecte d'abord des cellules situées à quelques millimètres de l'extrémité basale, puis s'amplifie et gagne l'extrémité basale du faisceau. Vers le 4e ou le 5e jour de culture, lorsque le cal apparaît, les cellules périfasciculaires commencent à proliférer et les cellules du mésophylle se cloisonnent activement. La prolifération, en s'intensifiant, gagne d'autres tissus ; seul l'épiderme demeure totalement inerte. L'apparition des premiers nodules méristématiques a lieu à partir du 6e jour de culture, au niveau du parenchyme néoformé d'origine vasculaire.

En rapprochant ces observations histologiques des résultats antérieurs (Figure 21), nous pouvons considérer différentes étapes dans la formation des bourgeons.

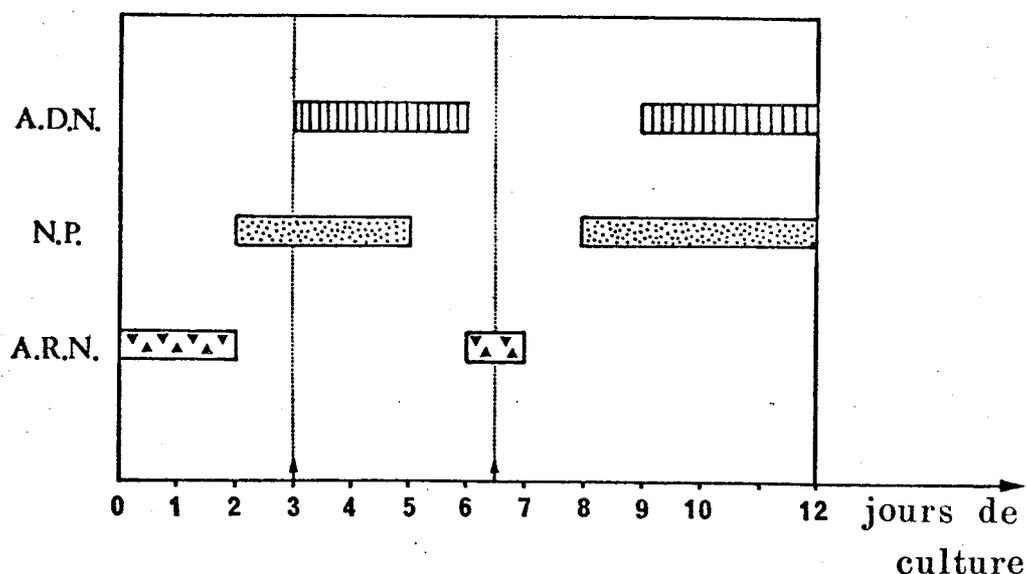


Figure 21 : Principales étapes de la néoformation de bourgeons à partir de fragments de feuilles d'endive cultivés sur le milieu de base.

En relation avec l'apparition des premières divisions cellulaires (3e jour), et le début de la différenciation des initiums méristématiques (6e ou 7e jour), nous avons fait figurer les périodes où les teneurs en azote protéique (N.P.) sont élevées et les synthèses d'A.R.N. et d'A.D.N. importantes.

- une activation cellulaire liée au traumatisme et à la suppression des corrélations tissulaires. Elle se manifeste dès le 1er jour de culture par une diminution de la teneur en ADN et surtout en protéines. La quantité d'ARN est plus stable, mais comme durant ces premières 24 heures, l'activité ribonucléasique ainsi que la synthèse d'ARN sont assez élevées, il faut admettre que les phénomènes anaboliques équilibrent le catabolisme et que les produits de dégradation peuvent être à l'origine de nouvelles synthèses. C'est donc une période de remaniements profonds qui peut durer de quelques heures à deux jours, suivant le matériel utilisé (LIPETZ, 1967 ; ARNAUD, 1970 ; LACHARME et STEIMAN, 1970a ; BIGOT, 1971 ; YEOMAN et AITCHISON, 1973) et au cours de cette période, les cellules préparent leurs divisions. Il y a ensuite une prédominance nette des synthèses et apparition au 3e jour de culture des premières divisions cellulaires qui s'accélèrent pour former une masse de cellules indifférenciées. Cette phase d'activation comprend donc l'ensemble des réactions biochimiques qui conduisent aux premières mitoses et accompagnent la dédifférenciation des cellules dont le processus général a été décrit par BUVAT (1944-45).

- une étape d'organisation qui est caractérisée par l'apparition des premiers nodules méristématiques après 6 jours de culture. Ce processus d'organisation débute avec une deuxième vague de synthèses, qui sont parfois moins importantes que celles constatées au cours de la phase d'activation. Parallèlement, la prolifération cellulaire s'amplifie.

Parmi les constituants biochimiques envisagés, l'évolution de l'ARN reflète le plus fidèlement les modifications histologiques observées ; de plus, c'est le signal le plus précoce des divisions cellulaires et de l'apparition des nodules méristématiques. De nombreux chercheurs ont mis

en évidence le rôle des acides ribonucléiques dans les phénomènes de croissance et de différenciation cellulaire (HEYES, 1963a). Avec des cellules d'érable par exemple, SHORT et Coll. (1969) ont montré que la synthèse d'ARN débute avant les divisions des cellules et s'arrête avant qu'elles ne cessent ; il en est de même avec des cultures de tissus de rose (NASH et DAVIES, 1972). On peut également noter de fortes augmentations de la teneur en ARN lors de la formation de bourgeons par des fragments de racines d'endive (GWOZDZ, 1973), de feuilles de bégonia (CHLYAH et Coll., 1971), de protonéma de mousse (SCHNEIDER et Coll., 1969 ; RATAJCZAK et SZWEYKOWSKA, 1973) ou de tissus de tabac (THORPE et MURASHIGE, 1970). Selon KOVACS (1971a, b, c ; 1972) la croissance des tissus de tabac et la formation des bourgeons dépend des rapports ARN/ADN et histones/ADN. L'ARN et les histones auraient un rôle primordial dans la régulation des phénomènes d'organogenèse.

En cultivant des tissus de feuilles d'endive, nous avons pu mettre en évidence une première synthèse d'ARN (optimale au 2e jour) qui précède l'apparition des divisions cellulaires et une seconde (optimale au 7e jour) qui est concomitante de la formation des nodules méristématiques. Ainsi, après une phase d'activation mitotique, caractérisée par une synthèse importante d'ARN et un rapport nucléotidique AMP/UMP élevé (=1,54), il y a une phase organogène marquée par une seconde synthèse d'ARN, moins importante et un rapport AMP/UMP plus faible (=0,80). Les deux étapes de l'élaboration des bourgeons auraient donc des besoins en ARN différents tant du point de vue quantitatif que qualitatif.

## C) IMPORTANCE RELATIVE DES DEUX SYNTHÈSES

### D'ARN

L'apparition des bourgeons est liée à la formation d'un cal plus ou moins développé, mais il n'est pas possible de supprimer la prolifération cellulaire sans inhiber simultanément la néoformation des bourgeons.

De même, le nombre des bourgeons est variable, on peut l'augmenter ou le diminuer mais il est pratiquement impossible de supprimer le bourgeonnement sans supprimer également la prolifération cellulaire. Ainsi, l'hydrazide maléique, à  $10^{-5}$  M, réduit la néoformation des bourgeons ; cette inhibition peut être éliminée par l'uridine à condition que les explantats possèdent encore l'aptitude à proliférer (VASSEUR et BOURIQUET, 1973). Dans d'autres cas, si l'arrêt du bourgeonnement n'implique pas celui de la prolifération, il entraîne la formation de racines. Par exemple, le 2,4 D à  $6.10^{-6}$  M, provoque l'apparition de cals volumineux qui semblent dépourvus d'organes (VASSEUR, 1966a); mais leur examen histologique montre qu'ils renferment une multitude d'ébauches racinaires dont la croissance est inhibée.

Dans la mesure où il était impossible de disjoindre totalement prolifération cellulaire et bourgeonnement, nous avons étudié l'influence, sur la synthèse d'ARN, de facteurs susceptibles de modifier la néoformation des bourgeons tels que l'auxine, la kinétine ou l'hydrazide maléique.

#### 1°) Action de la kinétine et de l'auxine

C'est en présence de  $10^{-6}$  M d'auxine et de  $10^{-5}$  M de kinétine que la prolifération est la plus importante (Tableau 37), c'est aussi dans ces conditions que la synthèse d'ARN au 2e jour de culture est la plus intense (Tableau 38). Ni l'auxine, ni la kinétine employées séparément, ne stimulent cette synthèse qui diminue même légèrement. Il y a donc un

CONDITIONS DE CULTURE	PROLIFERATION CELLULAIRE	NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS
Milieu de base	+	2,00
" + AIA $10^{-6}$ M/l	+	1,50
" + K $10^{-5}$ M/l	+	3,40
" + AIA $10^{-6}$ M/l + K $10^{-5}$ M/l	++	6,95

TABLEAU 37 : Action de l'acide indolyl-acétique (AIA) et de la kinétine (K), associés ou non, sur les phénomènes d'organogenèse manifestés par des fragments de feuilles d'endive cultivés "in vitro".

Le nombre moyen de bourgeons par explantat est déterminé après 40 jours de culture. Le nombre de croix (+) indique l'importance relative de la prolifération cellulaire.

CONDITIONS DE CULTURE	A S (c.p.m./ $\mu$ g, ARN)		
	0	2e jour	7e jour
Milieu de base	36	162	82
" + AIA $10^{-6}$ M/l	-	149	86
" + K $10^{-5}$ M/l	-	142	184
" + AIA $10^{-6}$ M/l + K $10^{-5}$ M/l	-	214	216

TABLEAU 38 : Action de l'acide indolyl-acétique (AIA) et de la kinétine (K), associés ou non, sur l'activité spécifique (AS) de l'ARN extrait des tissus d'endive.

Les fragments de feuilles pris avant l'ensemencement (0), au 2e jour ou au 7e jour de la culture, sont mis à incuber pendant 5 heures, à la lumière, en présence d'une solution de phosphate de sodium- $^{32}$ P à 40  $\mu$ Ci/ml. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences.



certain parallélisme entre la prolifération cellulaire et la synthèse d'ARN au 2e jour de culture.

Après 7 jours de culture, l'augmentation de la synthèse d'ARN correspond à un plus grand nombre de bourgeons néoformés. De plus, si la kinétine ( $10^{-5}M$ ) n'agit pas sur la synthèse d'ARN au 2e jour de culture, elle stimule de manière très intense celle du 7e jour, à tel point qu'elle devient plus importante que la première.

## 2°) Action de l'hydrazide maléique

L'hydrazide maléique à  $2.10^{-5}M$  ne modifie pratiquement pas le développement du cal mais réduit le nombre des bourgeons (Tableau 39). Simultanément, il diminue la synthèse d'ARN au 7e jour de la culture. Cet effet peut être supprimé par  $2.10^{-4}M$  d'uridine (Tableau 40) qui à elle seule, ne modifie pas la synthèse d'ARN mais supprime l'inhibition du bourgeonnement provoquée par l'hydrazide maléique.

CONDITIONS DE CULTURE	PROLIFERATION CELLULAIRE	NOMBRE MOYEN DE BOURGEONS
Milieu de base	+	2,55
" + HM $2.10^{-5}M/l$	+	0,92
" + Uridine $2.10^{-4}M/l$	+	2,71
" + HM $2.10^{-5}M/l$ + Uridine $2.10^{-4}M/l$	+	2,47
" + HM $6.10^{-5}M/l$	-	0,19

TABLEAU 39 : Action de l'hydrazide maléique (HM) et de l'uridine, associés ou non, sur les phénomènes d'organogénèse manifestés par des fragments de feuilles d'endive cultivés "in vitro".

Le nombre moyen de bourgeons par explantat est déterminé après 40 jours de culture.

CONDITIONS DE CULTURE	A S (c.p.m./ $\mu$ g ARN)		
	0	2e jour	7e jour
Milieu de base	41	194	106
" + HM $2 \cdot 10^{-5}$ M/l	-	181	72
" + Uridine $2 \cdot 10^{-4}$ M/l	-	196	111
" + HM $2 \cdot 10^{-5}$ M/l + Uridine $2 \cdot 10^{-4}$ M/l	-	188	99
" + HM $6 \cdot 10^{-5}$ M/l	-	137	49

TABLEAU 40 : Action de l'hydrazide maléique (HM) et de l'uridine, associés ou non, sur l'activité spécifique (AS) de l'ARN extrait des tissus d'endive.

Les fragments de feuilles pris avant l'ensemencement (0), au 2e jour ou au 7e jour de la culture, sont mis à incuber pendant 5 heures, à la lumière, en présence d'une solution de phosphate de sodium- $^{32}$ P à 40  $\mu$ Ci/ml. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences.

A  $6 \cdot 10^{-5}$  M, l'hydrazide maléique inhibe presque totalement la formation des bourgeons et diminue fortement le développement du cal ainsi que le pourcentage d'explantats capables de proliférer. La synthèse d'ARN est alors réduite non seulement au 7e jour de culture mais aussi dès le 2e jour.

#### D) DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Avant les premières divisions, des modifications biochimiques interviennent au sein des explantats. Indépendamment du matériel utilisé, des synthèses précoces d'ARN sont à l'origine de la prolifération cellulaire, que celle-ci soit accompagnée ou non d'organogenèse. Dans les hypocotyles

de tomate par exemple, GUILLOT (1966a) a montré que si la rhizogenèse s'accompagne d'une synthèse d'ADN, c'est surtout la synthèse d'ARN qui caractérise et conditionne la formation d'organes. De plus, cette synthèse qui se produit pendant les trois premiers jours, est une condition nécessaire mais non suffisante, car elle peut avoir lieu sans qu'il y ait formation de racines. Elle n'est donc qu'un aspect de la potentialité des boutures de tomate à produire des racines. Des synthèses précoces d'ARN et de protéines ont également été mises en évidence au cours de l'induction des racines adventives sur des fragments d'axes racinaires de plantules de *Cicer arietinum* et de *Vicia faba* (JALOUZOT, 1971).

Les résultats obtenus avec les tissus de feuilles d'endive, en accord avec les travaux antérieurs, précisent en outre qu'il y a deux périodes de synthèses d'ARN total, l'une précédant la phase de division cellulaire, l'autre annonçant la néoformation des bourgeons.

Depuis les travaux de SKOOG et de ses collaborateurs, on connaît le rôle important joué par l'auxine et les cytokinines dans les phénomènes de prolifération cellulaire et d'organogenèse. On sait que l'auxine règle l'entrée d'eau dans les cellules végétales ainsi que la croissance de la paroi cellulaire (RAY, 1969) ; elle intervient aussi sur le métabolisme des acides nucléiques (SILBERGER et SKOOG, 1953 ; SKOOG, 1954 ; 1955). De nombreux auteurs ont confirmé le rôle de l'acide indolyl-acétique dans la synthèse de l'ARN (KEY et SHANNON, 1964 ; ESNAULT, 1967 ; TREWAVAS, 1968 ; MIASSOD et Coll., 1969 ; MASUDA et KAMISAKA, 1969) ou de l'ADN (HOLM et KEY, 1969 ; KAMISAKA et MASUDA, 1970 ; SIMARD, 1971). Les cytokinines induisent les divisions cellulaires (DAS et Coll., 1956 ; 1958 ; NAEF, 1972 ; ZWAR, 1973) et interviennent dans le métabolisme des acides nucléiques (SKOOG et ARMSTRONG, 1970 ; JACOBSEN, 1977). La présence de ces deux substances est nécessaire au déroulement complet du

cycle cellulaire (JABLONSKI et SKOOG, 1954 ; DAS et Coll., 1956 ; SKOOG et MILLER, 1957 ; NISHIYAMA et TAIRA, 1966 ; NITSCH, 1968b et c ; BRYANT, 1976. Les résultats que nous avons obtenus avec les fragments de feuilles d'endive confirment que la prolifération cellulaire et la néoformation des bourgeons sont réglés par l'équilibre hormonal intra-tissulaire qui influe aussi sur la synthèse des acides ribonucléiques.

L'adjonction, au milieu de culture, de ces deux hormones ou d'hydrazide maléique montre que la prolifération cellulaire est liée à la synthèse d'ARN qui a lieu au 2e jour de culture, la seconde qui se manifeste au 7e jour de culture oriente les processus d'organogenèse. L'importance relative de ces deux synthèses peut être influencée par différents facteurs qui modifient simultanément l'intensité de la callogenèse ou du bourgeonnement

Les phénomènes de morphogenèse peuvent cependant être définis par la répression ou la dérèpression strictement contrôlée du génome. Ainsi, les expériences de FELLEBERG (1967 ; 1969), sur la formation des racines, suggèrent qu'il y a une action des hormones au niveau de la liaison : ADN-histones ; le traumatisme suivi ou non d'action hormonale, provoquerait l'hydrolyse de certaines histones entraînant la dérèpression du génome, ce qui conduit à admettre l'existence de protéines dont la synthèse est "hormone-dépendante" (GUERN, 1972). Mais suivant le système biologique étudié ou le protocole expérimental utilisé, le point d'impact moléculaire de l'hormone peut correspondre à l'activation d'espèces variées d'acides ribonucléiques (JACOBSEN, 1977).

Nos observations sur le comportement particulier des nucléotides adénylique et uridylique au sein de l'ARN total montre qu'il existe des différences qualitatives entre les deux synthèses qui se produisent au

cours de la culture des tissus de feuille d'endive. Toutefois, bien que ces , résultats permettent de distinguer deux étapes dans le processus du bourgeonnement, ils n'apportent qu'une image globale de phénomènes qui sont sans doute fort complexes. Il faut en effet tenir compte non seulement des formes moléculaires stables, mais également des ARN à renouvellement rapide qui peuvent intervenir à chaque instant, au cours de la culture, sur la composition nucléotidique de l'ARN total. C'est pourquoi il s'avère maintenant indispensable de caractériser les ARN synthétisés et de suivre leur évolution au cours des étapes essentielles de l'initiation des bourgeons. Compte tenu de la complexité des phénomènes et de l'équilibre hormonal au sein de ces tissus, nous nous sommes placé dans les conditions expérimentales les plus simples, en cultivant les fragments de feuilles d'endive sur le milieu de base défini précédemment.

iii

iii

iii

## CHAPITRE 2

## ACIDES RIBONUCLEIQUES

## ET BOURGEONNEMENT

La détermination des différentes classes d'ARN au cours de la néoformation des organes doit nous permettre d'apprécier qualitativement l'équipement des tissus de feuilles d'endive en molécules indispensables à la biosynthèse des protéines. Une telle étude nécessite cependant de pouvoir obtenir des ARN totalement dépourvus de protéines et ayant une structure aussi voisine que possible de celle qu'ils possèdent dans la cellule. De plus, il faut veiller à ce que l'action des enzymes, abondantes dans les tissus végétaux, soit constamment inhibée. Nous avons donc dû, dans un premier temps, adapter un certain nombre de techniques à notre matériel (Matériel et Techniques ; C ; § 7).

Les fragments de feuilles d'endive ont été cultivés sur le milieu de base habituel. Soit au moment de l'ensemencement, soit après 2 ou 7 jours de culture, les explantats sont mis à incuber aseptiquement, à la lumière, pendant 5 heures, en présence d'une solution d'adénosine-8-<sup>14</sup>C (A.S. = 48 mCi/mM) à 20 µCi/ml. Les tissus, rincés abondamment à l'eau puis congelés dans de

l'azote liquide, sont alors prêts à être analysés. Les ARN extraits des tissus par le phénol à 4°C et à 55°C sont réunis, traités par la DNase puis fractionnés sur colonne d'albumine méthylée.

Nous avons choisi l'adénosine-<sup>14</sup>C, afin de pouvoir déterminer si les fractions ribonucléiques isolées possèdent ou non des ARN-polyadénylés. Le temps d'incubation de 5 heures peut paraître assez long, en comparaison des durées d'incorporation habituellement employées pour étudier les ARN messagers, mais il se justifie par la nature de notre matériel. Pour des durées d'incubation plus courtes, l'incorporation très lente dans l'ARN (Figure 6) semble dépendre en grande partie de la pénétration dans les tissus de feuilles et/ou de la nécessité d'une saturation préalable du "pool" nucléotique intra-tissulaire. Cette incorporation de 5 heures se justifie d'ailleurs également par l'existence, chez les végétaux, d'une proportion importante d'ARN-messagers à demi-durée de vie relativement longue (WEEKS et MARCUS, 1971 ; PAYNE, 1976 ; DELSENY, 1977).

## A) MISE EN EVIDENCE ET EVOLUTION DES DIFFERENTES ESPECES MOLECULAIRES D'ARN

### 1°) Modalités de la séparation sur colonne de MAK

La chromatographie sur colonne d'albumine méthylée sépare l'ARN total en plusieurs fractions (Figure 22). Le profil d'absorbance permet de distinguer, dans l'ordre d'éluion :

- l'ARN soluble avec ses deux constituants : (1) serait de l'ARN de constante de sédimentation 4 S. et (2) correspondrait à une fraction ribosomale de faible poids moléculaire (5 S). Malgré la présence de ce type d'ARN nous conserverons, pour plus de commodité, la dénomination "ARN solubles" bien que celle d'ARN de faible poids moléculaire soit plus justifiée.

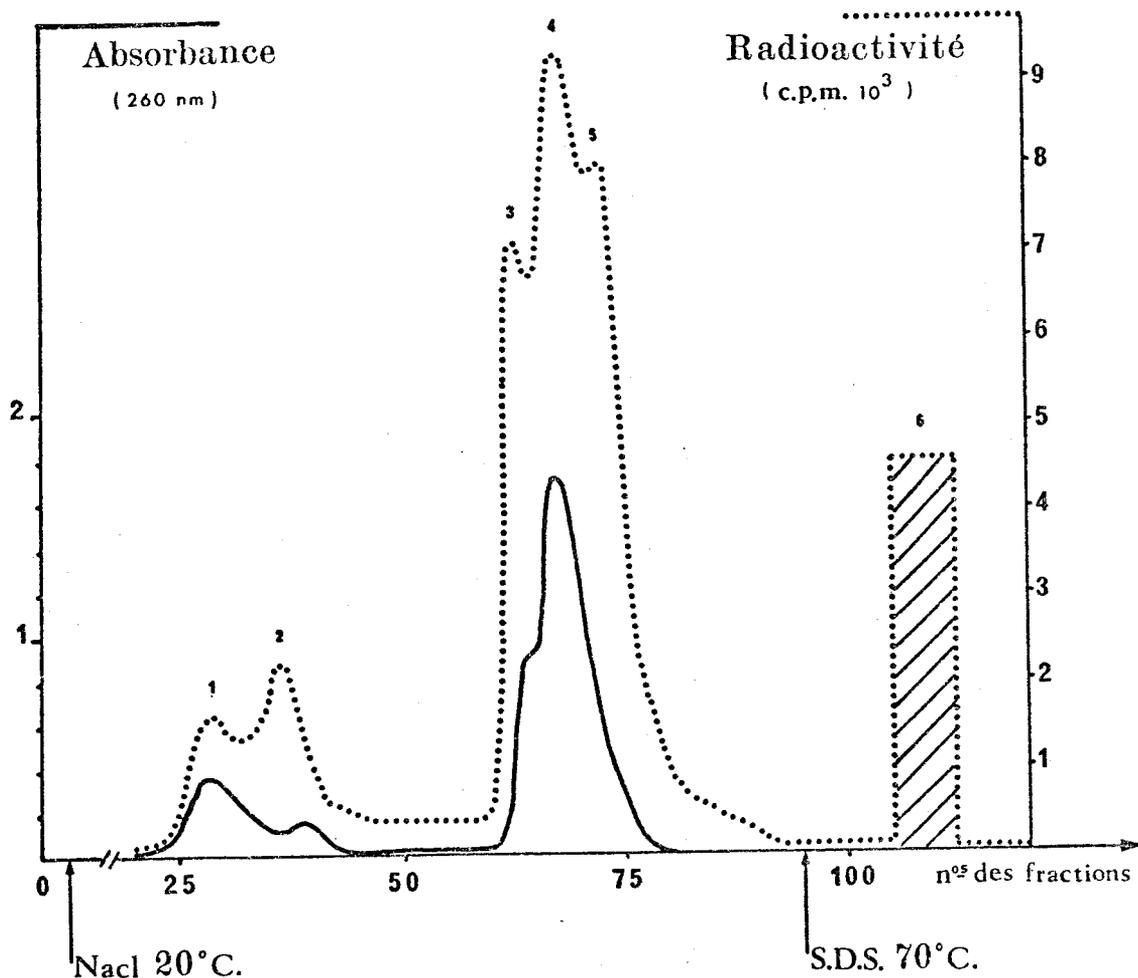


Figure 22 : Chromatographie sur colonne d'albumine méthylée des A.R.N. extraits d'explantats de feuilles d'endive après 2 jours de culture. 1 mg d'A.R.N. est déposé au sommet de la colonne qui est lavée, puis éluée à 20°C par un gradient linéaire de NaCl (0,4 à 1,2 M.). Les ARN retenus sont ensuite élués par une solution de S.D.S. (2%) à 70°C. On détermine alors l'absorbance et la radioactivité de chaque fraction. Les flèches signalent les changements dans les conditions d'éluion.

- l'ARN ribosomal, d'origine cytoplasmique ou chloroplastique, est constitué de deux unités (3 et 4), d'ailleurs rarement bien séparées chez les végétaux. Selon les valeurs les plus souvent rencontrées dans la littérature pour les tissus de plantes, les constantes de sédimentation sont respectivement de 16 à 18 S et de 23 à 25 S (HADZIYEV et Coll., 1968 ; LOENING, 1968). Après l'éluion des deux constituants ribosomaux le

profil de radioactivité peut présenter un troisième épaulement (5) qui n'est visible qu'à un certain stade de la culture. Ce serait un composant de poids moléculaire élevé, mélangé partiellement aux autres constituants ribosomiaux mais qui s'en distingue, soit par la conformation moléculaire (SUEOKA et CHENG, 1962 ; SINGH et KELLER, 1968), soit par la composition nucléotidique. Il s'agirait vraisemblablement de précurseurs d'ARN ribosomiaux ou encore de certains types d'ARN messagers.

- une dernière catégorie d'ARN reste fixée sur l'albumine méthylée après l'élution saline (ARN "liés" ; (6) ) et peut être éluée par le SDS à 70°C ; elle est évaluée à environ 20 % de la radioactivité totale recueillie et correspondrait à la fraction messagère des ARN que nous étudierons. Le lavage ultérieur de la colonne par une solution de soude (NaOH 1 N) ne permet plus de déceler de molécules radioactives dans les effluents.

Les résultats obtenus sur colonne de MAK sont très reproductibles, dans la mesure où l'on veille soigneusement à la préparation et à la conservation de l'albumine méthylée. Au cours du vieillissement (6 à 8 semaines à 4°C) peut apparaître, en effet, un produit faiblement basique susceptible de diminuer la capacité de rétention de l'ARN rapidement marqué sur la colonne (ELLEM, 1966).

## 2°) Evolution des différents types d'ARN

Avant la mise en culture des explantats, les ARN solubles et ribosomiaux sont synthétisés au même rythme, comme le montrent leurs activités

spécifiques respectives (Tableau 41). La comparaison des différentes fractions

		ARN solubles	ARN Ribosomaux	ARN "liés"	T o t a l
J <sub>0</sub>	d.o.	19,62 %	80,38 %		16,37
	c.p.m	16,59 %	70,88 %	"12,53 %"	37.372
	A S	1.931	2.013		2.283
J <sub>2</sub>	d.o.	20,21 %	79,79 %		17,08
	c.p.m	17,25 %	61,52 %	"21,23 %"	175.180
	A S	8.856	7.944		10.256
J <sub>7</sub>	d.o.	16,02 %	83,98 %		19,21
	c.p.m	11,12 %	71,21 %	"17,67 %"	121.380
	A S	4.382	5.358		6.318

TABLEAU 41: Evolution des différentes fractions obtenues après séparation, sur colonne de MAK, des ARN extraits d'explantats de feuilles d'endive avant l'ensemencement (J<sub>0</sub>) ou après 2 (J<sub>2</sub>) ou 7 jours (J<sub>7</sub>) de culture.

L'activité spécifique (A S) est le rapport entre la radioactivité, exprimée en coups par minute (c.p.m) et la quantité d'ARN, exprimée en unités de densité optique (d.o.)

Ces chiffres représentent la moyenne de 3 mesures indépendantes. La quantité d'ARN des fractions solubles et ribosomales est évaluée en pour-cent du total ; il en est de même pour la radioactivité dont la valeur totale comprend en plus les ARN "liés" à la colonne. Nous n'avons toutefois pas tenu compte de la radioactivité associée au matériel de faible poids moléculaire présent au début de l'élution.

d'ARN obtenues, en fonction du moment de prélèvement ; nous permet de faire un certain nombre de remarques:

Après 2 jours de culture, la quantité d'ARN total est comparable à celle observée sur le lot témoin, les pourcentages en ARN solubles et ribosomaux restent également très semblables. Bien qu'il y ait une augmentation générale de la synthèse de ces ARN, l'incorporation du précurseur radioactif est plus lente au niveau de l'ARN ribosomal que de l'ARN soluble.

Parallèlement, on note une très nette augmentation de l'incorporation dans la fraction des ARN "liés" dont le pourcentage de radioactivité a pratiquement doublé. Il faut toutefois signaler la présence d'un troisième pic de radioactivité, élué après les ARN ribosomaux, qui n'est décelable que durant cette période ( (5) Figure 22).

Au 7<sup>e</sup> jour de culture, l'ARN ribosomal devient prépondérant ; il est synthétisé à un rythme rapide et son pourcentage augmente, alors que celui de l'ARN soluble diminue. Dans le même temps, le taux de la radioactivité apparente au niveau des ARN "liés" baisse notablement bien qu'il reste supérieur à celui observé sur le lot témoin.

### 3°) Discussion

La plupart des méthodes de fractionnement de l'ARN sont basées sur des différences de poids moléculaire et ne sont pas susceptibles de permettre l'isolement des classes d'ARN hétérogènes ou polydisperses de type messenger. La chromatographie sur colonne d'albumine méthylée diffère des autres méthodes de fractionnement telles que gradient de densité et électrophorèse sur gels, car les séparations ne dépendent pas seulement de la taille des molécules. Si le mécanisme n'est pas encore complètement élucidé, on reconnaît que la structure secondaire et la composition en base peuvent influencer la séparation des acides nucléiques. Ce sont ces facteurs qui ont été exploités pour séparer l'ARN polydisperse de l'ARN ribosomal.

Plusieurs laboratoires, à partir d'espèces végétales variées, ont ainsi montré la présence d'un pic d'ARN radioactif, élué juste après l'ARN ribosomal le plus lourd (25 S) ; il est hétérogène et a une composition en bases semblable à celle de l'ADN. C'est pourquoi, comme dans le cas des cellules animales, il a été appelé "DNA-like" ou "D-RNA" (KEY et INGLE, 1964 ; ELLEM et SHERIDAN, 1964 ; INGLE et Coll., 1965 ; EWING et CHERRY, 1967 ; JOHRI et VARNER, 1970 ; KEY et Coll., 1972 ; BEISENHERZ, 1972 ; JULLIEN et

GUITTON, 1972 ; KEY et SILFLOW, 1975 ; NITTA et SHIROYA, 1976). La synthèse du "D-RNA" serait nécessaire à la croissance des plantes et présenterait des propriétés d'ARN-messager (KEY et INGLE, 1964 ; INGLE et KEY, 1965).

Une seconde fraction d'ARN, ayant des propriétés similaires au "D-RNA", mais restant liée à la colonne de MAK après l'élution saline, a été découverte (TESTER et DURE, 1967 ; JOHRI et VARNER, 1970). Cette fraction de "TB-RNA" (tenaciously bound RNA) peut représenter, dans certains cas, plus de 60 % de l'ARN nouvellement synthétisé (ELLEM et SHERIDAN, 1964) ; elle est récupérée en solubilisant l'albumine méthylée à laquelle l'acide nucléique est lié.

Récemment "D-RNA" et "TB-RNA" ont été purifiés et caractérisés à partir de tissus de soja (KEY et Coll., 1972). Tous deux sont polydisperses et contiennent des proportions élevées d'AMP et d'UMP. Le "TB-RNA" a cependant une teneur plus importante en AMP (40 %) que le "D-RNA" (30 %) qui présente par contre un pourcentage plus élevé en UMP. La liaison sur colonne d'albumine méthylée serait d'ailleurs en relation avec la richesse en AMP (JACKSON et INGLE, 1973 ; VAN SITTERT et Coll., 1975).

Les essais réalisés pour étudier l'ARN messager des plantes, dépendaient donc du marquage de fractions d'ARN polydisperses "riches" en AMP. Cependant, la chromatographie sur colonne de MAK ne permet pas toujours de séparer le "D-RNA" et le "TB-RNA" (INGLE et Coll., 1965, KOCH et KUBINSKI, 1964 ; ELLEM, 1966 ; VANDERHOEF et KEY, 1968 ; JOHRI et VARNER, 1970 ; KEY, 1972 ; KEY et Coll., 1972). Cette séparation pourrait dépendre d'un certain nombre de facteurs tels que la qualité de l'albumine méthylée et la nature du gradient salin. Ainsi le "D-RNA" pourrait être élué soit avec les ARN ribosomiaux à la fin du gradient salin, soit avec le "TB-RNA" en diminuant, par exemple, la concentration en sel et en augmentant les valeurs de pH ; l'accroissement du pH ayant pour

effet de diminuer la concentration en sel requise pour éluer l'ARN ribosomal (JACKSON et INGLE, 1973). Des modalités d'élution différentes peuvent également être observées en modifiant la pression et la température d'élution (CHANDRA et ABDUL-BAKI, 1977).

Le "TB-RNA" extrait des racines de lentille a d'ailleurs pu être scindé en plusieurs fractions qui ont été analysées séparément (PENON, 1970 ; 1972). En présence de SDS, l'élution à 35°C fournit deux pics ( $\alpha$  et  $\beta$ ), et à 70°C apparaît un troisième pic ( $\gamma$ ).

- le pic  $\alpha$  serait constitué d'ARN polydisperses, de constante de sédimentation supérieure à 35 S, très instables, "riches" en uracile (environ 30 %) et d'origine nucléaire.

- les pics  $\beta$  et  $\gamma$  se composent d'ARN cytoplasmiques à propriétés messagères : ARN polydisperses, instables, présentant une abondance de matériel de 12 à 18 S et qui sont "riches" en adénine.

L'ARN du pic  $\beta$  serait similaire au "TB-RNA" décrit par JOHRI et VARNER (1970) alors que le pic  $\alpha$  s'apparenterait au "D-RNA" mis en évidence par ces mêmes auteurs. Bien qu'il semble que les ARN du pic  $\alpha$  constituent bien des catégories de molécules différentes de celles éluées par le NaCl (MIASSOD et Coll., 1970), la distinction entre ce pic et les autres formes messagères, davantage liées à la fraction ribosomale, pourraient dépendre de l'albumine méthylée et du gradient salin utilisé.

Les méthodes pour extraire le "D-RNA" des cellules végétales (augmentation de la température ou du pH) indiquent que cet ARN est associé à l'ADN du noyau de la cellule. Le "D-RNA" serait la forme naissante, nucléaire de l'ARN et se transformerait en "TB-RNA" qui serait la forme messagère cytoplasmique (ATTARDI et Coll., 1966 ; DARNELL et Coll., 1971 ; 1973 ; TEISSERE et Coll., 1972 ; SCHMID et Coll., 1972 ; VAN DE WALLE

et DELTOUR, 1974 ; BRANDHORST et Mc CONKEY, 1975 ; CHAPMAN et INGLE, 1976 ; MOLLOY et PUCKETT, 1976). Toutefois, certains chercheurs pensent que le "D-RNA" pourrait, au moins en partie, être composé de précurseurs d'ARN ribosomiaux (SEITZ et RICHTER, 1970 ; SEITZ et SEITZ, 1971 ; 1972 ; GRIERSON et LOENING, 1972, 1974 ; CECCHINI et MIASSOD, 1976 ; MACHE, 1976 ; ZBELL et REINERT, 1977).

Nos résultats confirment que l'on peut mettre en évidence, après deux jours de culture, un pic de radioactivité élué par le gradient salin, en même temps que les ARN ribosomiaux ; ce pic est absent avant l'ensemencement des explantats et disparaît après 7 jours de culture. Toutes les conditions d'extraction et de fractionnement étant strictement contrôlées et identiques, il est vraisemblable que cela correspond, en partie au moins, au "D-RNA" mis en évidence par différents chercheurs. Parallèlement, on constate que le pourcentage des ARN "liés" à la colonne est beaucoup plus important après 2 jours de culture. Il diminue ensuite mais reste, après 7 jours, encore supérieur au pourcentage observé dans le lot témoin. Comme nous l'avons signalé, ces ARN "liés" à l'albumine méthylée, peuvent, en fait, être un mélange d'espèces moléculaires dont certaines pourraient s'apparenter au "D-RNA".

Actuellement, on estime que les fractions éluées après les ARN ribosomiaux et celles qui restent fixées à la colonne de MAK comprennent les ARN messagers des tissus de plantes. Toutefois, la difficulté que présente leur identification explique le petit nombre de travaux consacrés à ces ARN, malgré leur importance dans le contrôle de l'expression génétique au cours du développement (VANDERHOEF et KEY, 1968 ; TANIMOTO et MASUDA, 1969 ; JULIEN et Coll., 1970 ; KHAN et Coll., 1970 ; KHAN et ANOJULU, 1970 ; MIASSOD et Coll., 1970).

Après la découverte de séquences polyadényliques au sein de la plupart des ARN messagers d'eucaryotes, il était possible de les isoler, de les purifier et d'obtenir des indications plus précises sur leur métabolisme. Ceci est d'autant plus intéressant que des travaux récents (SCHMID et Coll., 1975 ; KEY et SILFLOW, 1975) ont montré que la présence ou l'absence de séquences polyadényliques permettrait la séparation du "D-RNA" et du "TB-RNA" sur colonne de MAK. Le "D-RNA" serait constitué d'un ensemble de molécules polyadénylées ou non, mais les segments poly (A) présents seraient alors trop petits pour être retenus par l'albumine méthylée. MILLER et Coll. (1976) pensent également que cette méthode chromatographique sépare efficacement les molécules polyadénylées des autres. Dans leurs conditions expérimentales, la largeur du pic d'ARN poly (A<sup>+</sup>) reflète, dans une certaine mesure, la distribution en taille des séquences polyadényliques. De même, la place de ce pic au cours de l'élution peut être une indication de la longueur moyenne des séquences poly (A). Selon ces auteurs, l'ordre d'élution dépendrait essentiellement de la longueur des séquences polyadényliques.

L'ensemble de ces résultats nous a conduit naturellement à essayer de mettre en évidence les ARN polyadénylés et à suivre leur évolution. Nous avons alors utilisé les segments polyadényliques pour isoler ce type d'ARN.

## B) MISE EN EVIDENCE ET EVOLUTION DES ARN POLYADENYLES

### 1°) Mise en évidence des ARN polyadénylés

La chromatographie sur colonne de sépharose-poly (U) d'extraits obtenus à partir d'explantats avant l'ensemencement (Tableau 42) montre

	Radioactivité (c.p.m)	Absorbance (à 260 nm)	Activité spécifique
Fraction non retenue	35.750	16,81	2.126
Fraction retenue	1.630	0,48	3.395
(en % du total)	4,36 %	2,78 %	-
T o t a l	37.380	17,29	2.162

TABLEAU 42: Chromatographie sur colonne de sépharose-poly (U) de l'ARN global extrait des fragments de feuilles avant l'ensemencement.

Les ARN qui s'hybrident aux séquences poly-uridyliques (fraction retenue) représentent 4,4 % environ de la radioactivité totale incorporée dans les acides ribonucléiques.

qu'une partie de l'ARN reste fixée aux séquences polyuridyliques complémentaires, adsorbées sur le sépharose. Cette fraction retenue, représente 2,8 % des ARN extraits et 4,4 % de la radioactivité totale. Comme en témoigne l'activité spécifique nettement plus élevée, il existe bien une incorporation préférentielle d'adénosine au sein de ces molécules retenues sur le sépharose-poly (U).

Pour isoler les séquences polyadényliques, on se base sur leur propriété de résister à l'hydrolyse des RNases A et T<sub>1</sub> (LEE et Coll., 1971 ; MENDECKI et Coll., 1972) ; en effet, la ribonucléase A attaque de manière spécifique les liaisons phosphodiesteres proches des pyrimidines et la ribonucléase T<sub>1</sub> agit préférentiellement au niveau des liaisons avec la guanosine.

Afin de disposer d'une quantité de matériel suffisante, nous avons réalisé des essais successifs (Tableau 42) puis rassemblé d'une part, les fractions d'ARN qui se sont hybridées avec le sépharose-poly (U) et d'autre part, les fractions non retenues correspondantes. Ces fractions sont soumises à l'hydrolyse enzymatique par les ribonucléases A et T<sub>1</sub> et chromatographiées sur colonne de sépharose-poly (U). Il apparaît que seule la fraction retenue

(Tableau 43) contient des séquences polyadényliques. De plus, ces séquences isolées, résistantes aux ribonucléases A et T<sub>1</sub>, représentent environ 22 % de la radioactivité de ces ARN.

	Radioactivité (en c.p.m)			
	Total	Filtrat	Eluat	(Eluat en % du total)
Fraction retenue	6.508	5.073	1.435	(22,04 %)
Fraction non retenue	217.880	217.379	501	(0,23 %)

TABLEAU 43 : Chromatographie sur colonne de sépharose-poly (U) des séquences polyadényliques issues de l'hydrolyse enzymatique de fractions d'ARN retenues ou non provenant de séparations successives identiques à celles du tableau 42.

Ces fractions issues de fragments de feuilles avant la mise en culture sont précipitées en présence d'alcool (et d'ARN entraîneur le cas échéant). Les acides nucléiques sont dissous dans une solution tamponnée à pH 7,4 de Tris 10 mM et de NaCl 300 mM puis hydrolysés à 37°C pendant 45 minutes par les RNases A et T<sub>1</sub> (Boehringer Mannheim réf. 15410 et 15411 ; 40 µg et 20 unités respectivement pour 100 µg d'ARN). Le milieu d'incubation est amené à la concentration de 1 % en S.D.S. puis déprotéinisé à l'aide d'un mélange en parties égales de phénol et de chloroforme (contenant 1 % d'alcool isoamylique). Le passage sur colonne de sépharose-poly (U) scinde les différentes fractions ainsi traitées en une partie qui n'est pas fixée (filtrat) et en une autre qui se lie aux séquences poly-uridyliques du sépharose et qui sera éluée (éluat) dans les conditions précédemment décrites.

Etant donné la faible quantité de matériel radioactif recueilli au niveau des séquences polyadényliques, il ne nous a pas été possible d'en étudier la taille moyenne de manière systématique. Cependant, quelle que soit la longueur de ces séquences, un essai réalisé à partir de différentes extractions, sans tenir compte de la durée de culture des tissus, nous a fourni une valeur de 94 % en AMP. Cette proportion en AMP des séquences poly (A) obtenues par chromatographie (système solvant : acide isobutyrique-ammoniaque 0,5 N (10/6 ; v/v), 15 heures à 25°C), selon une méthode décrite

par ailleurs (RAMBOUR et Coll., 1977), n'a donc qu'une valeur indicative. Nous avons également vérifié que les séquences poly (A) sont totalement hydrolysables par la RNase T<sub>2</sub>, qui attaque de manière spécifique les liaisons entre les nucléotides puriques (PHILIPSON et Coll., 1971). Dans ce cas, les séquences polyadényliques, en solution dans un tampon acétate (pH = 4,5) contenant 900 mM de NaCl et 10 mM d'EDTA, sont mises en présence de 10 unités/ml de T<sub>2</sub> à 37°C. Après 30 minutes d'incubation, les molécules radioactives acido-précipitables représentent moins de 1 % de la radioactivité initiale.

Ces différents éléments montrent donc bien l'existence, au sein des tissus de feuilles d'endive, d'ARN polyadénylés. Cependant, par suite de la petite quantité de matériel dont nous pouvions disposer, nous nous sommes contenté de suivre l'évolution des ARN-poly (A<sup>+</sup>) au cours de la culture : au niveau de l'ARN global, ainsi qu'au niveau des ARN "liés" à l'albumine méthylée (fraction "TB-RNA") après élution saline.

## 2°) Evolution des ARN polyadénylés de l'ARN global

L'ARN polyadénylé est présent quel que soit le moment du prélèvement (Tableau 44). Il y a, en effet, une incorporation préférentielle d'adénosine au niveau des fractions retenues sur le sépharose-poly (U) tant au 2e qu'au 7e jour de culture. Toutefois, si l'activité spécifique des ARN polyadénylés est 1,5 fois supérieure à celle des ARN non retenus au temps J<sub>0</sub>, elle est multipliée par 3 après 2 jours et par 4, après 7 jours de culture. Ceci est la conséquence de l'incorporation préférentielle, de plus en plus importante, du précurseur radioactif au niveau des fractions retenues sur le sépharose-poly (U). De plus, on constate (Tableau 45), sur l'ARN extrait des explantats avant l'ensemencement ou après 7 jours de culture, que la fraction résistante à l'action des ribonucléases A et T<sub>1</sub>

		Radioactivité (c.p.m.)	Absorbance (à 260 nm)	Activité spécifique
J <sub>0</sub>	ARN initial	37.380	17,29	2.162
	Fraction non retenue	35.750	16,81	2.126
	Fraction retenue	1.630	0,48	3.395
	(en % du total)	4,36 %	2,78 %	-
J <sub>2</sub>	ARN initial	169.075	16,51	10.240
	Fraction non retenue	153.075	15,93	9.609
	Fraction retenue	16.000	0,58	27.586
	(en % du total)	9,46 %	3,51 %	-
J <sub>7</sub>	ARN initial	115.290	19,88	5.799
	Fraction non retenue	97.939	19,03	5.146
	Fraction retenue	17.351	0,85	20.412
	(en % du total)	15,05 %	4,30 %	-

TABLEAU 44 : Chromatographie sur colonne de sépharose-poly (U) de l'ARN global extrait de fragments de feuilles d'endive avant la mise en culture (J<sub>0</sub>) et après 2 (J<sub>2</sub>) ou 7 (J<sub>7</sub>) jours de culture. Pour permettre une comparaison plus facile, nous avons de nouveau fait figurer les résultats du lot témoin (J<sub>0</sub>) qui apparaissent dans le tableau 42 .

Fractions retenues	Radioactivité (en c.p.m)			
	Total	Filtrat	Eluat	(Eluat en % du total)
J <sub>0</sub>	6.508	5.073	1.435	(22,04 %)
J <sub>2</sub>	18.240	16.160	2.080	(11,40 %)
J <sub>7</sub>	22.152	17.256	4.896	(22,10 %)

TABLEAU 45 : Chromatographie sur colonne de sépharose-poly (U) des séquences polyadényliques après hydrolyse enzymatique des fractions d'ARN polyadénylés (fractions retenues ; tableau 44) provenant d'extraits effectués avant l'ensemencement (J<sub>0</sub>) ou après 2 (J<sub>2</sub>) ou 7 jours (J<sub>7</sub>) de culture.



représente 22 % de la radioactivité des molécules ayant une affinité pour le sépharose-poly (U). Par contre, au 2e jour de la culture, les séquences polyadényliques ne représentent que 11 % de la radioactivité des molécules d'ARN polyadénylé.

### 3°) Evolution des ARN polyadénylés de la fraction "TB-RNA" des colonnes de MAK

Les fractions correspondant aux ARN solubles d'une part et aux ARN ribosomiaux d'autre part, sont rassemblées, dialysées contre de l'eau distillée à 4°C, puis précipitées. Les fractions "TB-RNA" sont déprotéinées puis les ARN sont précipités par de l'éthanol. Ces différentes catégories de molécules sont alors mises en solution dans le tampon de liaison approprié puis passées sur colonne de sépharose-poly (U) selon le protocole décrit précédemment.

Après passage des ARN solubles et ribosomiaux, il n'y a pas de rétention par les colonnes de sépharose-poly (U). Ce type d'ARN ne contient donc pas de séquences polyadényliques hybridables, quel que soit d'ailleurs le moment de prélèvement. Cela s'applique également à la fraction qui est éluée avec le gradient salin, après les ARN ribosomiaux ( (5) ; Figure 22) au 2e jour de la culture et qui a été traité en même temps qu'eux. Dans la fraction "liée" à l'albumine méthylée, si le pourcentage d'ARN polyadénylé (fraction retenue, Tableau 46), augmente dès le 2e jour de culture (il passe de 31 % à 40 % environ), au 7e jour, il en représente la majeure partie (83 % environ).

	Radioactivité (c.p.m)			
	Total	Fraction non retenue	Fraction retenue	Fraction retenue (en % du total)
J <sub>0</sub>	9.790	6.794	2.296	(30,60 %)
J <sub>2</sub>	66.380	40.028	26.352	(39,70 %)
J <sub>7</sub>	37.260	6.398	30.862	(82,83 %)

TABLEAU 46 : Chromatographie sur colonne de sépharose-poly (U) des fractions "liées" ("TB-RNA") à la colonne de MAK après l'élu-tion saline. Ces fractions proviennent d'extraits effectués avant l'ensemencement (J<sub>0</sub>) ou après 2 (J<sub>2</sub>) ou 7 jours (J<sub>7</sub>) de culture.

### C) DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Aussitôt après leur prélèvement, les fragments sont incubés pendant 5 heures dans la solution radioactive. Les synthèses observées à ce stade correspondent, au moins en partie, à l'exaltation des phénomènes métaboliques provoqués par le traumatisme dû au prélèvement des tissus. On sait en effet que la fragmentation de feuilles ou d'organes de réserve tels que racines ou tubercules entraîne une augmentation de l'activité respiratoire (Mc DONALD et DEKOCK, 1958 ; LIORET, 1960 ; THORPE et MEIER, 1972), des synthèses d'ARN et de protéines (SETTERFIELD, 1963 ; CLICK et HACKETT, 1963 ; MASUDA, 1966 ; LAVÉE, 1968 ; DMITRIEVA et BUTENKO, 1970 ; NAG et JOHRI, 1970 ; ROSE et SETTERFIELD, 1971), de certains systèmes enzymatiques (FOSKET et ROBERTS, 1965 ; LAVÉE et GALSTON, 1968 ; BIRECKA et Coll., 1972 ; BRINKMAN et Coll., 1973 ; BROSSARD, 1973 ; PITT, 1974) et en particulier, de l'activité ribonucléasique (BAGI et FARKAS, 1967 ; UDVARDY et Coll., 1969 ; DE LEO et SAGHER, 1970 ; 1971 ; PITT, 1971 ; PITT et GALPIN, 1971 ; WYEN et Coll.,

1971 ; SACHER et DAVIES, 1974 ; SACHER et Coll., 1975). D'autres auteurs signalent que ces synthèses peuvent être très spécifiques. FITT (1974) par exemple, montre que la section de feuilles de *Solanum tuberosum* entraîne la stimulation de l'activité ribonucléasique due à l'augmentation de la synthèse enzymatique pendant les 24 heures qui suivent la coupure. De plus, SACHER et DE LEO (1977) estiment que la section de tissus de *Phaseolus vulgaris* induit la transcription de deux ARN messagers, l'un pour la RNase (30' après la section) et l'autre pour un répresseur protéinique dont l'accumulation provoquerait l'arrêt de la synthèse enzymatique par un blocage au niveau de la traduction.

Bien que le mécanisme soit encore mal connu, l'exaltation du métabolisme après traumatisme est un phénomène général chez les plantes supérieures et a souvent été interprété comme une conséquence de la dérégulation du génome (BACON et Coll., 1965 ; EDELMAN et HALL, 1965 ; WILLEMOT et STUMPF, 1967 ; ELLIS et MC DONALD, 1967 ; CHERRY, 1968 ; KAMISAKA et MASUDA, 1968 ; DUDA et CHERRY, 1971). Ainsi, avec des tissus de moelle de tabac, SIMARD (1971) signale que le traumatisme est à lui seul, capable d'augmenter de manière significative (2,5 % environ) le taux des noyaux incorporant de la thymidine tritiée. GUILLE et Coll. (1968) montrent également que l'ADN nucléaire est d'un type particulier, riche en GMP + CMP. L'augmentation de cet ADN précède les divisions de cicatrisation. De même, dès la 2e heure après la mise en culture des tissus de carotte, LACHARME et STEIMAN (1970a et b) constatent successivement : l'hydrolyse des ARN solubles, la synthèse des ARN ribosomiaux, puis l'apparition d'une quantité importante d'ARN de poids moléculaires élevés (55 S) qui pourraient être des ARN inducteurs de la division cellulaire, du type des "D-RNA". JALOUZOT et GONTCHAROFF (1973) observent que pendant les premières heures qui suivent la section d'hypocotyles de pois chiches ou de fèves, il y a une brusque augmentation des pro-

téines précédant la première synthèse d'ARN qui a lieu vers la 6<sup>e</sup> heure. Cette phase précoce d'activation génétique permettrait la synthèse de nouveaux ARN messagers capables de fonctionner sur des ribosomes préexistants. Sur des explantats de feuilles de begonia, BIGOT (1971) observe une augmentation de la synthèse d'ARN localisée au niveau de la zone de blessure. L'ensemble du fragment, par contre, manifeste une réduction de son métabolisme. C'est seulement après 48 heures que les zones d'initiation sont activées.

Il est cependant souvent difficile de dissocier les réactions de blessure de celles provoquées par le passage sur un milieu nutritif. Aussi, n'avons nous pas tenté d'analyser les processus qui se déroulent au cours des premières heures qui suivent la mise en culture car notre matériel semble peu approprié à une telle étude. Par contre, nous avons réalisé cette analyse à l'aide de suspensions cellulaires de *Silene alba*, plus appropriées à ce genre de travail. Nous avons montré en particulier (DUBOIS et Coll., 1976) que dès le début de l'ensemencement, il y a une première synthèse d'ARN dont l'intensité maximum s'observe après 6 heures ; elle est suivie par une seconde beaucoup plus importante vers le 3<sup>e</sup> jour de culture.

Dans nos conditions expérimentales, les explantats de feuilles d'endive mis à incuber avant culture subissent déjà un processus d'activation métabolique. Au cours de la culture, ils montrent deux périodes où les synthèses d'ARN sont actives ; ces périodes correspondent à des transformations histologiques caractéristiques. La première s'observe après 2 jours de culture, elle se signale par une synthèse importante de la fraction "TB-RNA" et une baisse en ARN ribosomiaux. La deuxième se produit au 7<sup>e</sup> jour de culture, les synthèses sont quantitativement moins importantes, avec diminution de l'ARN soluble et augmentation de l'ARN ribosomal. Parallèlement, on peut noter (Tableau 47) :

Moment du Prélèvement	Fraction "TB-RNA", en % : (1)	ARN polyadénylés, en % : (2)		Séquences polyadényliques, en % : (3)
		de l'ARN global	de la fraction "TB-RNA"	
J <sub>0</sub>	12,53	4,36	30,60	22,04
J <sub>2</sub>	21,23	9,50	39,70	11,40
J <sub>7</sub>	17,67	15,05	82,83	22,10

TABLEAU 47: Récapitulatif des principaux résultats concernant les ARN polyadénylés.

Nous avons fait figurer :

- (1) pourcentage de radioactivité de la fraction "TB-RNA", qui reste fixée sur la colonne de MAK après élution saline, par rapport à la radioactivité de l'ARN total
- (2) pourcentage des ARN polyadénylés par rapport à la radioactivité de l'ARN total et à celle de la fraction "TB-RNA"
- (3) pourcentage de radioactivité des séquences polyadényliques par rapport à celle des ARN polyadénylés.

- une augmentation de la proportion des ARN polyadénylés qui représentent alors 15 % de la radioactivité totale.

- une diminution de la radioactivité liée à la fraction "TB-RNA" alors que le pourcentage des ARN polyadénylés de cette fraction augmente considérablement (83 % environ).

L'apparition des premières ébauches de bourgeons est donc accompagnée d'une synthèse d'ARN à renouvellements rapides, dont plus de 80 % sont des ARN messagers polyadénylés.

La proportion des ARN polyadénylés est relativement moins élevée au 2<sup>e</sup> jour de culture (9,5 % au lieu de 15 %), alors que la radioactivité de la fraction "TB-RNA" est plus importante (21 %). Comme le pourcentage

des ARN-poly ( $A^+$ ) de cette fraction est faible (40 % environ), on peut se demander quelle est la nature des ARN, non polyadénylés, qui représentent en fait 60 % de la fraction "liée" à l'albumine méthylée. Il peut y avoir plusieurs possibilités :

- en plus des messagers d'histones qui ne possèdent pas de séquences polyadényliques (ADESNIK et Coll., 1972), certains ARN messagers ont la même particularité ; ils peuvent représenter de 30 à 40 % de l'activité messagère totale (MILCAREK et Coll., 1974 ; LEWIN, 1974 ; GROOT et Coll., 1974 ; NEMER et Coll., 1974 ; GRONER et Coll., 1974 ; FRASER, 1975 ; WHEELER et HARTLEY, 1975 ; FROMSON et VERMA, 1976 ; COVAY et GRIERSON, 1976 ; DELSENY et Coll., 1977 ; RAGG et Coll., 1977). Ainsi, LODISH et Coll. (1974) signalent qu'un certain pourcentage de l'activité messagère totale peut ne pas se lier à la cellulose-oligo ( $dT^+$ ) ; toutefois, GRAY et CASHMORE (1976) précisent que si les fractions d'ARN polysomal contiennent des ARN messagers polyadénylés et d'autres qui ne le sont pas, les deux classes coderaient pour les mêmes polypeptides.

- les ARN messagers posséderaient des séquences polyadényliques trop petites pour s'hybrider convenablement avec l'acide polyuridylique du sépharose. On observe, en effet, au 2e jour de culture, que les segments polyadényliques ne représentent que 11 % de la longueur des ARN polyadénylés au lieu de 22 %.

- la fraction "TB-RNA" pourrait être constituée à la fois d'ARN "riches" en AMP et d'autres qui seraient plus proches des espèces moléculaires contenues dans le "D-RNA". Au 2e jour de culture, il apparaît en effet un pic de radioactivité, élué après les ARN ribosomaux que nous

avons assimilé comme un certain nombre d'auteurs (KEY et INGLE, 1964 ; JOHRI et VARNER, 1970) au "D-RNA". La présence de ce type d'ARN, à ce stade de la culture, nous permet d'envisager une augmentation semblable au sein de la fraction "liée" sur la colonne de MAK après le passage du gradient salin. Toutefois, il faut éliminer la possibilité d'agrégation entre molécules, qui aurait tendance à augmenter le pourcentage de radioactivité retenue sur la colonne par rapport à celle qui est éluée avec le gradient salin. Les expériences ont été réalisées en présence d'EDTA et les résultats ont toujours été très reproductibles. Par ailleurs, la chromatographie sur colonne de MAK dépend d'un certain nombre de facteurs (albumine méthylée, nature du gradient salin, température, pH, pression...) qu'il est nécessaire de préciser et de maintenir aussi constants que possible. On peut cependant penser que dans nos conditions expérimentales, la fraction "D-RNA", apparente au 2e jour de culture, est mal définie : éluée en partie à la fin du gradient salin et en partie avec la fraction "TB-RNA".

E

E

E

## CONSIDERATIONS GENERALES

### CONCLUSIONS

Au cours de ce travail, nous avons voulu apporter une contribution à l'étude de la régulation de la néoformation des bourgeons et tenté de comprendre certaines modifications biochimiques liées à ce phénomène. Il nous paraît maintenant indispensable de replacer nos résultats dans un cadre plus général et de les discuter.

La néoformation des bourgeons peut sembler indépendante de l'âge des tissus. Ainsi, de très jeunes feuilles (*Begonia rex* ; *Peperomia magnoliaefolia* ; *Lilium martagon*) se bouturent avec la même facilité que les feuilles adultes (BIGOT, 1966b) ; que ces feuilles aient été prélevées sur des plantes âgées ou très jeunes (ARNASON et Coll., 1967). Toutefois, dans certains cas, le pouvoir de régénération varie avec l'âge des tissus ou la différenciation des cellules ; ainsi, les feuilles d'*Heloniopsis orientalis* (KATO, 1972 ; 1974) perdent leur pouvoir de régénérer des organes en

vieillissant. Parfois même il y a un véritable gradient du pouvoir organogène, par exemple sur les tiges feuillées de *Polytrichum juniperinum* (GAY, 1968) les feuilles du sommet régénèrent plus facilement des organes que celles de la base. Ce n'est cependant pas un phénomène général puisque chez *Lilium longiflorum* (HACKETT, 1969) les explantats prélevés sur les écailles âgées forment plus de bourgeons que ceux provenant des écailles internes. De même, les jeunes feuilles de *Bryophyllum daigremontianum* (VARDAR et ACARER, 1957) ne forment pas de bourgeons épiphylls, et chez *Atropa belladonna* (ZENKTELER, 1971) seules les feuilles adultes donnent naissance à des bourgeons.

L'âge des feuilles est donc un mauvais critère pour définir leurs capacités organogènes (BOURIQUET, 1966b). C'est néanmoins un facteur extrêmement important dont peut dépendre non seulement le nombre, mais également la nature des organes formés. Ainsi, les jeunes feuilles d'*Echeveria elegans* ne produisent que des racines alors que les feuilles âgées forment essentiellement des bourgeons (RAJU et MANN, 1970) ; la formation des bourgeons serait liée à l'importance de la différenciation vasculaire. Dans le cas des feuilles d'endive, nous avons observé que ce sont les petites feuilles du centre du bourgeon étioilé qui sont les plus organogènes (VASSEUR, 1965b ; BOURIQUET et VASSEUR, 1966), ce qui peut s'expliquer parce qu'elles sont plus jeunes. Sur les feuilles adultes, les tissus prélevés à la pointe des feuilles produisent plus facilement des bourgeons que ceux de la base ; or, ni les données relatives à la croissance des feuilles ni les coupes histologiques (VASSEUR, 1965a) ne permettent de distinguer les deux catégories d'explantats dont le degré de différenciation est sensiblement identique ; il faut donc admettre qu'il y a entre la base et le sommet des feuilles adultes, une différenciation plus complexe, sans doute d'ordre physiologique. La nature

et la répartition des régulateurs endogènes pourraient par exemple expliquer la capacité organogène des tissus. En effet, un certain nombre d'observations montrent que les feuilles jeunes et les feuilles adultes peuvent différer par leur métabolisme (KULAEVA, 1967 ; JONES, 1975), par leur richesse en substances de croissance (AVERY, 1935 ; AGHION-PRAT, 1965a et b ; WARDELL et SKOOG, 1969 ; ZENTKELER, 1971 ; KATO, 1972), ainsi que par leur réaction à des facteurs tels que l'acide gibbérellique (MARCELLE, 1963), les cytokinines (BANERJI et LALORAYA, 1963 ; Mc HALES et DOVE, 1969) ou même les rayons X (BOURIQUET et COUVEZ, 1967).

Certains travaux ont mis en évidence que la capacité de prolifération des tissus est en relation avec leur teneur en acides nucléiques et en protéines. Ainsi, dans les feuilles de *Nicotiana rustica* (WOLLGIEHN, 1967) le taux des acides nucléiques et des protéines augmente au cours de la maturation des feuilles, puis diminue nettement quand elles vieillissent. De même, la prolifération des fragments de moelle de tabac prélevés à différents niveaux de la tige, est directement proportionnelle aux gradients d'ARN et de protéines (LAVEE et GALSON, 1968). Avec des fragments de feuilles d'endive, nous avons pu également établir une relation entre le gradient morphogène et la teneur des tissus en ADN, en ARN et en protéines. En effet, ces constituants augmentent de la base à l'apex et des feuilles externes aux feuilles centrales ; ils évoluent donc comme le pouvoir organogène des tissus. Ces résultats confirment ceux de KULAEVA et Coll. (1968) qui montrent que la teneur en acides nucléiques diminue au cours du vieillissement des tissus foliaires d'orge et qu'en particulier, le rapport ARN/ADN baisse. BOTTFGER et WOLLGIEHN (1958) ont également observé que le rapport ARN/protéines est plus élevé dans les feuilles jeunes de *Nicotiana tabacum*. Les tissus qui manifestent une capacité de prolifération et d'organogénèse importante renferment une quantité élevée d'acides nucléiques et de

protéines. Pour certaines enzymes : auxines-oxydase, peroxydase et catalase (VASSEUR et LEGRAND, 1972) un gradient identique a été mis en évidence. La répartition de ces composés est donc susceptible d'expliquer la capacité organogène de disques de feuilles, prélevés à différents niveaux du bourgeon d'endive.

Cependant, les feuilles adultes ayant comme les plus jeunes, la possibilité de former des bourgeons, on peut penser qu'il s'agit d'une propriété héréditaire, liée à un caractère génétique spécifique. Ce caractère s'exprimerait aussitôt après la séparation de la plante mère (PREVOT, 1939a) et concernerait la synthèse de substances organogènes (BIGOT, 1966b). L'influence des caractères génétiques sur la capacité organogène des tissus a déjà été soulignée à maintes reprises. En effet, si certaines espèces peuvent produire des bourgeons, d'autres sont totalement incapables de le faire et jusqu'à présent, aucune substance exogène n'a pu surmonter cette incapacité. Toutefois, le contrôle génétique doit s'exercer par l'intermédiaire du métabolisme de la plante et c'est à ce niveau que nous avons fait porter nos investigations.

Le milieu peut modifier le développement de fragments d'organes. Son action sur la prolifération cellulaire varie suivant la nature du tissu (GAUTHERET, 1944) mais de manière générale, le contact du milieu aqueux favorise le développement des racines et gêne celui des bourgeons. Pour certaines plantes, la nature physique du milieu conditionne le succès ou l'échec de la tentative de culture "in vitro". Une orchidée par exemple exige un milieu liquide (MURASHIGE, 1974) alors que des cultures de bourgeons apicaux d'*Asparagus* réclament un milieu gélosé (MURASHIGE et Coll., 1972). SKOOG (1944) a également observé que les cultures de cals de *Nicotiana tabacum* différencient des bourgeons

lorsqu'elles sont transférées d'un milieu gélosé à un milieu liquide. De même, des explantats de racines de *Cichorium intybus* forment des bourgeons végétatifs sur un milieu liquide, alors que sur un milieu solidifié par de la gélose, ils produisent des bourgeons inflorescentiels (MARGARA et BOUNIOLS, 1967 ; MARGARA et Coll., 1968). La nature physique du milieu nutritif joue donc un rôle important et par conséquent, la concentration en gélose utilisée pour solifier le milieu (ROMBERGER et TABOR, 1971). Ainsi, KATO (1974) signale que le nombre des bourgeons diminue lorsque la concentration en agar baisse. Cela peut également avoir un retentissement sur le métabolisme. BOUNIOLS et MARGARA (1971) observent des différences dans la composition en acides aminés des fragments de racines de *Cichorium intybus* cultivés soit sur un milieu liquide soit sur un milieu gélosé ; une relation entre la nature du milieu et le métabolisme protéique est donc impliquée. De plus, l'oxygénation du milieu de culture (SKOOG, 1944 ; KESSEL et CARR, 1972) ainsi que l'ambiance aqueuse (GAUTHERET, 1940 ; 1942b ; 1950) peuvent jouer un rôle déterminant sur les phénomènes d'organogenèse. Il était donc indispensable de déterminer la concentration en gélose la plus favorable au développement des tissus d'endive et de fixer le pH du milieu de culture qui modifie la solidification de la gélose.

Toutes nos expériences ont été réalisées à un pH de 5,5 (GAUTHERET, 1959) ; dans ces conditions, la concentration en gélose la mieux adaptée à la manifestation des phénomènes d'organogenèse est de 9 ‰. Le milieu liquide est, non seulement défavorable à la formation des bourgeons, mais encore il réduit le nombre d'explantats capables de proliférer et retarde l'apparition du cal. Le contact avec le milieu gélosé lui-même, peut, dans certains cas, inhiber la prolifération et la néoformation des bourgeons. Par exemple, quand les explantats sont ensemencés dans le sens normal, le nombre total des bourgeons est réduit, mais ces organes apparaissent en plus grand nombre dans la région apicale des explantats, maintenue hors

du milieu de culture.

Le milieu intervient non seulement par sa nature physique mais aussi par sa composition chimique. Malgré l'intérêt que cela pouvait présenter, nous n'avons pas étudié l'action des éléments minéraux considérés habituellement comme nécessaires à la croissance des végétaux. Nous nous sommes contenté de comparer les effets de quelques solutions nutritives fréquemment employées pour la culture de tissus avec la volonté de choisir un milieu de composition simple qui permette un développement satisfaisant des organes néoformés. Dans ce but, nous avons sélectionné la solution minérale de KNOP diluée au demi. De plus, suivant les tissus utilisés, les sucres peuvent stimuler (CHLYAH, 1972 ; GWOZDZ et SZWEYKOWSKA, 1969), réduire (PAULET, 1965) ou même supprimer (MARGARA, 1969a ; LEFEBVRE, 1976) le bourgeonnement végétatif. Ces différences de comportement s'expliquent essentiellement par un taux de glucides intracellulaires qui peut varier avec l'origine des tissus. Dans le cas des tissus de feuilles d'endive, il y a d'abord stimulation de la production des bourgeons lorsque le glucose est employé à faibles concentrations. L'effet optimum est obtenu avec 3 % de glucose qui devient ensuite d'autant plus inhibiteur que la dose est plus élevée.

Les tissus de *Cichorium intybus* sont connus depuis longtemps pour leur capacité à produire spontanément des bourgeons (SCHOUTEDEN-WERY, 1920 ; GAUTHERET, 1941 ; 1959 ; VASIL et HILDEBRANDT, 1966). Des fragments de racines ont été utilisés pour analyser des phénomènes de dédifférenciation (BUVAT, 1944-45) et de différenciation cellulaire (CAMUS, 1949). De nombreux travaux ont montré (KULESCHA et CAMUS, 1948 ; WARMKE et WARMKE, 1950 ; KULESCHA, 1951) que la régénération d'organes est sous la dépendance de la teneur en auxine endogène des tissus. Après la mise en évidence de cytokinines dans les tissus d'endive (VARDJAN et NITSCH, 1961 ; NITSCH et Coll., 1966 ; BUI-DANG-HA et NITSCH, 1970), il apparaît que les phénomènes d'organogenèse

sont, comme pour les tissus de tabac, sous la dépendance d'un équilibre auxines-cytokinines. Chez d'autres tissus, tels que les écailles de lis (BIGOT, 1971) et les feuilles de bégonia (HEIDE, 1965), la capacité de bourgeonnement est en relation étroite avec le taux de cytokinines endogènes. La teneur en ces régulateurs peut d'ailleurs varier avec les saisons (ELIASSON, 1971) et en fonction de facteurs tels que la lumière et la température (HEIDE, 1964 ; 1967 ; NITSCH, 1962).

L'adénine présente parfois des effets synergiques avec des cytokinines et a pu être considéré, chez le tabac, comme un précurseur de cytokinines endogènes (NITSCH et Coll., 1967). Toutefois, avec les fragments de feuilles d'endive, l'adénine a une activité beaucoup plus faible que la kinétine dont elle n'augmente pas l'efficacité à l'égard de la néoformation des bourgeons. A l'inverse de la kinétine, elle n'interfère pas avec l'auxine et ne peut pas davantage être assimilée à une source d'aliment azoté ainsi que l'a suggéré MENHENETT (1970). Certes, il peut exister parfois une compétition entre l'absorption de l'adénine et de la kinétine (OLSZEWSKA, 1959 ; LEGUAY et Coll., 1970) ; mais il semblerait que l'adénine stimule la néoformation des bourgeons simplement en tant qu'élément constitutif des acides nucléiques.

Les bases qui entrent dans la composition des acides nucléiques stimulent généralement la formation des bourgeons mais à des degrés divers. Selon SKOOG et TSUI (1948 ; 1951) l'adénine serait la base la plus active. D'autre part, PAULET et NITSCH (1959) ont montré, avec des fragments de *Cardamine pratensis*, que l'adénine et la thymine sont les plus efficaces. De plus, sur les tissus de *Nicotiana tabacum* (PAULET, 1965), toutes les bases sont actives mais parmi les bases pyrimidiques, la thymine est prépondérante puis, en ordre décroissant, l'uracile et enfin la cytosine. Parmi les bases puriques, la guanine agirait davantage. En dehors de l'adé-

nine, dont nous avons déjà parlé, les différentes bases ne favorisent pas toujours les phénomènes d'organogenèse (NITSCH et Coll., 1967 ; DOERSCHUG, 1968 ; WARDELL et SKOOG, 1969). BIGOT (1971) a même montré que la thymine et la guanine peuvent inhiber la formation des bourgeons par des fragments de feuilles de begonia.

Les résultats obtenus avec des fragments de feuilles d'endive indiquent que l'adénine est la plus active puis, par ordre décroissant, l'uracile et la thymine. Les mélanges équimolaires des bases correspondant soit à l'ARN soit à l'ADN n'ont pas permis de dire si cette activité correspond à un type d'acide nucléique particulier. L'adénine et l'uracile jouent donc un rôle essentiel dans le déterminisme du bourgeonnement des tissus de feuilles d'endive. Mais la néoformation d'un bourgeon étant le résultat d'une activité mitotique intense au cours de laquelle s'organise peu à peu un méristème caulinaire, on pouvait s'attendre à ce que la thymine ait une efficacité plus importante. Le peu d'action exercée par cette base et par la cytosine ou la guanine nous amène à penser que ces substances ne pénètrent que difficilement dans les tissus ou que leur accumulation est susceptible de provoquer une rétro-inhibition des enzymes nécessaires à leur entrée dans le métabolisme cellulaire.

En présence d'acide gibbérellique, les réponses observées sont très variées. Sur les tissus de racines de *Cichorium intybus*, l'acide gibbérellique n'a pas d'influence sur les bourgeons qui se forment spontanément, mais inhibe le bourgeonnement induit par la kinétine (BESEMER, 1968). Sur les feuilles vertes qui spontanément ne forment que des racines, la kinétine peut initier des bourgeons ; ce processus est inhibé par l'AG<sub>3</sub> (BESEMER et Coll., 1969). De plus, la formation des racines, sur ces feuilles, est inhibée par la kinétine, mais ne semble pas affectée par l'acide gibbérellique. Avec des feuilles étiolées d'endive, nous avons

constaté que de faibles doses d'acide gibbérellique ne modifient pas la formation des bourgeons mais stimulent faiblement celle des racines. Au-delà de  $10^{-5}$ M, il y a inhibition de la formation des organes. Associée à l'auxine, l'acide gibbérellique renforce essentiellement les effets inhibiteurs de cette substance sur la formation des bourgeons. Par contre, sur la rhizogénèse, l'acide gibbérellique peut exalter les propriétés stimulantes de l'acide indolylacétique. Ces résultats nous suggèrent que l'action de l'acide gibbérellique sur le bourgeonnement pourrait s'exercer par l'intermédiaire du métabolisme auxinique. GAUTHERET (1961) montre par exemple que l'AG<sub>3</sub>, comme la kinétine, n'est actif qu'en présence d'auxine. Mais cela ne semble pas général (THORPE et MEIER, 1973). De même, si parfois les cytokinines réduisent l'inhibition de l'acide gibbérellique à l'égard de la formation des bourgeons (CHLYAH, 1969 ; ENGELKE et Coll., 1973 ; KATO et HONGO, 1974) ce n'est pas toujours le cas (SCHRAUDOLF et REINERT, 1959 ; MURASHIGE, 1965 ; HEIDE, 1969). Nous avons montré également que dans le cas des feuilles d'endive, la kinétine n'est pas capable de lever l'inhibition produite par l'AG<sub>3</sub>, ce qui concorde avec les résultats obtenus par BESEMER et Coll. (1969).

La néoformation des bourgeons est cependant bien plus complexe que les essais précédents ne semblent le laisser supposer. En effet, il a été montré qu'un grand nombre d'autres facteurs participent à la régulation des phénomènes d'organogénèse, que ce soit l'acide abscissique ou l'éthylène (BOURIQUET, 1972), le fer (LEGRAND, 1975), les phosphates minéraux, la tyrosine et la phénylalanine (SKOOG, 1970) ainsi que les phénols (PAUPARDIN, 1970). Ces derniers, augmentent l'efficacité de l'auxine (RABIN et KLEIN, 1957 ; NITSCH et NITSCH, 1959b ; PAULET et NITSCH, 1963 ; LEE et SKOOG, 1965 ; PAULET et LIORÉ, 1966 ; RUCKER et PAUPARDIN, 1969) ou de l'acide gibbérellique (NITSCH et NITSCH, 1961). L'amidon, dont la synthèse est liée à la présence de lumière, semble jouer également un rôle important dans la

reprise des divisions cellulaires et dans les phénomènes d'organogenèse (THORPE et MURASHIGE, 1968 ; BROSSARD, 1970 ; 1975 ; THORPE et MEIER, 1972). Il pourrait servir de support énergétique aux réactions qui accompagnent les divisions cellulaires car l'amylogenèse se produit essentiellement dans les cellules susceptibles de produire des bourgeons ou dans celles qui sont sous-jacentes ; la quantité d'amidon formé s'amenuise à mesure que les organes se développent. L'auxine (SOBCZYK et SZWEYKOWSKA, 1973) et l'acide gibbérellique (THORPE et MEIER, 1973) pourraient intervenir dans ces phénomènes. On sait, par exemple, que l'AG<sub>3</sub> peut induire la formation d' $\alpha$ -amylase (VARNER et RAM CHANDRA, 1964). Par ailleurs, la levée d'inhibition des bourgeons axillaires du *Cicer arietinum* par la kinétine (CODACCIONI et USCIATI, 1969) se produit parallèlement à une modification de la teneur en amidon des tissus sous-jacents ; la kinétine pouvant d'ailleurs induire également la synthèse d' $\alpha$ -amylase (CLUM, 1967 ; NOUGAREDE et Coll., 1973). La multiplicité des réponses observées avec des fragments de plantes cultivées in vitro est donc le reflet d'un grand nombre de facteurs tels que : l'origine et l'état physiologique des tissus, les conditions de culture (sels minéraux, sucre, lumière, température, substances de croissance...), le métabolisme (composés phénoliques, amidon...) etc..

Un autre élément s'ajoute encore à la complexité des phénomènes, c'est le moment d'application de ces différents facteurs. Quelques travaux ont montré en effet que l'ordre dans lequel agissent les substances de croissance, peut déterminer leur efficacité sur les phénomènes de prolifération et d'organogenèse. Ainsi, la prolifération des tissus de moelle de tabac exige la présence d'une cytokinine et d'une auxine. La kinétine doit intervenir d'abord (1 à 2 jours) et ensuite l'auxine qui, contrairement à la kinétine, serait utile en permanence ; la séquence inverse ne produit qu'une croissance faible. La gibbérelline n'interviendrait que pour sensi-

biliser les cellules à l'action de la kinétine. L'acide gibbérellique amplifierait la dérégulation des gènes activés lors du prélèvement des explantats et une cytokinine serait alors indispensable pour "conditionner" les tissus et les rendre capables de se diviser. Il y aurait activation des synthèses nucléolaires avec production d'ARN de transfert ainsi que des ribosomes nécessaires aux synthèses protéiques. L'auxine interviendrait dans cette dernière phase, car elle produit souvent une augmentation importante de l'ARN ribosomal (NITSCH et BUI DANG HA, 1967 ; NITSCH et LANCE-NOUGAREDE, 1967 ; NITSCH, 1968a, b et c) ; on peut donc penser que ces substances induisent des processus dont l'ordre séquentiel est indispensable à la multiplication cellulaire. Avec des fragments de tige de tabac, THORPE et MEIER (1973) montrent également que l'acide gibbérellique n'est vraiment efficace que s'il est appliqué avant la formation des bourgeons.

Ces résultats suggèrent donc que le déterminisme de la régulation hormonale se déroule par étapes successives et s'oriente sous l'effet de substances variées au cours des différents stades du développement. Mais les mécanismes semblent dépendre du matériel utilisé. Sur les fragments de feuilles vertes de *Cichorium intybus*, pour que la néoformation des bourgeons soit optimale, la kinétine doit agir entre le 2<sup>e</sup> jour de culture et la fin de la différenciation des bourgeons. La kinétine est donc nécessaire pour préparer la différenciation des bourgeons, mais aussi pour l'entretenir (BESEMER et Coll., 1969) ; l'acide gibbérellique agirait en même temps que la kinétine. Les différences s'accroissent encore avec les tissus de chou-fleur (MARGARA, 1969b) pour lesquels la séquence auxine-cytokinine est la plus efficace. Par ailleurs, avec des fragments de feuilles de *begonia*, BIGOT (1971) montre que la néoformation des bourgeons est stimulée par la 6-benzylaminopurine, même lorsque cette substance est appliquée pendant un temps très court : de 3 minutes à 3 heures après le prélèvement des

explantats. L'acide gibbérellique interviendrait de façon similaire : 5 minutes d'application étant suffisantes pour obtenir un effet inhibiteur dont l'importance diminue en retardant le moment d'application. Selon l'auteur, l'acide gibbérellique freinerait les phénomènes de dédifférenciation et agirait sur la synthèse des ARN qui précèdent le premier cycle mitotique. Une cytokinine serait capable de rétablir cette synthèse en stimulant le bourgeonnement.

Ce type d'expérience est cependant soumis à certaines limitations apportées par la technologie elle-même. En effet, l'action de la substance ne cesse pas en même temps que la durée du traitement et il est difficile de juger de la quantité réellement absorbée. Néanmoins, l'ordre dans lequel les substances hormonales interviennent est sans doute important, mais varie avec la nature des tissus et les conditions de culture.

Selon SKOOG (1970), ces substances hormonales agiraient en modulant l'expression des gènes qui seraient dérèprimés lors du prélèvement des explantats et en permettant l'orientation du métabolisme dans une voie plutôt que dans une autre, sans affecter la nature mais seulement l'équilibre des produits formés. Ainsi, les cytokinines exogènes pourraient influencer la synthèse d'autres facteurs de croissance indispensables comme la thiamine (LINSMAIER et SKOOG, 1966 ; DIGBY et SKOOG, 1966 ; DRAVNIEKS et Coll., 1969), l'auxine (LAU et YANG, 1973) ainsi que les cytokinines endogènes. Ces faits militent d'ailleurs en faveur de la présence indispensable d'une activité de type cytokinine dans les ARN de transfert. On peut penser en effet que des substances telles que la kinétine qui ne sont pas des cytokinines naturelles, puissent déclencher à l'intérieur des tissus, la production de substances actives qui seraient les cytokinines naturelles. Cela pourrait se produire par l'intermédiaire

d'ARN de transfert dont certaines bases rares peuvent présenter des activités de type cytokinine (BELLAMY, 1966 ; LETHAM et RALPH, 1967 ; KOVOOR, 1968 ; ARMSTRONG et Coll., 1969). De nombreux auteurs ont d'ailleurs souligné les relations qui existent entre les acides nucléiques et les hormones végétales. (HEYES, 1963a ; TATA, 1966 ; DAVIES et Coll., 1968 ; KEY et INGLE, 1968 ; KEY, 1969 ; PARKASH, 1972 ; GUERN, 1972 ; PEAUD-LENOEL et Coll., 1972 ; DAVIES, 1973 ; KEY et VANDERHOEF, 1973 ; GWOZDZ, 1973 ; GWOZDZ et Coll. 1974 ; JACOBSEN, 1977). On pouvait alors supposer l'existence de liens étroits entre le métabolisme nucléaire et la néoformation des bourgeons. La mise en évidence de tels liens nécessite cependant, soit de vérifier la sensibilité du bourgeonnement à des substances susceptibles de perturber la synthèse des acides nucléiques, comme par exemple les analogues structuraux des bases puriques et pyrimidiques, soit d'étudier directement le métabolisme de ces acides nucléiques. Nous avons utilisé successivement ces deux méthodes.

Les effets inhibiteurs de l'hydrazide maléique ont été signalés par de nombreux chercheurs ; ainsi par exemple, lors de l'enracinement des boutures (SEN et BASU, 1960 ; GUILLOT, 1967) et de la croissance des racines (BUTENKO et BASKAKOV, 1961 ; SCHAEFFER et SOROKIN, 1966). De même, l'hydrazide maléique peut inhiber la prolifération cellulaire et la formation des bourgeons obtenus à partir d'explantats de racines d'endive (GAUTHERET, 1952b). De nombreuses hypothèses ont été proposées pour tenter d'expliquer l'action de l'hydrazide maléique. Récemment, on a suggéré que l'hydrazide maléique est un antagoniste de croissance parce qu'il intervient comme un analogue pyrimidique. Cette hypothèse est basée essentiellement sur la propriété que possède l'uracile de prévenir les effets de l'hydrazide maléique. Nous avons en effet pu mettre en évidence le rôle de l'hydrazide en tant que substance antimétabolite de l'uracile sur le bourgeonnement des fragments de feuilles d'endive. Cependant, certaines expériences montrent que les effets inhibi-

teurs de l'hydrazide maléique ne sont pas toujours supprimés par l'apport de bases pyrimidiques (LOVELESS, 1953 ; DEYSSON et DEYSSON, 1953 ; SCHAEFFER et SOROKIN, 1966 ; GUILLOT, 1967 ; CLEDJO et GASPARD, 1969 ; NOODEN, 1969). De plus, il ne semble pas exclu que l'hydrazide maléique soit métabolisé par les cellules et qu'il puisse donner naissance à une série de produits eux-mêmes inhibiteurs de la croissance (BISWAS et Coll., 1968).

Le traitement des fragments de feuilles d'endive par des analogues puriques (2,6 diaminopurine et 8-azaguanine) ou pyrimidiques (6-azauracile et 5-fluorouracile) affecte aussi bien le développement du cal que la néoformation des bourgeons. Seul l'hydrazide maléique peut, selon la concentration utilisée, n'inhiber que la formation des bourgeons. Ceci avait déjà été signalé par GAUTHERET (1952b) sur des fragments de racines d'endive. De même GUILLOT (1967) a observé que l'hydrazide maléique pouvait inhiber complètement la rhizogénèse sans affecter la croissance des boutures de tomate.

Un certain nombre d'analogues manifestent des propriétés d'antimétabolites uniquement pour la base correspondante : adénine (2,6 diaminopurine), guanine (8-azaguanine) et uracile (hydrazide maléique). Cependant, les résultats obtenus avec le 6-azauracile et le 5-fluorouracile sont moins nets car les inhibitions produites peuvent être supprimées soit totalement par l'ensemble des bases pyrimidiques (6-azauracile), soit seulement de manière partielle (5-fluorouracile).

Même si nos connaissances sur le métabolisme et les mécanismes d'action de ces analogues sont encore très fragmentaires, les résultats que nous avons obtenus soulignent le rôle important du métabolisme nucléaire dans les phénomènes d'organogénèse. Il était alors nécessaire d'analyser un certain nombre de constituants biochimiques susceptibles de caractériser la néoformation des bourgeons. Pour cela, les techniques d'étude ont dû

être choisies en fonction de la nature de notre matériel (MATERIEL ET TECHNIQUES, C, § 2). En effet, la plupart des tissus végétaux et les tissus de feuilles d'endive plus particulièrement, contiennent des substances susceptibles d'interférer avec les méthodes de dosage. Il est d'autant plus important d'en prendre conscience que ces substances évoluent au cours de la culture. Ainsi, nous avons montré que les résultats obtenus peuvent être erronés et à la limite, ne présenter de significations que pour les composés dont il aurait fallu s'affranchir. Ces composés qui sont souvent des flavonoïdes et des acides phénol-carboxyliques (ROUX, 1963 ; SEIGLE-MURANDI, 1971), se lient aux molécules nucléiques par des liaisons qui ne sont que difficilement rompues lors des diverses opérations de séparations et d'analyses mises en jeu normalement. Par ailleurs, les difficultés liées à l'analyse des modifications biochimiques qui se produisent au sein des tissus sont considérables, car le résultat d'un dosage correspond, en fait, à une valeur moyenne pour des milliers de cellules très diversement différenciées et avec des métabolismes différents. En ayant conscience des limites d'un tel travail, il reste néanmoins possible de relier les phénomènes morphogénétiques aux transformations biochimiques qui ont lieu simultanément. Dans ce but, il était toutefois indispensable de préciser d'abord les étapes histologiques caractéristiques de la néoformation des bourgeons.

Sur le milieu de base tel que nous l'avons défini, les bourgeons apparaissent en majorité au niveau du cal qui se forme à la partie basale des explantats. L'étude histologique montre que les premières divisions cellulaires se manifestent vers le 3e jour de culture au niveau du parenchyme vasculaire (COUILLEROT, 1973 ; COUILLEROT et Coll., 1978). Au fur et à mesure que la prolifération s'intensifie, d'autres tissus vont participer à l'élaboration du cal ; seul l'épiderme reste totalement inerte dans ces

conditions de culture. Vers le 6<sup>e</sup> jour, les premiers méristèmes de bourgeons apparaissent au niveau du parenchyme néoformé, d'origine vasculaire. Le cal qui se développe à la partie basale a donc une origine profonde : c'est le xylème qui est en effet le premier tissu à réagir à l'induction morphogénétique. Ceci est assez exceptionnel, car dans la plupart des cas, la caulogénèse de fragments de feuilles s'effectue soit à partir d'un cal, soit directement à partir de cellules ou de groupes de cellules situées dans les tissus superficiels et c'est généralement l'épiderme ou l'assise sous-épidermique qui possède la plus grande aptitude à la néoformation des bourgeons (BIGOT, 1971, 1974, 1976 ; PREVOT, 1976). On peut rapprocher ces résultats du fait que chez certaines espèces, le xylème joue un rôle particulier, en permettant la prolifération des cellules de parenchyme médullaire, comme par exemple chez *Tillia armorica* (BARKER, 1953) ou *Nicotiana tabacum* (JABLONSKI et SKOOG, 1954).

Chacune des deux étapes histologiques est caractérisée par une synthèse particulière d'ARN total :

- la première a lieu avant toute division cellulaire, se caractérise par un rapport AMP/UMP élevé ( $=1,54$ ) et semble régler l'importance de la prolifération cellulaire

- la seconde, qui se produit en même temps que naissent les premières ébauches méristématiques, présente un rapport AMP/UMP plus faible ( $=0,80$ ) et doit orienter quantitativement et qualitativement les processus de la différenciation organogène.

Ces deux étapes peuvent se différencier également par la nature des espèces d'acides ribonucléiques synthétisées. Il y a d'abord, avant les

premières divisions cellulaires, une stimulation importante de la synthèse de la fraction "TB-RNA" et un ralentissement de celle des ARN ribosomiaux. Par opposition, dans la synthèse qui prélude à la formation des nodules méristématiques, la part de l'ARN ribosomal est prépondérante, alors que la radioactivité incorporée dans les ARN solubles et dans la fraction "TB-RNA" diminue. Les ARN qui restent "liés" à la colonne de MAK après l'éluion saline (fraction "TB-RNA") peuvent être considérés comme la fraction messagère des ARN isolés et donnent une indication sur l'activité du génome. La néoformation des bourgeons nécessite donc des remaniements métaboliques importants qui peuvent être révélés au niveau de l'expression des gènes.

Quelques travaux mettent en évidence des modifications biochimiques conduisant à la division cellulaire ou à la réalisation d'un processus morphogénétique. A partir de tissus de moelle de tabac par exemple, BUTENKO (1971) a montré, par analyse immunoélectrophorétique, que deux antigènes spécifiques disparaissent lors de l'induction de la division cellulaire alors qu'un antigène, caractéristique des méristèmes de la tige de la plante entière, apparaît. Ces antigènes pourraient servir de marqueurs dans l'étude du processus de la différenciation cellulaire. De même, si la croissance des bourgeons de tubercules de topinambour est sous la dépendance d'un certain nombre de facteurs (COURDUROUX, 1967), des modifications biochimiques accompagnent les différences morphogénétiques observées entre les pousses longues et les pousses tubérisées. La synthèse des ARN et le métabolisme des nucléotides sont en rapport avec l'état physiologique de ces pousses (GENDRAUD et TEPPAZ-MISSON, 1969 ; GENDRAUD, 1975) dont la morphogenèse a également pu être associée à la stimulation ou à l'inhibition de la synthèse de protéines spécifiques sous le contrôle de l'acide gibbérellique (TEPPAZ-MISSON et GENDRAUD, 1970). Un autre

exemple est fourni par les bourgeons axillaires de *Cicer arietinum* qui réagissent à une application de 6-benzylaminopurine par une levée d'inhibition dont la séquence des événements a été déterminée (USCIATI et Coll. 1969 ; 1970 ; CODACCIONI et USCIATI, 1970). Il n'y a par contre, à notre connaissance, aucun travail identique concernant la néoformation des bourgeons ; la seule approche a été réalisée par BIGOT (1971) qui a montré, avec des fragments de feuilles de *Begonia rex*, que la phase préparatoire à la formation des bourgeons se situe plus particulièrement au 2<sup>e</sup> et au 3<sup>e</sup> jour après la séparation des explantats. De plus, comme l'adénine joue un rôle important dans l'initiation des bourgeons, cet auteur émet l'hypothèse que le conditionnement au bourgeonnement pourrait dépendre de certains ARN spécifiques plus riches en adénine.

Puisque l'on sait maintenant que la plupart des ARN messagers sont polyadénylés, nous avons cherché à les isoler en nous basant sur la propriété des séquences poly (A) de s'hybrider à l'acide polyuridylique fixé sur du sépharose. Nous avons ensuite suivi leur évolution au cours de la néoformation des bourgeons. Toutefois, avant de situer nos résultats parmi ceux de nos prédécesseurs, il nous a paru souhaitable d'apporter quelques précisions sur la présence et le rôle des séquences polyadényliques au sein des ARN messagers (\*)

(\*) au cours de la dactylographie de ce manuscrit, nous avons eu connaissance de la publication d'un travail (DELSENY, 1978, *Ann. Biol.* ; 17, 1-59) qui analyse les problèmes posés par l'isolement et la caractérisation des ARN messagers des cellules d'eucaryotes et des cellules végétales plus particulièrement.

A l'intérieur du règne végétal des séquences polyadényliques ont été découvertes chez des euglènes (SAGHER et Coll., 1974), des mousses (STEGMANN et HAHN, 1974), des champignons (LODISH et Coll., 1974 ; FIRTEL et Coll., 1972), des fougères (IQBAL, 1977) ainsi que chez un certain nombre de végétaux supérieurs (HIGGINS et Coll., 1973 ; MANAHAM et APP, 1973 ; VAN DE WALLE, 1973, VERMA et Coll., 1974 ; DELSENY et Coll., 1974 ; YOSHIDA, 1974 ; ESNAULT et Coll., 1975 ; TRAPY et Coll., 1975 ; KEY et SILFLOW, 1975 ; TOBIN et KLEIN, 1975 ; COVEY et GRIERSON, 1976 ; GRIERSON et COVEY, 1976 ; GORDON et PAYNE, 1976 ; PAYNE, 1976 ; RAMBOUR et Coll., 1977 ; SIELIWANOWICZ et Coll., 1977).

Les études sur la formation de l'ARN m-poly ( $A^+$ ) révèlent deux mécanismes possibles. D'une part, le segment poly (A) pourrait être ajouté aux longues chaînes d'ARN nucléaires juste après la transcription, l'ARN apparaîtrait alors dans le cytoplasme directement sous forme polyadénylée (DARNELL et Coll., 1971 ; JELINEK et Coll., 1973 ; BRAWERMAN, 1974). D'autre part, le segment poly (A) pourrait être lié à l'ARN messager dans le cytoplasme (SLATER et Coll., 1973 ; DIEZ et BRAWERMAN, 1974). La taille de ces séquences polyadényliques est très variable : de 20 à 50 résidus d'AMP (Mc LAUGHLIN et Coll., 1973 ; GRONER et Coll., 1974) à 200 nucléotides et plus (DARNELL et Coll., 1971). Ces séquences sont liées de manière covalente à l'extrémité 3'-OH des molécules d'ARN messagers. Cependant, des séquences internes ont été mises en évidence (LODISH et Coll., 1973 ; NAKAZATO et Coll., 1974) ; elles sont généralement plus courtes, d'environ 20 à 25 nucléotides et peuvent être transcrites.

Le rôle du segment poly (A) dans l'ARN messager n'est pas encore clairement défini (HUNT, 1975). Il pourrait jouer un rôle dans le transport de l'ARN messager du noyau vers le cytoplasme (JELINEK et Coll., 1973). Mais des segments poly (A) ont été signalés dans l'ARNm des mitochondries

(ROSEN et EDELMAN, 1976) et des chloroplastes (WILLIAMSON et Coll., 1974). Il pourrait également augmenter la stabilité de l'ARN messenger (SOREQ et Coll., 1974). Toutefois, on ne trouve aucune différence dans la stabilité de certains ARN m avec ou sans poly (A) (SIPPEL et Coll., 1974 ; WILLIAMSON et Coll., 1974). La présence de ce segment serait peut-être liée à la durée de vie de l'ARN messenger. En effet, une diminution de la longueur de la séquence polyadénylique aussitôt après son apparition dans le cytoplasme, a pu être reliée à une baisse de l'activité de l'ARN m (SHEINESS et DARNELL, 1973 ; LEVY et Coll., 1975 ; SHEINESS et Coll., 1975).

Malgré tous ces aspects qui restent à préciser, de nombreuses observations montrent l'attachement des séquences poly (A) à une fraction qui présente des caractéristiques messagères (VERMA et Coll., 1974 ; TOBIN et KLEIN, 1975 ; GORDON et PAYNE, 1976). Toutefois, la possibilité d'isoler et de caractériser des ARN messagers est encore trop récente pour que cela ait pu susciter de nombreux travaux. Si on écarte ceux qui se limitent à la simple mise en évidence, bien peu ont essayé d'établir un parallèle entre les ARN polyadénylés et les problèmes de croissance et de développement. On peut cependant retenir que si l'acide gibbérellique est susceptible d'augmenter la synthèse des ARN polyadénylés cytoplasmiques (JACOBSEN et ZWAR, 1974 ; HO et VARNER, 1974) et même nucléaires (WASILEWSKA et KLECZKOWSKI, 1974), l'auxine (VERMA et MACLACHLAN, 1976) et la kinétine (VANDERHOEF et KEY, 1968) pourraient avoir un effet contraire sur ce type de molécules. Par ailleurs, il y aurait une relation entre les périodes d'éclairement et la synthèse des ARN messagers (TOBIN et KLEIN, 1975). En particulier chez les euglènes cultivées préalablement à l'obscurité, la lumière déclenche la formation de polysomes qui peuvent être groupés en polysomes "photo-actifs", qui disparaissent rapidement après interruption de l'éclairement, et en polysomes "photo-induits" dont l'édification

se poursuit à l'obscurité (VERDIER et Coll., 1973 ; HEIZMANN, 1976).

Les ARN liés à des segments polyadénylés appartiendraient essentiellement à la classe "photoactive" dont la synthèse est limitée aux phases d'éclaircissement tandis que les ARN polysomiques, rapidement marqués, non liés à de telles séquences, feraient partie de la classe "photo-induite". On peut également citer les travaux de STILES et DAVIES (1976) qui soulignent une augmentation de la synthèse de toutes les espèces moléculaires d'ARN, y compris l'ARN-poly ( $A^+$ ) juste après l'induction florale, lors de la formation des primordiums floraux. Cependant, si les proportions relatives des ARN solubles, ribosomiaux ou polyadénylés restent inchangées, ces auteurs précisent que cette stimulation globale est en relation avec une augmentation des divisions cellulaires. GRIERSON et COVEY (1975) tentent d'établir une relation semblable et signalent qu'une augmentation rapide du contenu en ARN, dans les premières feuilles de *Phaseolus aureus*, se produit entre le 3e et le 4e jour de germination. Parallèlement, les divisions cellulaires et l'ARN messager-poly ( $A^+$ ) augmentent. De plus, il y a une diminution rapide de la quantité d'ARN-poly ( $A^+$ ), contrairement aux autres formes stables d'ARN, après la cessation des divisions cellulaires.

Les résultats que nous avons obtenus montrent une stimulation de la synthèse des ARN polyadénylés lors des phénomènes de prolifération cellulaire, ils sont donc à rapprocher de ceux de GRIERSON et COVEY (1975). Toutefois, nous avons mis en évidence un certain nombre d'éléments nouveaux. Au 7e jour de culture, lors de l'apparition des premiers nodules méristématiques, les ARN de la fraction "TB-RNA" renferment plus de 80 % d'ARN polyadénylés. L'apparition des organes se caractérise donc essentiellement par la synthèse de messagers polyadénylés. Par contre, au 2e jour de culture, pendant la phase d'induction mitotique et avant les premières divisions cellulaires, les phénomènes observés sont différents. Tout

d'abord on note une proportion plus importante d'ARN retenus sur la colonne de MAK (21 %) parmi lesquels environ 40 % seulement sont polyadénylés ; le reste pourrait alors comprendre des ARN messagers non polyadénylés ou présentant des séquences trop courtes pour s'hybrider à l'acide polyuridylique lié au sépharose ou encore des ARN de la catégorie du "D-RNA" ; ces derniers sont d'ailleurs présents sur les profils d'éluion des colonnes de MAK, au 2e jour de la culture, juste après les ARN ribosomiaux. Il est alors possible que dans nos conditions expérimentales, une partie du "D-RNA" soit éluee avec la fraction "TB-RNA". Cette phase de synthèse, avant les divisions cellulaires, pourrait donc être caractérisée davantage par ce type d'ARN, constitué de molécules de grande taille qui seraient des pré-curseurs d'ARN ribosomiaux ou représenteraient la forme nucléaire, initiatrice des ARN messagers (TEISSERE et Coll., 1972 ; SCHMID et Coll., 1975). Quelques travaux ont montré l'intervention possible de cette catégorie de molécules dans la régulation de l'expression génétique. Ainsi, LACHARME (1972) met en évidence des ARN de poids moléculaire élevé (32 à 55 S) qui joueraient un rôle important dans le déclenchement des divisions cellulaires. L'acide abscissique et la kinétine interviendraient sur la synthèse d'espèces moléculaires de ce type (KHAN et ANOJULU, 1970 ; KHAN et Coll., 1970). De plus, récemment, RICARD et Coll. (1976) ont montré que l'auxine induit la synthèse d'ARN spécifiques représentés dès le début du traitement auxinique (1 H 30) par des ARN d'origine nucléaire (UMP/AMP : 1,12) puis par des ARN messagers polysomiques (UMP/AMP : 0,43) à mesure que l'action hormonale se prolonge.

Si les ARN polyadénylés sont prépondérants au moment où les méristèmes caulinaires s'organisent, la période qui précède les premières divisions cellulaires serait donc caractérisée davantage par l'apparition d'une catégorie d'ARN différente, apparentée, au moins en partie, au "D-RNA".

Certes, cette hypothèse devra être vérifiée car, si ces molécules dont on connaît un certain nombre de caractéristiques : renouvellement rapide, constante de sédimentation pouvant aller jusqu'à 60 S et plus, "richesse" en UMP, ont été décrites dans divers types de cellules animales, elles ne sont que rarement signalées dans le cas des cellules végétales. Ce type de molécule, dont l'existence est liée au noyau cellulaire, pose un problème plus général, qui est celui des liens éventuels entre les ARN nucléaires instables, les précurseurs des ARN ribosomiaux et les ARN messagers cytoplasmiques.

E

E

E

En conclusion, nous avons acquis une bonne maîtrise de notre matériel biologique et nous en avons fixé les conditions d'utilisation. Nous avons ensuite vérifié l'action d'un certain nombre de facteurs chimiques, afin de déterminer les propriétés organogènes de ces tissus dont l'emploi pour d'autres recherches, est maintenant possible. Enfin, nous avons cherché à préciser les étapes biochimiques liées à la néoformation des bourgeons.

La plupart des techniques que nous avons utilisées, basées sur des propriétés physicochimiques bien établies, sont couramment employées pour l'analyse des cellules animales et ont, le plus souvent, servi à l'étude du métabolisme des tissus végétaux, sans contrôle de leur efficacité. L'application de ces techniques à notre matériel a cependant présenté de nombreuses difficultés qui ont nécessité une étude critique. Cela aboutit à une méthodologie originale, adaptée aux exigences des tissus que nous avons employés.

Au terme de ce travail, nous avons l'impression certes, d'avoir résolu un certain nombre de questions mais aussi d'en avoir posé bien davantage. Peut-être est-ce là le reflet de la grande complexité des phénomènes d'organogenèse ? Néanmoins, ces résultats expérimentaux nous paraissent nécessiter d'autres développements. En particulier, une étude prospective sur l'action des hormones appliquées de manière séquentielle, en association ou non avec d'autres facteurs (nutrition, lumière ...) peut apporter des éléments nouveaux pour interpréter les mécanismes régulateurs de la néoformation des organes. Par ailleurs, la poursuite de ce travail nécessite de tenter de caractériser les ARN mis en évidence au 2e jour de la culture et que nous avons supposé être du type "D-RNA". Cette étude pouvant être réalisée conjointement à celle que nous avons entreprise avec les suspensions cellulaires de *Silene alba* qui se prêtent davantage à une analyse des mécanismes liés à la division cellulaire. Enfin, puisqu'il est possible, suivant les conditions expérimentales, de faire produire à ces tissus d'endive, soit des bourgeons, soit des racines, nous envisageons de comparer les espèces moléculaires d'ARN nécessaires à la réalisation de l'un ou de l'autre de ces programmes d'organogenèse.

E

E

E

## RESUME

L'étude de la néoformation des bourgeons a été réalisée à partir de fragments de feuilles étiolées d'endive (*Cichorium intybus* L. var. Witloof) cultivés in vitro.

Nous avons d'abord cherché à définir un milieu de base, aussi simple que possible, qui permette un développement satisfaisant des explantats. Après une série d'essais, nous avons choisi un milieu solidifié par de la gélose (0,9 %) qui comprend les sels minéraux de la solution de KNOP diluée de moitié et du glucose (3 %). Afin de tenir compte du gradient organogène, nous n'avons utilisé que les fragments (16 mm de diamètre) prélevés dans la partie médiane des feuilles moyennes des bourgeons étiolés d'endive.

A 22°C et éclairés 12 heures par jour, les explantats manifestent une polarité très marquée. Le cal apparaît à la partie basale des explantats et les organes naissent, pour la plupart, à ce niveau. Cette polarité est toutefois influencée par différents facteurs: âge et taille des explantats, mode d'ensemencement, présence de phytohormones dans le milieu de culture... .

L'apport de régulateurs de croissance nous a permis de vérifier leur rôle dans la néoformation des bourgeons. La kinétine augmente considérablement le nombre des bourgeons néoformés et l'auxine renforce son efficacité, ce qui explique en partie le rôle du lait de coco. L'acide gibbérel-lique, ajouté au milieu de culture, n'a pratiquement pas d'effet sur le

bourgeonnement si ce n'est qu'il est inhibiteur au-delà de  $10^{-5}$ M. Cette hormone réduit l'effet stimulant de la kinétine et renforce les propriétés rhizogènes de l'auxine. L'adénine stimule le bourgeonnement moins efficacement que la kinétine et ne modifie pratiquement pas l'effet de cette dernière. Ceci exclut que la cytokinine puisse agir par l'intermédiaire de l'adénine, d'autant plus que les interactions adénine-auxine sont nettement différentes des interactions kinétine-auxine ; la cytokinine et l'adénine possèdent donc apparemment un mode d'action indépendant. De plus, parmi les bases constitutives des acides nucléiques, l'adénine est la plus active, suivie par l'uracile et la thymine ; les autres bases puriques ou pyrimidiques n'ayant aucun effet.

Nous avons ensuite essayé de bloquer les phénomènes d'organogenèse par des analogues susceptibles de perturber le métabolisme des acides nucléiques. Les analogues puriques : 2,6-diaminopurine et 8-azaguanine, à concentrations appropriées, inhibent le bourgeonnement. Cette inhibition est supprimée respectivement par l'adénine ou la guanine. Les analogues pyrimidiques semblent avoir des modalités d'action plus complexes. Si l'inhibition des bourgeons par le 5-fluorouracile est levée partiellement, celle provoquée par le 6-azauracile est supprimée totalement à la fois par l'uracile, son nucléoside, la cytidine ou l'acide orotique. Contrairement aux analogues précédents, l'hydrazide maléique peut réduire la formation des bourgeons sans affecter celle du cal. Cette diminution peut être supprimée par l'uracile mais les autres bases ou leurs nucléosides sont sans effet. L'hydrazide maléique interviendrait donc comme un antimétabolite de l'uracile pour les tissus de feuilles d'endive. Notre connaissance imparfaite des mécanismes d'action de ces composés incite à beaucoup de prudence pour interpréter ces résultats ; ils soulignent néanmoins les relations qui existent entre le métabolisme des acides nucléiques et les phénomènes d'organogenèse.

Nous avons donc été amené à suivre l'évolution des acides nucléiques au cours de la néoformation des bourgeons. Il a fallu tout d'abord adapter les techniques biochimiques au matériel utilisé et suivre simultanément les principales modifications histologiques qui accompagnent la néoformation des bourgeons.

Au cours des transformations histologiques, deux étapes nous paraissent plus marquantes ; c'est au 3e jour de culture le début des divisions cellulaires puis à partir du 6e jour, l'apparition des nodules méristématiques. Chacune de ces étapes s'accompagne d'une synthèse accrue d'ARN, suivie de synthèses de protéines et d'ADN. L'exaltation de la synthèse d'ARN est le signal très précis des modifications histologiques observées. L'importance relative des synthèses d'ARN au cours de ces deux périodes est variable; il y a toutefois une relation entre elles comme entre la prolifération cellulaire et la formation de bourgeons au sein du cal inorganisé.

A l'aide de substances telles que l'auxine, la kinétine et l'hydrazide maléique qui permettent d'intervenir sur l'une ou l'autre étape du bourgeonnement, nous avons montré que la première synthèse d'ARN est liée à la prolifération cellulaire dont elle règle l'importance, alors que la seconde, qui correspond à la formation des nodules méristématiques, semble déterminer l'intensité du bourgeonnement.

Par incorporation de  $^{32}\text{P}$  dans les acides nucléiques au cours de la culture des tissus d'endive, nous avons pu montrer que les deux périodes de synthèse d'ARN total se distinguaient par un rapport différent entre les nucléotides adényliques et uridyliques.

L'utilisation de colonnes d'albumine méthylée et de sépharose-poly (U), nous permet de préciser que pendant la période qui précède les divisions cellulaires, l'incorporation d'adénosine- $^{14}\text{C}$  est proportionnellement plus importante au niveau des ARN solubles et de ceux demeurant

fixés sur l'albumine méthylée après l'élution saline. Cette fraction "TB-RNA" comprend 40 % environ d'ARN polyadénylés ; les ARN restant, dont la nature est discutée, doivent vraisemblablement jouer un rôle important dans l'induction de la prolifération cellulaire.

Lors de l'apparition des nodules méristématiques, il y a par contre une synthèse préférentielle d'ARN ribosomiaux, alors que la radioactivité incorporée dans les ARN solubles ainsi que celle associée à la fraction "TB-RNA" diminue. Cette fraction est d'ailleurs constituée en majeure partie (83 %) d'ARN polyadénylés. La formation des ébauches de bourgeons est donc liée essentiellement à la production d'ARN messagers polyadénylés.

H

H

H

## BIBLIOGRAPHIE

- ABERG (B.).- 1953. On the interaction of 2, 3, 5 - triiodobenzoïc acid and maleic hydrazide with auxin. *Physiol. Plant.*, 6, 277-291.
- ADESNIK (M.), (M.) SALDITT, (W.) THOMAS & (J.E.) DARNELL.- 1972. Evidence that all messenger RNA molecules (except histone messenger RNA) contain poly (A) sequences and that the poly (A) has a nuclear function. *J. mol. Biol.*, 71, 21-30.
- AGHION-PRAT (D.).- 1965a. Floral meristem-organizing gradient in tobacco stems. *Nature*, 207, 1211.
- AGHION-PRAT (D.).- 1965b. Néoformation de fleurs in vitro chez *Nicotiana tabacum* L. *Physiol. vég.*, 3, 229-303.
- ALLEN (R.J.L.).- 1940. The estimation of phosphorus. *Biochem. J.*, 34, 858-865.
- ALLSOPP (A.) & (A.) SZWEYKOWSKA.- 1960. Foliar abnormalities, including repeated branching and root formation, induced by kinetin in attached leaves of *Marsilea*. *Nature*, 186, 813-814.
- ANAND (V.K.), (R.N.) CHIBBAR & (K.K.) NANDA.- 1972. Effects of GA<sub>3</sub> and IBA on rooting and on the sprouting of buds on stem cuttings of *Ipomoea fistulosa*. *Plant Cell Physiol.*, 13, 917-921.
- ANDERSON (J.W.).- 1968. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry*, 7, 1973-1988.
- ARMSTRONG (D.J.), (F.) SKOOG, (L.H.) KIRKEGAARD, (A.E.) HAMPPEL, (R.M.) BOCK, (I.) GILLAM & (G.M.) TENER.- 1969. Cytokinins : distribution in species of yeast transfert RNA. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 63, 504-511.

- ARNASON (A.), (M.) TRAN THANH VAN & (P.) PREVOT.- 1967. Capacité formatrice de bourgeons chez les feuilles adultes et chez les jeunes feuilles du *Begonia rex* Putz. C. R. Acad. Sci. Paris, 264, 599-602.
- ARNAUD (Y.).- 1970. Analyse des séquences factorielles préalables à la morphogenèse : cas de la formation des leptotriches, poils ténus d'origine épidermique. Thèse de Doctorat d'Etat, Paris, 158 p.
- ARNAUD (J.), (P.) BARGE, (M.) RICHEZ & (R.J.) GAUTHERET.- 1956. Action de l'hydrazide maléique sur l'élaboration des glucides par les feuilles de tabac. C. R. Acad. Agric., 42, 168-171.
- ATTARDI (G.), (H.) PARNAS, (M.I.H.) HWANG & (B.) ATTARDI.- 1966. Giant-size rapidly labeled nuclear ribonucleic acid and cytoplasmic messenger ribonucleic acid in immature duck erythrocytes. J. mol. Biol., 20, 145-182.
- AVERY (G.S. Jr.).- 1935. Differential distribution of a phytohormone in the developing leaf of *Nicotiana*, and its relation to polarized growth. Bull. Torrey bot. Club, 62, 313-330.
- AVIV (H.) & (P.) LEDER.- 1972. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid cellulose. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A., 69, 1408-1412.
- BACON (J.S.D.), (I.R.) Mc DONALD & (A.H.) KNIGHT.- 1965. The developmental of invertase activity in slices of the root of *Beta vulgaris* L. washed under aseptic conditions. Biochem. J., 94, 175-182.
- BAGI (G.) & (G.L.) FARKAS.- 1967. On the nature of increase in ribonuclease activity in mechanically damaged tobacco leaf tissue. Phytochemistry, 6, 161-169.
- BAKER (J.E.).- 1961. A study of the action of maleic hydrazide on processes of tobacco and other plants. Physiol. Plant., 14, 76-88.

- BANERJI (D.) & (M.M.) LALORAYA.- 1963. Leaf age, a factor in the control of kinetin-regulated protein level in isolated Tobacco leaf discs. *Curr. Sci. India*, 32, 470-471.
- BARKER (W.G.).- 1953. Proliferative capacity of the medullary sheath region in the stem of *Tilia americana*. *Amer. J. Bot.*, 40, 773-778.
- BEAUCHESNE (G.).- 1960. Les substances de division cellulaire. Les kinétines. *Bull. Soc. fr. Physiol. vég.*, 6, 146-157.
- BEISENHERZ (W.).- 1972. Schnellmarkierte RNS in heterotroph kultivierten Geweben von *Nicotiana tabacum*. *Z. Naturforsch.*, 27, 1205-1215.
- BELLAMY (A.R.).- 1966. Cytokinins in ribonucleic acids. *Nature*, 211, 1093-1095.
- BERNIER (G.), (R.) BRONCHART, (A.) JACQMARD & (G.) SYLVESTRE.- 1967. Acide gibbérellique et morphogénèse caulinaire. *Bull. Soc. roy. bot. Belg.*, 100, 51-71.
- BESEMER (J.).- 1968. Der Einfluß von Wachstumsregulatoren auf Protein- und Enzym-Spektren kultivierter Explante aus Rüben von *Cichorium intybus* L. *Planta*, 82, 211-222.
- BESEMER (J.), (U.) HARDEN & (J.) REINERT.- 1969. Der Einfluß von Kinetin und Gibberellinsäure auf die Organbildung an in vitro kultivierten Blättern von *Cichorium intybus* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, 60, 123-134.
- BHOJWANI (S.S.) & (B.M.) JOHRI.- 1970. Cytokinin-induced shoot bud differentiation in mature endosperm of *Scurrula pulverulenta*. *Z. Pflanzenphysiol.*, 63, 269-275.
- BIGOT (C.).- 1965. Mise en évidence d'une polarité de morphogénèse dans le bouturage de fragments foliaires isolés. Aspects divers de cette morphogénèse. *Ann. Physiol. vég.*, 7, 295-333.

- BIGOT (C.).- 1966a. Action de trois adénines substituées sur l'apparition de néoformations sur des explantats foliaires de Begonia. Bull. Soc. bot. Fr., 113, 433-439.
- BIGOT (C.).- 1966b. Néoformation de bourgeons et de racines sur des feuilles immatures. Bull. Soc. bot. Fr., 113, 429-432.
- BIGOT (C.).- 1971. Analyse de quelques facteurs du bourgeonnement sur des fragments foliaires, en particulier chez un clone de Begonia rex Putz. Thèse de Doctorat d'Etat, Clermont-Ferrand, 274 p.
- BIGOT (C.).- 1974. Comparaison des aptitudes pour le bourgeonnement de tissus superficiels et de tissus profonds cultivés in vitro. C. R. Acad. Sci. Paris, 278, 1027-1030.
- BIGOT (C.).- 1976. Quelques aspects de la néoformation des bourgeons en relation avec la nature des tissus mis en culture. 101e Congrès nat. Soc. savantes, Lille, Sci., 1, 371-382.
- BIGOT (C.) & (A.) CHLYAH.- 1970. Stimulation précoce du bourgeonnement par la benzyladénine sur des explantats foliaires de Begonia rex Putz. Bull. Soc. bot. Fr. Mém., 117, 48-65.
- BIGOT (C.) & (J.P.) NITSCH.- 1968. Effet du moment de l'application d'acide gibbérellique ou de 2,6-diaminopurine sur la néoformation des bourgeons chez Begonia rex Putz. C. R. Acad. Sci. Paris, 267, 619-621.
- BIRECKA (M.), (L.M.) SHIH & (A.W.) GALSTON.- 1972. Isoperoxidase pattern in tobacco pith and their alteration following tissue excision. J. exp. Bot., 23, 655-666.
- BISWAS (P.K.), (O.) HALL & (B.D.) MAYBERRY.- 1968. The effects of maleic hydrazide on caffeine, tannin, DNA and RNA content in Tea, Camellia sinensis. Hort. Science, 2, 157-158.

- BLAYDES (D.F.).- 1966. Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissue. *Physiol. Plant.*, 19, 748-753.
- BONAR (R.A.) & (E.L.) DUGGAN.- 1955. The preparation of ribonucleoprotein from yeast. *J. Biol. Chem.*, 212, 697-704.
- BONNER (J.) & (J.A.D.) ZEEVART.- 1962. Ribonucleic acid synthesis in the bud, an essential component of floral induction in *Xanthium*. *Plant Physiol.*, 37, 43-49.
- BONNETT (H.T.) & (J.G.) TORREY.- 1965. Chemical control of organ formation in root segment of *Convolvulus* cultured in vitro. *Plant Physiol.*, 40, 1228-1236.
- BOTTGER (I.) & (R.) WOLLGIEHN.- 1958. Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Nucleinsäure und Eiweissstoffwechsel in grünen Blättern höherer Pflanzen. *Flora*, 146, 302-320.
- BOUILLENNE-WALRAND (M.) & (C.) LEYH.- 1962. The auxin metabolism of *Zea mays* L. (Phinney dwarf varieties), treated with gibberellic acid. *Meded. Landbouwhogeschool Gent*, 17, 1353-1370.
- BOUNIOLS (A.) & (J.) MARGARA.- 1971. Influence de la nature du milieu liquide ou gélosé sur la composition en acides aminés des tissus de racine d'Endive (*Cichorium intybus* L.) au cours de la néoformation in vitro de bourgeons végétatifs ou inflorescentiels. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 273, 1104-1107.
- BOURIQUET (R.).- 1960. Recherches sur l'activité de quelques facteurs de croissance à l'égard des tissus végétaux cultivés "in vitro". Thèse de Doctorat d'Etat, Paris, 234 p. et *Rev. Cytol. & Biol. vég.*, 21, 93-326.
- BOURIQUET (R.).- 1966a. Action de la lumière sur le développement des tissus de feuilles d'endive cultivés in vitro. *Photochem. Photobiol.*, 5, 391-395.

- BOURIQUET (R.).- 1966b. Le bourgeonnement. Rev. gén. Sci., 74, 357-363.
- BOURIQUET (R.).- 1972. Action de l'éthylène sur le bourgeonnement et la floraison in vitro de fragments de racine d'endive. C. R. Acad. Sci. Paris, 275, 33-34.
- BOURIQUET (R.) & (J.) COUVEZ.- 1967. Action des rayons X sur le bourgeonnement des tissus de feuilles d'endive cultivés in vitro. Bull. Soc. bot. Fr., Mém., 61-72.
- BOURIQUET (R.) & (J.) VASSEUR.- 1966. Sur la croissance et le bourgeonnement des tissus de feuilles d'endive cultivés in vitro. Dans : "Les phytohormones et l'organogenèse". Congrès international, Université de Liège, 38, 381-389.
- BOURIQUET (R.) & (J.) VASSEUR.- 1973. Croissance et bourgeonnement des tissus de feuilles d'endive en fonction de l'âge et du lieu de prélèvement des explantats. Bull. Soc. bot. Fr., 120, 27-32.
- Bragt (J. Van) & (R.L.M.) PIERIK.- 1971. The effect of autoclaving on the Gibberellin activity of aqueous solution containing Gibberellin A<sub>3</sub>. Misc. Papers, Landbouwhogeschool Wageningen, 9, 133-137.
- BRANDHORST (B.P.) & (E.H.) Mc CONKEY.- 1975. Relationship between nuclear and cytoplasmic polyadenylic acid. Proc. nat. Acad. Sci., U.S.A., 72, 3580-3584.
- BRAWERMAN (G.).- 1974. Eucaryotic messenger RNA. Ann. Rev. Biochem., 43, 621-642.
- BRAWERMAN (G.), (J.) MENDECKI & (S.Y.) LEE.- 1972. A procedure for the isolation of mammalian messenger ribonucleic acid. Biochemistry, 11, 637-641.
- BRIAN (P.W.).- 1960. Les gibbérélines : un nouveau groupe d'hormones végétales. Bull. Soc. fr. Physiol. vég., 6, 107-118.

- BRINKMAN (F.G.), (L.H. W. Van der) PLAS & (J.D.) VERLEUR.- 1973.  
Pyridine nucleotide levels in Potato tuber tissue and its mitochondrial fraction after wounding. *Z. Pflanzenphysiol.*, 68, 364-372.
- BROCKMAN (R.W.) & (E.P.) ANDERSON.- 1963. Pyrimidine analogues. Dans "The metabolic inhibitors" (Hochster R.M. et Quastel J.H. édit.) Academic Press, I., 239-289.
- BROSSARD (D.).- 1970. Evolution de la synthèse d'amidon durant l'organisation des nodules, puis des méristèmes primaires obtenus, in vitro, à partir d'explantats de moelle de tabac. Comparaison avec le point végétatif de la plante entière. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 271, 56-59.
- BROSSARD (D.).- 1973. Le bourgeonnement épiphyllé chez le *Bryophyllum daigremontianum* Berger (Crassulacées). Etude cytochimique, cytophotométrique et ultrastructurale. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, 14, 93-214.
- BROSSARD (D.).- 1975. La néoformation de bourgeons végétatifs à partir de la moelle du tabac (*Nicotiana tabacum* L. var. Wisconsin 38) cultivée in vitro. Analyse cytochimique, historadiographique et cytophotométrique. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, 16, 43-150.
- BROUGHTON (W.J.).- 1970. Détermination of total nucleic acids in plant tissue. *Ann. Biochem.*, 38, 291-295.
- BROWN (E.G.).- 1962. The acid-soluble nucleotides of mature Pea seeds. *Biochem. J.*, 85, 633-640.
- BROWN (R.) & (A.) DYER.- 1972. Cell division in higher plants. Dans "Plant Physiology" (Steward F.C. édit.). Academic Press, VI C, 49-90.
- BRUNEL (A.).- 1948. *Traité pratique de chimie végétale.* (Georges Frère édit.) Tourcoing, II, 515 p.

- BRYANT (J.A.).- 1976. Molecular aspects of differentiation Dans : "Molecular aspects of gene expression in plants" (Bryant J.A. édit.), Academic Press, 217-248.
- BUIATTI (M.).- 1968. The induction of tumors in the hybrid *Nicotiana glauca* x *N. langsdorffii* plants by 6-azauracil and its reversal by uracil and actinomycine D. *Cancer Res.*, 28, 166-169.
- BUI-DANG-HA (D.) & (J.P.) NITSCH.- 1970. Isolation of Zeatin riboside from chicory root. *Planta*, 95, 119-126.
- BURTON (K.).- 1956. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, 62, 315-323.
- BUSH (L.P.) & (J.L.) SIMS.- 1974. Morphological and physiological effects of maleic hydrazide on tobacco. *Physiol. Plant.*, 32, 157-160.
- BUTCHER (D.N.) & (H.E.) STREET.- 1960. Effects of kinetin on the growth of excised tomato roots. *Physiol. Plant.*, 13, 46-55.
- BUTENKO (R.G.).- 1968. Plant tissue culture and plant morphogenesis. (Chailakhyan M. Kh. édit.), Israel program for scientific translations, 291 p.
- BUTENKO (R.G.).- 1971. Cell differentiation in the tobacco tissue culture. Dans : "Les cultures de tissus de plantes". Colloques internationaux du C.N.R.S. n° 193, Strasbourg, 155-161.
- BUTENKO (R.G.) & (Y.A.) BASKAKOV.- 1961. On the mechanism of the effect of maleic hydrazide on plants (en russe). *Fiziol. Rast. SSSR*, 7, 385-394.
- BUTENKO (R.G.), (Z.M.) YAKOLEVA & (N.N.) DIMITRIEVA .- 1962. Effet de l'acide gibbérellique sur la croissance et le métabolisme auxinique de cultures de tissus isolés sous diverses conditions lumineuses (en russe). *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 139, 1246-1249.

- BUVAT (R.).- 1944-1945. Recherches sur la dédifférenciation des cellules végétales. Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. vég., 5, 1-130 et 6, 1-119.
- CALLAGHAN (J.J.), (M.D.) APPLETON, (W.) HAAB & (R.P.) PORTANOVA.- 1962. Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -labelled maleic hydrazide by RNA derived from *Saccharomyces cerevisiae*. Penn. Acad. Sci., 36, 91-95.
- CAMUS (G.).- 1949. Recherches sur le rôle des bourgeons dans les phénomènes de morphogénèse. Thèse de Doctorat d'Etat, Paris, 199 p. et Rev. Cytol. Biol. vég., 11, 1-199.
- CARLSON (J.M.).- 1954. Cytohistological response of plant meristems to maleic hydrazide. Iowa State College J. Sci., 29, 105-128.
- CECCHINI (J.P.) & (R.) MIASSOD.- 1976. Ribosomal cistrons in higher plant cells. I. A definitive scheme for the maturation pathway of the primary transcriptional product of ribosomal cistrons in *Acer pseudoplatanus* cells. Biochim. Biophys. Acta, 418, 104-116.
- CHAMPAGNAT (P.).- 1961. Différenciation. Formation des racines et des bourgeons, dominance apicale et épinastie. Encycl. of Plant Physiol., 14, 839-908.
- CHANDRA (G.R.) & (A.) ABDUL-BAKI.- 1977. Separation of poly (A) RNA's synthesized by soybean embryos. Plant Cell Physiol., 18, 271-275.
- CHAPMAN (K.S.R.) & (J.) INGLE.- 1976. The stability, polyadenylic acid content and ribonucleoprotein form of nuclear ribonucleic acid in artichoke. Biochem. J., 159, 585-600.
- CHERRY (J.H.).- 1968. Regulation of invertase in washed sugar beet tissue. Dans "Biochemistry and physiology of plant growth substances". Proc. of the 6<sup>th</sup> intern. Conf. on Plant Growth Substances - Ottawa - (Wightman F. et Setterfield G. édit.) The Runge Press Ltd. 417-431.

- CHERRY (J.H.) & (R.V.) HUYSTEE.- 1965. Effects of 5-fluoro-uracil on photoperiodic induction and nucleic acid metabolism of Xanthium. *Plant Physiol.*, 40, 987-993.
- CHLYAH (A.).- 1969. Capacité néoformatrice des feuilles non détachées d'une part et des feuilles fragmentées d'autre part, du *Begonia rex* Putz cultivar "Président". Thèse doctorat 3e Cycle, Paris.
- CHLYAH (A.).- 1972. Néoformation caulinaire et radriculaire chez les fragments de feuille de *Begonia rex* Putz : action de divers facteurs régulateurs trophiques et d'environnement. *Biol. Plant.*, 14, 204-212.
- CHLYAH (A.), (J.) LIEBERT, (M.) TRAN THANH VAN & (V.S.) TRIPPI.- 1971. Nucleic acids during root and bud formation in *Begonia* leaf fragments. *Phyton.*, 28, 23-26.
- CHOUARD (P.).- 1930. Régénération de bulbilles sur les feuilles vertes de certaines Liliacées. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 191, 1146-1148.
- CHOUARD (P.).- 1931. Type de développement de l'appareil végétatif chez les Scillées. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, 13, 131-143.
- CHOUARD (P.).- 1938. Sur le rôle des auxines dans l'organogenèse des plantes vasculaires. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 85, 546-555.
- CLAUSEN (T.).- 1968. Measurement of  $^{32}\text{P}$  activity in a liquid scintillation counter without the use of scintillator. *Analyt. Biochem.*, 22, 70-73.
- CLEDJO (O.) & (Th.) GASPAR.- 1969. Relations entre croissance, rhizogenèse et teneur en anthocyanes chez *Zea mays*. Action comparée de l'hydrazide maléique et du 2-thiouracile. *Rev. gén. Bot.*, 76, 257-265.

- CLICK (R.E.) & (D.P.) HACKETT.- 1963. The role of protein and nucleic acid synthesis in the development of respiration in potato tuber slices. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A., 50, 243-250.
- CLICK (R.E.) & (D.P.) HACKETT.- 1966. The isolation of ribonucleic acid from plant, bacterial and animal cells. Biochim. Biophys. Acta, 129, 74-84.
- CLUM (H.H.).-1967. Formation of amylase in disks of bean hypocotyl. Plant Physiol., 42, 568-572.
- CODACCIONI (M.) & (M.) USCIATI.- 1969. Influence de la 6-benzylamino-purine sur la teneur en glucides des bourgeons axillaires du *Cicer arietinum*. C. R. Acad. Sci. Paris, 269, 1671-1674.
- CODACCIONI (M.) & (M.) USCIATI.- 1970. Modifications cytologiques observées après application de 6-benzylaminopurine sur des méristèmes végétatifs du *Cicer arietinum*. C. R. Acad. Sci. Paris, 270, 942-944.
- COHEN (S.S.) & (H.D.) BARNER.- 1956. Studies on the induction of thymine deficiency and on the effects of thymine and thymidine analogues in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 71, 588-593.
- COHEN (S.S.), (J.G.) FLAKS, (H.D.) BARNER, (M.R.) LOEB & (J.) LICHTENSTEIN.- 1958. The mode of action of 5-fluorouracil and its derivatives. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A., 44, 1004-1012.
- COLLINS (W.T.), (F.B.) SALISBURY & (C.W.) ROSS.- 1963. Growth regulators and flowering. III. Antimetabolites. Planta, 60, 131-144.
- COUILLEROT (J.P.).- 1973. Phénomènes d'histogenèse dans les fragments d'épidermes et les explantats de feuilles d'endive étiolées (*Cichorium intybus* L.) cultivés "in vitro". Diplôme d'Etudes approfondies, Lille.

- COUILLEROT (J.P.), (R.) BOURIQUET & (J.L.) BONNEMAIN.- 1978. Phénomènes d'histogénèse dans les explantats de feuilles d'endives étiolées (*Cichorium intybus* L.) cultivés "in vitro". Rev. gén. Bot., 85, 3-10.
- COUPLAND (D.) & (A.J.) PEEL.- 1971. Uptake and incorporation of  $^{14}\text{C}$ -labelled maleic hydrazide into the roots of *Salix viminalis*. Physiol. Plant., 25, 141-144.
- COUPLAND (D.) & (A.J.) PEEL.- 1972. Maleic hydrazide as an antimetabolite of Uracil. Planta, 103, 249-253.
- COURDUROUX (J.C.).- 1967. Etude du mécanisme physiologique de la tubérisation chez le Topinambour (*Helianthus tuberosus* L.). Ann. Sci. Nat., 8, 215-356.
- COVEY (S.N.) & (D.) GRIERSON.- 1976. The measurement of plant polyadenylic acid by hybridisation with radioactive polyuridylic acid. Planta, 131, 75-79.
- DANCKWARDT-LILLIESTROM (C.).- 1957. Kinetin induced shoot formation from isolated roots of *Isatis tinctoria*. Physiol. Plant., 78, 3693-3703.
- DARLINGTON (C.D.) & (J.) Mc LEISH.- 1951. Action of maleic hydrazide on the cell. Nature, 167, 407-408.
- DARNELL (J.E.), (W.R.) JELINEK & (G.R.) MOLLOY.- 1973. Biogenesis of mRNA : genetic regulation in Mammalian cells. Science, 181, 1215-1221.
- DARNELL (J.E.), (L.) PHILIPSON, (R.) WALL & (M.) ADESNIK.- 1971. Polyadenylic acid sequences : role in conversion of nuclear RNA into messenger RNA. Science, 174, 507-510.
- DAS (N.K.), (K.) PATAU & (F.) SKOOG.- 1956. Initiation and cell division by kinetin and indole-acetic acid in excised tobacco pith tissue. Physiol. Plant., 9, 640-651.

- DAS (N.K.), (K.) PATAU & (F.) SKOOG.- 1958. Autoradiographic and microspectrophotometric studies on DNA synthesis in excised tobacco pith tissue. *Chromosoma*, 9, 606-617.
- DAVIES (P.J.).- 1973. Current theories on the mode of action of auxin. *Bot. Rev.*, 39, 139-171.
- DAVIES (D.D.), (B.D.) PATTERSON & (A.J.) TREWAVAS.- 1968. Studies on the mechanism of action of indoleacetic acid. Dans "Plant Growth Regulators", Society for chemical Industry, Monograph, 31, 208-223.
- DE DEKEN-GRENSON (M.) & (R.H.) DE DEKEN.-1959. Elimination of substances interfering with nucleic acids estimation. *Biochim. Biophys. Acta*, 31, 195-207.
- DE LEO (P.) & (J.A.) SACHER.- 1970. Control of ribonuclease and acid phosphatase by auxin and abscisic acid during senescence of *Rhoeo* leaf sections. *Plant Physiol.*, 46, 806-811.
- DE LEO (P.) & (J.A.) SACHER.- 1971. Effect of abscisic acid and auxin on ribonuclease during ageing of bean endocarp tissue sections. *Plant Cell Physiol.*, 12, 791-796.
- DELSENY (M.).- 1977. Recherches sur le métabolisme de l'ADN et des ARN messagers au cours de la germination des graines. Thèse de doctorat d'Etat, Montpellier, 212 p.
- DELSENY (M.), (L.) ASPART, (H.) BALAT & (Y.) GUITTON.- 1974. Détection de séquences polyribo- adényliques dans les ARN de radis. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 278, 1225-1228.
- DELSENY (M.), (L.) ASPART, (A.) GOT, (R.) COOKE & (Y.) GUITTON.- 1977. Early synthesis of polyadenylic acid, polyadenylated and ribosomal nucleic acids in germinating radish embryo axes. *Physiol. vég.*, 15, 415-430.

- DENCHEVA (A.V.), (P.I.) DOUSHKOVA & (D.Y.) KLISURSKA.- 1974. Influence of gibberellic acid and of the maleic hydrazide on the peroxidase in *Scenedesmus obliquus* (Turp.) Kütz. C. R. Acad. bulg. Sci., 27, 703-706.
- DE ROPP (R.S.).- 1947. Studies in the physiology of leaf growth. IV. The growth and behaviour in vitro of dicotyledonous leaves and leaf fragments. Ann. Bot. (N.S.), 11, 439-447.
- DE ROPP (R.S.).- 1956. Kinetin and auxin activity. Plant Physiol., 31, 253-254.
- DEYSSON (M.).-1954. Influence de l'adénine sur la division des cellules végétales. Bull. Soc. bot. Fr., 101, 412-420.
- DEYSSON (G.).- 1959. La kinétine, nouvelle hormone de croissance végétale. Bull. Soc. bot. Fr., 106, 369-386.
- DEYSSON (G.) & (M.) DEYSSON.- 1953. Biochemical mechanism of action of mitotic poisons. I. Does and external application of uracil oppose the mitostatic action exerted by barbital, antipyrine and maleic hydrazide ?. Bull. Soc. Chim. Biol., 35, 1209-1215.
- DEYSSON (G.) & (R.) TRUHAUT.- 1962. Recherches sur les propriétés antimitotiques d'antagonistes des bases pyrimidiques naturelles. I. 5-fluoro-uracile et composés apparentés. Bull. Soc. Chim. Biol., 44, 513-525.
- DIEZ (J.) & (G.) BRAWERMAN.- 1974. Elongation of the polyadenylate segment of messenger RNA in the cytoplasm of mammalian cells. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A., 71, 4091-4095.
- DIGBY (J.) & (F.) SKOOG.- 1966. Cytokinin activation of thiamine biosynthesis in tobacco callus cultures. Plant Physiol., 41, 647-652.

- DIGBY (J.) & (P.F.) WAREING.- 1966. The effect of applied growth hormones on cambial division and differentiation of the cambial derivatives. *Ann. Bot. (N.S.)*, 30, 539-548.
- DMITRIEVA (N.N.) & (R.G.) BUTENKO.- 1970. Protein synthesis during the transition to callus formation in pith parenchyma of tobacco stems. *Soviet Plant Physiol.*, 17, 273-278.
- DOERSCHUG (M.R.).- 1968. Chemical control of adventitious organ formation in *Lactuca sativa*. *Diss. Abstr.*, n° 28, ser. B., 3598.
- DORE (J.).- 1965. Physiology of regeneration in Cormophytes. *Handbuch Pflanzenphysiol.*, 15, 1-91.
- DRAVNIIEKS (D.E.), (F.) SKOOG, & (R.H.) BURRIS.- 1969. Cytokinin activation of de novo thiamine biosynthesis in tobacco callus cultures. *Plant Physiol.*, 44, 866-870.
- DUBOIS (J.), (S.) RAMBOUR & (J.) VASSEUR.- 1976. Croissance d'une suspension cellulaire de Silène (*Silene Alba* (Miller) E.H.L. Krause) et évolution des acides nucléiques. 101e Congrès nat. Soc. savantes Lille, *Sci.*, 1, 441-454.
- DUDA (C.T.) & (J.H.) CHERRY.- 1971. Chromatin-and nuclei-directed ribonucleic acid synthesis in sugar beet root. *Plant Physiol.*, 47, 262-268.
- DUHAMET (L.).- 1951. Action comparée du lait de coco sur une souche de tissus de Carotte et sur des fragments prélevés sur des racines. *C. R. Soc. Biol.*, 145, 1841-1843.
- DUHAMET (L.).- 1952. Action du lait de coco, d'hétéro-auxines et de mélanges de ces substances sur la croissance de quelques tissus végétaux. *C. R. Soc. Biol.*, 146, 845-847.
- DUHAMET (L.).- 1953. Recherches préliminaires sur les variations du pouvoir de prolifération de cultures de tissus végétaux en fonction du poids de l'explantat ensemencé. *C. R. Soc. Biol.*, 147, 81-83.

- DUHAMET (L.).- 1955. Variations des besoins nutritifs des tissus végétaux en fonction de la taille des explantats. *Ann. Biol.*, 31, 123-143.
- EDELMAN (J.) & (M.A.) HALL.- 1965. Enzyme formation in higher plant tissue. Development of invertase and ascorbate oxidase activities in mature storage tissue of *Helianthus tuberosum* L. *Biochem. J.*, 95, 403-410.
- EDMONDS (M.) & (G.) CAMELA.- 1969. The isolation and characterization of adenosine monophosphate-rich polynucleotides synthesized by Ehrlich Ascites cells. *J. Biol. chem.*, 244, 1314-1324.
- ELIASSON (L.).- 1971. Growth regulators in *Populus tremula*. IV. Apical dominance and suckering in young plants. *Physiol. Plant.*, 25, 263-267.
- ELLEM (K.A.O.).- 1966. Some properties of mammalian DNA-like RNA isolated by chromatography on methylated bovine serum albumin-kieselguhr columns. *J. mol. Biol.*, 20, 283-305.
- ELLEM (K.A.O.) & (J.W.) SHERIDAN.- 1964. Tenacious binding of the bulk DNA-like RNA of metazoan cells to methylated albumin columns. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16, 505-510.
- ELLIS (R.J.) & (I.R.) Mc DONALD.- 1967. Activation of protein synthesis by microsomes from aging beet discs. *Plant Physiol.*, 42, 1297-1302.
- ENGELKE (A.L.), (H.Q.) HAMZI & (F.) SKOOG.- 1973. Cytokinin-gibberellin regulation of shoot development and leaf form in tobacco plantlets. *Amer. J. Bot.*, 60, 491-495.
- ENGVILD (K.C.).- 1973. Shoot differentiation in callus cultures of *Datura innoxia*. *Physiol. Plant.*, 28, 155-159.
- ESNAULT (R.).- 1967. Etude du mode d'action de l'auxine sur l'élongation cellulaire en rapport avec le métabolisme des acides nucléiques et des protéines. Thèse de doctorat d'Etat, Paris, 89 p.

- ESNAULT (R.), (G.) TRAPY & (R.B.) VAN HUYSTEE.- 1975. Polyadenylated RNA from *Vicia faba* meristematic root cells. Localisation and size estimation of the poly (A) segment. *Eur. J. Biochem.*, 60, 83-89.
- EWING (E.), & (J.H.) CHERRY.- 1967. Base composition and column chromatography studies of ribonucleic acid differentially extracted from pea roots with sodium lauryl sulfate or p-amino salicylate. *Phytochemistry*, 6, 1319-1328.
- FELLENBERG (G.).- 1967. Möglichkeiten der Regulierung differentieller-DNS Aktivitäten bei höheren Pflanzen durch Histon. *Planta*, 76, 252-268.
- FELLENBERG (G.).- 1969. Veränderungen des Nucleoproteids unter dem Einfluß von Auxin und Ascorbinsäure bei der Wurzelneubildung an Erbsenekotylen. *Planta*, 84, 329-338.
- FIRTEL (R.A.), (A.) JACOBSON & (H.F.) LODISH.- 1972. Isolation and hybridisation kinetics of messenger RNA from *Dictyostelium discoideum*. *Nature New Biol.*, 239, 225-228.
- FLECK (A.) & (H.N.) MUNRO.- 1962. The precision of ultraviolet absorption measurements in the Schmidt-Thannhauser procedure for nucleic acid estimation. *Biochim. Biophys. Acta*, 55, 571-583.
- FOSKET (D.E.) & (L.W.) ROBERTS.- 1965. A histochemical study of callus initiation from carrot taproot phloem cultivated in vitro. *Amer. J. Bot.*, 52, 929-937.
- FOSTER (R.J.), (D.H.) Mc RAE & (J.) BONNER.- 1955. Auxin-antiauxin interaction at high auxin concentrations. *Plant Physiol.*, 30, 323-327.
- FRASER (R.S.S.).-1975. Studies on messenger and ribosomal RNA synthesis in plant tissue cultures induced to undergo synchronous cell division. *Eur. J. Biochem.*, 50, 529-537.

- FRIES (N.).- 1960. The effect of adenine and kinetin on growth and differentiation of *Lupinus*. *Physiol. Plant.*, 8, 859-868.
- FROMSON (D.) & (D.P.S.) VERMA.- 1976. Translation of non-polyadenylated messenger RNA of sea urchin embryos. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 148-151.
- GALSTON (A.W.) & (W.K.) PURVES.- 1960. The mechanism of action of auxin. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 11, 239-276.
- GALSTON (A.W.) & (H.) WARBURG.- 1959. An analysis of auxin-gibberellin interaction in pea stem tissue. *Plant Physiol.*, 34, 16-22.
- GARESTIER (R.), (M.) RIDEAU & (C.) GIRON.- 1970. Modalités de l'action inhibitrice et de la levée d'inhibition du 5-fluoro-uracile, inhibiteur de la croissance de fragments d'*Helianthus tuberosus* cultivés in vitro en présence de phytohormones. *Soc. bot. Fr. Mém.*, 117, 259-268.
- GASPAR (Th.).- 1965. Les auxines-oxydases : chimie et physiologie. *Ann. Biol.*, 4, 437-470.
- GASPAR (Th.), (M.) BASTIN & (C.) LEYH.- 1964. Composés phénoliques, acide  $\beta$ -indole-acétique et activité auxines-oxydasique. *Bull. Acad. roy. Belg.*, 7, 799-815.
- GASPAR (Th.) & (O.) CLEDJO.- 1969. Croissance, rhizogénèse, teneur en anthocyanes et catabolisme auxinique (in vitro et in vivo) chez *Zea mays* traité par l'hydrazide maléique. *Weed Res.*, 9, 348-356.
- GASPAR (Th.) (A.) XHAUFFLAIRE & (M.) BOUILLENNE-WALRAND.- 1965. Acide gibbérellique et activité auxines-oxydasique. *Bull. Soc. roy. Sci. Liège*, 34, 149-175.

- GAUTHERET (R.J.).- 1940. Recherches sur le bourgeonnement du tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultivé in vitro. C. R. Acad. Sci. Paris, 210, 632-634.
- GAUTHERET (R.J.).- 1941. Recherches expérimentales sur la polarité des tissus de la racine d'Endive. C. R. Acad. Sci. Paris, 213, 37-39.
- GAUTHERET (R.J.).- 1942a. Recherches sur le développement des tissus végétaux cultivés "in vitro". Rev. Cytol. & Cytophysiol. vég., 6, 85-180.
- GAUTHERET (R.J.).- 1942b. Le bourgeonnement des tissus végétaux en culture. Science, 40, 95-128.
- GAUTHERET (R.J.).- 1942c. Manuel technique de culture des tissus végétaux. Masson et Cie édit., Paris, 172 p.
- GAUTHERET (R.J.).- 1944. Recherches sur la polarité des tissus végétaux. Rev. Cytol. & Cytophysiol. vég., 7, 45-217.
- GAUTHERET (R.J.).- 1947. Action des acides 2,4-dichlorophénoxyacétique et naphthoxyacétique sur le développement des fragments de tissus de Carotte et d'Endive, cultivés in vitro. C. R. Soc. Biol., 141, 475-477.
- GAUTHERET (R.J.).- 1950. Action du contact du milieu aqueux sur la morphogénèse des cultures de tissu cambial de *Salix caprea*. C. R. Soc. Biol., 144, 626-629.
- GAUTHERET (R.J.).- 1952a. Recherches sur l'action combinée de l'hydrazide maléique et de l'acide indole-acétique sur les cultures de tissus de Topinambour. C. R. Acad. Sci. Paris, 234, 2218-2221.
- GAUTHERET (R.J.).- 1952b. Recherches sur l'action de l'hydrazide maléique sur le développement des cultures de tissus de carotte et d'endive. C. R. Soc. Biol., 146, 859-861.

- GAUTHERET (R.J.).- 1952c. Remarques sur l'emploi du lait de coco pour la réalisation des cultures des tissus végétaux. C. R. Acad. Sci. Paris, 235, 1321-1322.
- GAUTHERET (R.J.).- 1959. La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisations. Masson et Cie édit., Paris, 863 p.
- GAUTHERET (R.J.).- 1960a. Action de quelques substances de division particulièrement de la cinétine, sur les phénomènes d'histogenèse dans les racines isolées de *Lupinus albus*. C. R. Acad. Sci., Paris, 250, 2096-2101.
- GAUTHERET (R.J.).- 1960b. Action de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique ou 2,4-D et de la cinétine sur des plantules de *Nicotiana tabacum* L. C.R. Acad. Sci. Paris, 250, 2307-2312.
- GAUTHERET (R.J.).- 1961. Action conjuguée de l'acide gibbérellique, de la cinétine et de l'acide indole-acétique sur les tissus cultivés in vitro, particulièrement sur ceux de Topinambour. C. R. Acad. Sci., Paris, 253, 1381-1385.
- GAUTHERET (R.J.).- 1963. Sur le déterminisme de la prolifération des cellules végétales cultivées in vitro : remarques sur l'interaction auxine-cinétine. C. R. Acad. Sci. Paris, 256, 2071-2075.
- GAUTHERET (R.J.).- 1964. La culture des tissus végétaux : son histoire, ses tendances. Rev. Cytol. et Biol. vég., 27, 99-220.
- GAUTHERET (R.J.).- 1966. Phytohormones et culture de tissus. Dans: "Les phytohormones et l'organogenèse". Congrès international, Université de Liège, 38, 55-82.
- GAUTHERET (R.J.).- 1969. Investigations on the root formation in the tissues of *Helianthus tuberosus* cultured in vitro. Amer. J. Bot., 56, 702-717.

- GAY (L.).- 1968. Les potentialités de régénération du gamétophyte feuillé de *Polytrichum juniperinum* Wild. C. R. Acad. Sci. Paris, 267, 1507-1510.
- GENDRAUD (M.).- 1975. Quelques aspects du métabolisme des acides ribonucléiques et des nucléotides libres en relation avec l'édification et la dormance des tubercules de Topinambour (*Helianthus tuberosus* L.). Thèse de Doctorat d'Etat, Clermont-Ferrand, 101 p.
- GENDRAUD (M.) & (C.) TEPPAZ-MISSON.- 1969. Mise en évidence d'une distribution différente de la radioactivité dans les ARN à marquage rapide de faible masse moléculaire, extraits de pousses longues et de tubercules de Topinambour. C. R. Acad. Sci. Paris, 169, 2439-2441.
- GIFFORD (E.M.Jr.).- 1956. Some anatomical and cytological responses in barley to maleic hydrazide. Amer. J. Bot., 43, 72-80.
- GINSBURG (C.).- 1966. Action des bases puriques et pyrimidiques et de quelques analogues sur la rhizogenèse et la caulogenèse des tissus végétaux cultivés in vitro. C. R. Acad. Sci. Paris, 263, 868-871.
- GODDEN (B.F.) & (D.P.) WATSON.- 1962. An anatomical study of the origin and development of the bulblets on the scale leaves of Lily bulbs. Mich. Agric. exp. Stn. Quart. Bull., 45, 45-54.
- GORDON (M.E.) & (P.I.) PAYNE.- 1976. In vitro translation of the long-lived messenger ribonucleic acid of dry seeds. Planta, 130, 269-273.
- GORIS (A.) & (R.)BOURIQUET.- 1953. Action de l'hydrazide maléique sur les tissus de Carotte cultivés in vitro. Bull. Soc. Chim. Biol., 35, 1401-1408.
- GORTNER (W.A.), (M.J.) KENT & (G.K.) SUTHERLAND.- 1958. Ferulic acid and p-coumaric acids in pineapple tissue as modifiers of pineapple indole-acetic acid oxidase. Nature 181, 630-631.
- GOUKOVA (M.) & (V.) FAUSTOV.- 1962. Gibberelline et auxine dans la plante (en russe). Izvest. Timirjaz. Selskokh. Akad. S.S.S.R., 2, 47-56.

- GRAY (R.E.) & (A.R.) CASHMORE.- 1976. RNA synthesis in plant leaf tissue : the characterization of messenger RNA species lacking and containing polyadenylic acid. *J. mol. Biol.*, 108, 595-608.
- GRELLET (F.), (R.) JULIEN & (H.) MILHOMME.- 1968. Activité ribonucléasique et teneur en RNA de *Vicia sativa* L. au cours de la germination. *Physiol. vég.*, 6, 11-17.
- GRESSEL (J.) & (E.) GALUN.- 1966. Effect of 5-fluoro-uracil on the soluble RNA of *Trichoderma*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 24, 162-168.
- GREULACH (V.A.) & (E.) ATCHISON.- 1950. Inhibition of growth and cell division in onion roots by maleic hydrazide. *Bull. Torrey bot. Club*, 77, 262-267.
- GREULACH (V.A.) & (J.) HAESLOP.- 1954. Some effects of maleic hydrazide on internode elongation, cell enlargement and stem anatomy. *Amer. J. Bot.*, 41, 44-50.
- GRIERSON (D.).- 1976. RNA structure and metabolism. Dans "Molecular aspects of gene expression in plants". (Bryant J.A. édit.) Academic Press, 53-108.
- GRIERSON (D.) & (S.) COVEY.- 1975. Changes in the amount of ribosomal RNA and poly (A)-containing RNA during leaf development. *Planta*, 127, 77-86.
- GRIERSON (D.) & (S.) COVEY.- 1976. The properties and function of rapidly-labelled nuclear RNA. *Planta*, 130, 317-321.
- GRIERSON (D.) & (U.E.) LOENING.- 1972. Distinct transcription products of ribosomal genes in two different tissues. *Nature New Biol.*, 235, 80-82.
- GRIERSON (D.) & (U.E.) LOENING.- 1974. Ribosomal RNA precursors and the synthesis of chloroplast and cytoplasmic ribosomal RNA in leaves of *Phaseolus aureus*. *Eur. J. Biochem.*, 44, 501-507.

- GRONER (B.), (N.) HYNES & (S.) PHILIPS.- 1974. Length heterogeneity in the poly (adenylic acid) region of yeast messenger ribonucleic acid. *Biochemistry*, 13, 5379-5833.
- GROOT (G.S.P.), (R.A.) FLAVELL, (G.J.B.) VAN OMMEN & (L.A.) GRIVELL.- 1974. Yeast mitochondrial RNA does not contain poly (A). *Nature*, 252, 167-168.
- GUERN (M.).- 1967. Les cytokinines. Dans: "Les substances de croissance" Journées Etudes et Inf., Paris, 13-20.
- GUERN (J.).- 1972. Problèmes posés par la description, en termes de biologie moléculaire, de l'intervention des hormones végétales dans les processus de morphogenèse. *Soc. bot. Fr., Mém. (Coll. Morphologie)*, 147-160.
- GUILLE (E.), (F.) QUETIER & (T.) HUGUET.- 1968. Etude des acides desoxyribonucléiques des végétaux. Formation d'un ADN nucléaire riche en G + C lors des blessures de certaines plantes supérieures. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 266, 836-838. BUS  
LILLÉ
- GUILLOT (A.).- 1966a. Relations entre rhizogenèse et variations de la teneur des tissus en acides nucléiques dans les boutures de jeunes plantes étiolées de Tomate (*Lycopersicum esculentum* Miller). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 263, 358-361.
- GUILLOT (A.).- 1966b. Action de la 6-azauracile sur la rhizogenèse dans les boutures de jeunes plantes étiolées de tomate (*Lycopersicum esculentum* Miller). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 262, 1242-1245.
- GUILLOT (A.).- 1967. Recherches physiologiques sur la rhizogenèse chez la jeune plante étiolée de Tomate (*Lycopersicum esculentum* Miller). Thèse de doctorat d'Etat, Paris, 215 p.
- GUINN (G.).- 1966. Extraction of nucleic acids from lyophilised plant material. *Plant Physiol.*, 41, 689-695.

- GWOZDZ (E.).- 1973. Effect of IAA on growth, organogenesis and RNA metabolism during the development of *Cichorium intybus* root explants cultured "in vitro". Acta Soc. bot. Pol., 17, 493-506.
- GWOZDZ (E.) & (A.) SZWEYKOWSKA.- 1967. The effect of kinetin and IAA on the organogenesis in root explants of *Cichorium intybus*. Bull. Soc. Amis Sci. Lettr., Poznan, 8, 3-9.
- GWOZDZ (E.) & (A.) SZWEYKOWSKA.- 1969. The effect of some nutritional factors on the organogenesis in root explants of *Cichorium intybus*. Bull. Soc. Amis Sci. Lettr., Poznan, 9, 11-18.
- GWOZDZ (E.) (A.) WOZNY & (A.) SZWEYKOWSKA.- 1974. Induction by auxin of polyribosomes and granular endoplasmic reticulum in the callus tissue of *Cichorium intybus*. Biochem. Physiol. Pflanz., 165, 82-92.
- HABER (H.H.) & (J.D.) WHITE.- 1960. Action of maleic hydrazide on dormancy, cell division and cell expansion. Plant Physiol., 35, 495-499.
- HABERLANDT (G.).- 1902. Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien., Math. Nat. Classe, 111, 69-92.
- HACKETT (W.P.).- 1969. Control of bulblet formation on bulb scales of *Lilium longiflorum*. Hort. Science, 4, 171.
- HADZIYEV (D.), (S.L.) MEHTA & (S.) ZALIK.- 1968. Studies on the ribonucleic acid from wheat leaves and chloroplasts. Plant Physiol., 43, 229-237.
- HAGEMANN (A.).- 1931. Untersuchungen an Blattstecklingen. Gartenbauwiss. 6, 69-195.
- HALL (R.H.).- 1973. Cytokinins as a probe of developmental processes. Ann. Rev. Plant Physiol., 24, 415-444.
- HALL (R.H.), (L.) CSONKA, (H.) DAVID & (B.) McLENNAN.- Cytokinins in the soluble RNA of plant tissues. Science, 156, 69-71.

- HALL (R.H.) & (B.I.S.) SRIVASTAVA.- 1968. Cytokinin activity of compounds obtained from soluble RNA. *Life Science*, 7, 7-13.
- HAVILLAND (R.T.) & (L.L.) BIEBER.- 1970. Scintillation counting of  $^{32}\text{P}$  without added scintillator in aqueous solutions and organic solvents and on dry chromatographic media. *Analyt. Biochem.*, 33, 323-334.
- HAYASHI (M.), (M.N.) HAYASHI & (S.) SPIEGELMAN.- 1963. Restriction of in vivo genetic transcription to one of the complementary strands of DNA. *Proc. nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 50, 664-672.
- HAYASHI (T.) & (Y.) MURAKAMI.- 1953. The physiological action of gibberellin. V. The effect of gibberellin in the straight growth of etiolated pea epicotyl sections. *J. Agric. Chem. Soc. Japan*, 27, 675-680.
- HEIDE (O.M.).- 1964. Effects of light and temperature on the regeneration ability of Begonia leaf cuttings. *Physiol. Plant.*, 17, 789-804.
- HEIDE (O.M.).- 1965. Interaction of temperature, auxins and kinins in the regeneration ability of Begonia leaf cuttings. *Physiol. Plant.*, 18, 891-920.
- HEIDE (O.M.).- 1967. The auxin level of Begonia leaves in relation to their regeneration ability. *Physiol. Plant.*, 20, 886-902.
- HEIDE (O.M.).- 1969. Non-reversibility of gibberellin-induced inhibition of regeneration in Begonia leaves. *Physiol. Plant.*, 22, 671-679.
- HEIDELBERG (C.).- 1965. Fluorinated pyrimidines. Dans "Progress in nucleic acid research and molecular biology". (Davidson B.N. et Cohn W.E. édit.), Academic Press, IV, 1-50.
- HEIZMANN (P.).- 1976. Contrôle des synthèses d'ARN au cours de la morphogénèse du chloroplaste chez *Euglena gracilis*. *Ann. Biol.*, 15, 197-226.
- HELLER (R.).- 1949. Sur l'emploi de papier filtre sans cendres comme support pour les cultures de tissus végétaux. *C. R. Soc. Biol.*, 143, 335-337.

- HELLER (R.).- 1953. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. Thèse, Paris, 223 p. et Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. vég., 14, 1-223.
- HELLER (R.).- 1968. Manuel de statistique biologique. Gauthier-Villars édit., Paris, 296 p.
- HEYES (J.K.).- 1960. Nucleic acid changes during cell expansion in the root. Proc. roy. Soc. Belg., 152, 218-230.
- HEYES (J.K.).- 1963a. The role of nucleic acids in cell growth and differentiation. Symp. Soc. exp. Biol., 17, 40-57.
- HEYES (J.K.).- 1963b. Effects of 8-azaguanine on growth and metabolism in the root. Proc. royal Soc. London, 158, 208-221.
- HIGGINS (T.J.V.), (J.F.B.) MERCER & (P.B.) GOODWIN.- 1973. Poly (A) sequences in plant polysomal RNA. Nature New Biol., 246, 68-70.
- HILLMAN (W.S.) & (W.K.) PURVES.- 1961. Does Gibberellin act through an auxin-mediated mechanism ? Dans "Plant Growth Regulation", Iowa State Univ. Press, Ames, 589-600.
- HO (D.T.H.) & (J.E.) VARNER.- 1974. Hormonal control of messenger ribonucleic acid metabolism in barley aleurone layers. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A., 71, 4783-4786.
- HOFFMAN (I.) & (E.V.) PARUPS.- 1964. Mode of action of maleic hydrazide in relation to residues in crops and soils. Residue Reviews, 7, 96-113.
- HOLDGATE (D.P.) & (T.W.) GOODWIN.- 1965. Quantitative extraction and estimation of plant nucleic acids. Phytochemistry, 4, 831-843.
- HOLM (R.E.) & (J.L.) KEY.- 1969. Hormonal regulation of cell elongation in the hypocotyl of rootless soybean : an evaluation of the role of DNA synthesis. Plant Physiol., 44, 1295-1302.

- HOWLAND (G.P.) & (M.L.) YETTE.- 1975. Simultaneous inhibition of thymidine degradation and stimulation of incorporation into DNA by 5-fluoro-deoxyuridine. *Plant Sci. Letters*, 5, 157-162.
- HUMPHRIES (E.C.).- 1960. Inhibition of root development on petioles and hypocotyls of dwarf bean (*Phaseolus vulgaris*) by kinetin. *Physiol. Plant.*, 13, 659-669.
- HUNAUULT (G.).- 1974. Influence de l'éclaircissement et de la teneur du milieu de culture en cytokinines sur la formation, la croissance et l'organogenèse du cal de tige d'Asperge (*Asparagus officinalis* L.). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 278, 1849-1852.
- HUNT (T.).- 1975. Poly (A) tails. *Nature*, 253, 308.
- HUTCHINSON (W.C.) & (H.N.) MUNRO.- 1961. The determination of nucleic acids in biological materials. *Analyst*, 86, 768-813.
- IBRAHIM (R.K.), (L.) RITTER & (E.) CAVIA.- 1975. RNA profiles and nucleotide composition of Flax callus and suspension cultures. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 167, 451-457.
- INGLE (J.).- 1963. The extraction and estimation of nucleotides and nucleic acids from plant material. *Phytochemistry*, 2, 353-370.
- INGLE (J.) & (J.L.) KEY.- 1965. A comparative evaluation of the synthesis of DNA-like RNA in excised and intact plant tissues. *Plant Physiol.*, 40, 1212-1219.
- INGLE (J.), (J.L.) KEY & (R.E.) HOLM.- 1965. Demonstration and characterization of a DNA-like RNA in excised plant tissue. *J. mol. Biol.*, 11, 730-746.
- IQBAL (J.).- 1977. The polyadenylic sequences in the ribonucleic acid of the fern *Anemia phyllitidis*. *Planta*, 134, 1-3.
- JABLONSKI (J.R.) & (F.) SKOOG.- 1954. Cell enlargement and cell division in excised tobacco pith tissue. *Physiol. Plant.*, 7, 16-24.

- JACKSON (M.) & (J.) INGLE.- 1973. The nature of polydisperse ribonucleic acid in plants. *Biochem. J.*, 131, 523-533.
- JACOBSEN (J.V.).- 1977. Regulation of Ribonucleic acid metabolism by plant hormones. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 28, 537-564.
- JACOBSEN (J.V.) & (J.A.) ZWAR.- 1974. Gibberellic acid causes increased synthesis of RNA which contains poly (A) in Barley aleurone tissue. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 71, 3290-3293.
- JACQUIOT (C.).- 1951. Action du méso-inositol et de l'adénine sur la formation de bourgeons par le tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultivé in vitro. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 233, 815-817.
- JALOUZOT (R.).- 1971. Etude du métabolisme des acides nucléiques et des protéines au cours de l'initiation de racines adventives. *Planta*, 97, 16-27.
- JALOUZOT (R.) & (M.) GONTCHAROFF.- 1973. Synthèses précoces d'ARN et de protéines au cours de l'initiation de racines adventives. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 277, 313-316.
- JELINEK (W.), (M.) ADESNIK, (M.) SADITT, (D.) SHEINESS, (R.) WALL, (G.) MOLLOY, (L.) PHILIPSON & (J.E.) DARNELL.- 1973. Further evidence on the nuclear origin and transfer to the cytoplasm of polyadenylic acid sequences in mammalian cell RNA. *J. mol. Biol.*, 75, 515-532.
- JOHRI (M.M.) & (J.E.) VARNER.- 1970. Characterization of rapidly labeled ribonucleic acid from dwarf Peas. *Plant Physiol.*, 45, 348-358.
- JONES (R.L.).- 1973. Gibberellins : their physiological role. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 24, 571-598.
- JONES (M.B.).- 1975. The effect of leaf age on leaf resistance and CO<sub>2</sub> exchange of the CAM plant *Bryophyllum fedtschenkoi*. *Planta*, 123, 91-96.

- JOUANNEAU (J.P.).- 1971. Contrôle par les cytokinines de la synchronisation des mitoses dans les cellules de tabac. *Exp. Cell Res.*, 67, 329-337.
- JOUANNEAU (J.P.) & (N.) TANDEAU DE MARSAC.- 1973. Stepwise effect of cytokinin activity and DNA synthesis upon mitotic cycle events in partially synchronized tobacco cells. *Exp. Cell Res.*, 77, 167-174
- JULIEN (R.), (F.) GRELLET & (Y.) GUITTON.- 1970. Synthèse des RNA au cours de la germination du radis. *Physiol. Plant.*, 23, 323-334.
- JULIEN (R.) & (Y.) GUITTON.- 1972. Rapidly labelled DNA-RNA complex in radish seedlings. Dans "Nucleic acids and proteins in higher plants" (Farkas G.L. édit.), *Symp. Biol. Hung.*, 13, 33-41.
- JULLIARD (B.) .- 1964. Interaction de l'auxine et de la gibberelline sur la rhizogenèse des boutures de vigne (*Vitis vinifera* L.). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 258, 5716-5719.
- KAMISAKA (S.) & (Y.) MASUDA.- 1968. Auxin-induced growth of tuber tissue of Jerusalem artichoke. IV. Significance of gibberellin biosynthesis and basic proteins in chromatin in aging process. *Plant Cell Physiol.*, 9, 61-67.
- KAMISAKA (S.) & (Y.) MASUDA.- 1970. Auxin-induced growth of *Helianthus* tuber-tissue. V. Role of DNA synthesis in hormonal control of cell growth. *Physiol. Plant.*, 23, 343-350.
- KARTHA (K.K.), (O.L.) GAMBORG, (J.P.) SHYLUX & (F.) CONSTABEL.- 1975. Morphogenic investigations on in vitro leaf culture of Tomato. (*Lycopersicum esculentum* Mill. cv. Starfire) and high frequency plant regeneration. *Z. Pflanzenphysiol.*, 77, 292-301.
- KATO (J.).- 1953. Studies on the physiological effect of gibberellin. I. On the differential activity between gibberellin and auxin. *Mém. Coll. Sci. Univ. Kyoto*, 20, 189-193.

- KATO (J.).- 1958. Studies on the physiological effect of gibberellin. II. On the interaction of gibberellin with auxins and growth inhibitors. *Physiol. Plant.*, 11, 10-15.
- KATO (Y.).- 1972. Bud formation in leaves, leaf fragments and midrib pieces of *Heloniopsis orientalis* (Liliaceae). *Planta*, 107, 111-120.
- KATO (Y.).- 1974. Bud formation on excised *Heloniopsis* leaf fragments : effects of leaf age and the midrib. *Plant Cell Physiol.*, 15, 363-372.
- KATO (Y.) & (M.) HONGO.- 1974. Regulation of bud and root formation in excised leaf segments of *Heloniopsis orientalis* (Liliaceae). *Phytomorphology*, 24, 273-279.
- KATO (J.) & (M.) KATSUMI.- 1958. Effect of gibberellins on indolacetic oxidase. *Naturwiss.*, 45, 344-347.
- KATSUMI (M.).- 1963. Physiological effects of kinetin. Effect of kinetin on the elongation, water uptake and oxygen uptake of etiolated pea stem sections. *Physiol. Plant.*, 16, 66-72.
- KATZ (S.) & (D.G.) COMB.- 1963. A new method for the determination of the base composition of ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 238, 3065-3067.
- KEFFORD (N.P.) & (O.H.) CASO.- 1972. Organ regeneration on excised roots of *Chondrilla juncea* and its chemical regulation. *Aust. J. Biol. Sci.*, 25, 691-706.
- KEMP (J.D.) & (D.W.) SUTTON.- 1972. Protein metabolism in cultured plant tissues. III. Changes in the rate of protein synthesis, accumulation and degradation in cultured pith tissue. *Plant Physiol.*, 49, 596-601.
- KESSEL (R.H.J.) & (A.H.) CARR.- 1972. The effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of Carrot (*Daucus Carota*) tissue. *J. exp. Bot.*, 23, 996-1007.

- KEY (J.L.).- 1966. Effect of purine and pyrimidine analogues on growth and RNA metabolism in the Soybean hypocotyl. The selective action of 5-fluorouracil. *Plant Physiol.*, 41, 1257-1264.
- KEY (J.L.).- 1969. Hormones and nucleic acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 20, 449-474.
- KEY (J.L.).- 1972. Studies on short-time labelled RNAs of Soybean and Carrot. Dans : "Nucleic acids and proteins in higher plants" (Farkas G. L. édit.), *Symp. Biol. Hung.*, 13, 15-28.
- KEY (J.L.) & (J.) INGLE.- 1964. Requirement for the synthesis of DNA-like RNA for growth of excised plant tissue. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 52, 1382-1388.
- KEY (J.L.) & (J.) INGLE.- 1968. RNA metabolism in response to auxin. Dans : "Biochemistry and physiology of plant growth substances" *Proc. of the 6<sup>th</sup> intern. Conf. on Plant Growth Substances*, Ottawa, (Wightman F. & Setterfield G. édit.) The Runge Press Ltd. 711-722.
- KEY (J.L.), (C.J.) LEAVER, (J.R.) COWLES & (J.M.) ANDERSON.- 1972. Characterization of short time labeled adenosine monophosphate-rich ribonucleic acids of Soybean. *Plant Physiol.*, 49, 783-788.
- KEY (J.L.) & (J.C.) SHANNON.- 1964. Enhancement by auxin of ribonucleic acid synthesis in excised Soybean hypocotyl tissue. *Plant Physiol.*, 39, 360-364.
- KEY (J.L.) & (C.) SILFLOW.- 1975. The occurrence and distribution of poly (A) ribonucleic acid in Soybean. *Plant Physiol.*, 56, 364-369.
- KEY (J.L.) & (L.N.) VANDERHOEF.- 1973. Plant hormones and developmental regulation : role of transcription and translation. Dans : "Developmental regulation. Aspects of cell differentiation". (Coward S.J. édit.) Academic Press, 49-83.

- KHAN (A.A.), ANDERSEN (L.) & (Th.) GASPAR.- 1970. Absciscic acid-induced changes in nucleotide composition of rapidly labeled ribonucleic acid species of Lentil root. *Plant. Physiol.*, 46, 494-495.
- KHAN (A.A.) & (C.C.) ANOJULU.- 1970. Absciscic acid induced changes in nucleotide composition of rapidly labelled RNA species of Pear embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 38, 1069-1075.
- KIM (W.K.) & (V.A.) GREULACH.- 1963. A comparative study of some influences of maleic hydrazide and 5-fluorouracil on the metabolism of *Chlorella pyrenoidosa*. *Phyton.*, 20, 127-136.
- KIRBY (K.S.).- 1965. Isolation and characterisation of ribosomal ribonucleic acid. *Biochem. J.*, 96, 266-269.
- KNOP (W.).- 1884. Bereitung einer concentrirten Nährstofflösung für Pflanzen. *Landw. Versuchsstat.*, 30, 292-294.
- KOBLITZ (H.).- 1958. Über die unterschiedlichen Wirkungen der stimulierenden Stoffe aus der Cocosmilch und dem festen Endosperm der Cocosnuss auf Gewebekulturen. *Naturwiss.*, 45, 447-448.
- KOCH (G.) & (H.) KUBINSKI.- 1964. Zur Darstellung und Fraktionierung von hochmolekularen Ribonucleinsäure. *Z. Naturforsch.*, 19, 683-687.
- KOVACS (E.I.).- 1971a. De novo nucleic acid and protein synthesis and the regulation problems in tumor forming tobacco hybrids. *Bot. Közlem.*, 58, 187-195.
- KOVACS (E.I.).- 1971b. DNA, RNA, total protein and histone investigations in tobacco plants of genetically tumorous and normal conditions. *Acta Bot. Acad. Sci. Hung.*, 17, 91-97.
- KOVACS (E.I.).- 1971c. Role of histone and RNA in the organogenesis of tissue cultures of genetic tumorous condition. *Acta Bot. Acad. Sci. Hung.*, 17, 391-393.

- KOVACS (E.).- 1972. Histone-nucleic acid regulation system in the tumor forming hybrids of *Nicotiana*. Bot. Közlem., 59, 65-67.
- KOVOOR (A.).- 1962. Essai d'isolement d'un régulateur de croissance présent dans le lait de coco. C. R. Acad. Sci. Paris, 255, 1991-1993.
- KOVOOR (A.).- 1964. Action du lait de Coco sur la prolifération des tissus de Topinambour cultivés in vitro. Dans : "Régulateurs naturels de la croissance végétale". Colloques internationaux du C.N.R.S. n° 123, Gif sur Yvette , 83-96.
- KOVOOR (A.).- 1968. Cytokinines et acides ribonucléiques dans la croissance des tissus végétaux cultivés in vitro. Dans : "Les cultures de tissus de plantes". Colloques nationaux du C.N.R.S., n° 920, Strasbourg, 171-175.
- KOVOOR (A.) & (C.) RUCH.- 1964. Essai d'isolement d'un facteur de croissance à partir de l'acide ribonucleique de levure. C. R. Acad. Sci. Paris, 259, 3352-3355.
- KULAEVA (O.N.).- 1967. Peculiarities of age variations of RNA metabolism in detached and intact plant leaves. Soviet Plant Physiol., 14, 816-824.
- KULAEVA (O.), (A.) FEDINA & (N.) KLYACHKO.- 1968. Specific features of protein synthesis in plant leaves. Agrochimica Ital., 13, 1-10.
- KULESCHA (Z.).- 1951. Recherches sur l'élaboration de substances de croissance par les tissus végétaux. Thèse de Doctorat d'Etat, Paris, 114 p. et Rev. gén. Bot., 1952, 59, 92-111, 127-157, 195-208 & 241-264.
- KULESCHA (Z.) & (G.) CAMUS.- 1948. Relation entre l'inhibition de la croissance des bourgeons et la teneur en substances de croissance de fragments de racines d'Endive. C. R. Soc. Biol., 142, 320-322.
- KURAIISHI (S.) & (R.M.) MUIR.- 1964. The relationship of gibberellin and auxin in plant growth. Plant Cell Physiol., 5, 61-69.

- KUROSAWA (E.).- 1926. Experimental studies on the secretion of *Fusarium heterosporum* on rice plants. Trans. Nat. Hist. Soc. Formosa, 16, 213-227.
- LABORIE (M.E.).- 1963. Contribution à l'étude des actions de la gibbérelline et du chlorure de chlorocholine sur le métabolisme des pigments foliaires. I. Mise au point : intervention de la gibbérelline dans le métabolisme. Ann. Physiol. vég., 5, 51-63.
- LACHARME (J.).- 1972. Les acides nucléiques avant et pendant les premières divisions cellulaires chez les tissus végétaux cultivés in vitro. Soc. bot. Fr., Mémoires (Coll. Morphologie), 201-210.
- LACHARME (J.) & (R.) STEIMAN.- 1970a. Métabolisme des acides nucléiques dans les noyaux de tissus de *Daucus carota* L. au cours des premières heures de leur mise en culture in vitro. C. R. Acad. Sci. Paris, 271, 1178-1181.
- LACHARME (J.) & (R.) STEIMAN.- 1970b. Evolution des acides ribonucléiques nucléaires avant les divisions cellulaires dans une culture synchrone de tissus de *Daucus Carota* L. Bull. Travaux Soc. Pharm. Lyon, 14, 35-50.
- LANDE (M.A.), (M.) ADESNIK, (M.) SUMIDE, (Y.) TASHIRO & (D.) SABATINI.- 1975. Direct association of messenger RNA with microsomal membranes in human diploid fibroblasts. J. Cell Biol., 65, 513-528.
- LANG (A.).- 1970. Gibberellins : structure and metabolism. Ann. Rev. Plant Physiol., 21, 537-570.
- LAU (O.L.) & (S.F.) YANG.- 1973. Mechanism of a synergistic effect of kinetin on auxin-induced ethylene production. Suppression of auxin conjugation. Plant Physiol., 51, 1011-1014.
- LAUCHLI (A.).- 1969. Radioassay for  $\beta$ -emitters in biological materials using Cerenkov radiation. Intern. J. appl. Radiat. Isotopes, 20, 265-270.
- LAVEE (S.).- 1968. RNA and DNA determination in tobacco pith tissue. Analyt. Biochem., 26, 369-380.

- LAVEE (S.) & (A.) GALSTON.- 1968. Structural, physiological and biochemical gradients in Tobacco pith tissue. *Plant Physiol.*, 43, 1760-1768.
- LEE (S.Y.), (J.) MENDECKI & (G.) BRAWERMAN.- 1971. A polynucleotide segment rich in adenylic acid in the rapidly-labeled polyribosomal RNA component of Mouse Sarcoma 180 Ascites cells. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 68, 1331-1335.
- LEE (T.T.) & (F.) SKOOG.- 1965. Effects of substituted phenols on bud formation and growth of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 18, 386-402.
- LEFEBVRE (R.).- 1976. Influence de l'anaérobiose sur le bourgeonnement des tissus de racine d'endive (*Cichorium intybus* L.). Thèse de Doctorat d'Etat, Lille, 185 p. et *Rev. Cytol. Biol. vég.*, 40, 185-291.
- LEGRAND (B.).- 1972. Influence des conditions initiales d'éclairement sur le bourgeonnement et la polarité de tissus de feuilles d'endive cultivés in vitro. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 275, 31-32.
- LEGRAND (B.).- 1974. Influence des conditions d'éclairement sur la néoformation des bourgeons par les tissus de feuilles d'endive cultivés in vitro et sur l'activité peroxydasique de ces tissus. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 278, 2425-2428.
- LEGRAND (B.).- 1975. Action du fer et de l'EDTA sur la néoformation des bourgeons par les fragments de feuilles d'endive cultivés in vitro. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 280, 2215-2218.
- LEGRAND (B.) & (J.) VASSEUR.- 1972. Evolution de l'acide ribonucleique, des proteines et de l'activité peroxydasique au cours de la culture "in vitro" de fragments de feuilles d'endive (*Cichorium intybus* L., var. Witloof). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 275, 357-360.
- LEGUAY (J.J.), (M.) DOREE & (C.) TERRINE.- 1970. Absorption de kinétine par des suspensions cellulaires d'*Acer pseudoplatanus*. Inhibition de l'absorption d'adénine par la kinétine. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 270, 3059-3062.
- LEOPOLD (A.C.) & (W.H.) KLEIN.- 1952. Maleic hydrazide as an anti-auxin. *Physiol. Plant.*, 5, 91-99.

- LEROUX (R.).- 1968. Action de l'acide gibbérellique sur la rhizogenèse de fragments de tiges de Pois (*Pisum sativum* L.) cultivés in vitro en présence d'auxine à l'obscurité et à la lumière. C. R. Acad. Sci. Paris, 266, 106-108.
- LEROUX (R.).- 1973. Contribution à l'étude de la rhizogenèse de fragments de tiges de Pois (*Pisum sativum* L.) cultivés in vitro. Thèse Doctorat d'Etat, Paris, 132 p. et Rev. cytol. & Biol. vég., 36, 1-132.
- LETHAM (D.S.) & (K.) RALPH.- 1967. A cytokinin in soluble RNA from a higher plant. Life Science, 6, 387-394.
- LEVAN (A.).- 1939. The effect of Colchicine on meiosis in *Allium*. Hereditas, 25, 9-26.
- LEVIN (D.H.).- 1966. Evidence for an active messenger ribonucleic acid containing 8-azaguanine. Biochemistry, 5, 1618-1624.
- LEVY (C.C.), (M.) SCHMUKLER, (J.J.) FRANK, (T.P.) KARPETSKY, (P.B.) JEWETT, (P.A.) HIETER, (S.M.) LE GENDRE & (R.G.) DORR.- 1975. Possible role for poly (A) as an inhibitor of endonuclease in eukaryotic cells. Nature, 256, 340-341.
- LEWIN (B.).- 1974. Messenger RNA doing without poly (A). Nature, 252, 268-269.
- LEY (C.), (Th.) GASPAR, & (M.) BOUILLENNE-WALRAND.- 1963. Nanisme, acide gibberellique et effecteurs auxines-oxydasiques chez *Zea mays* L. Bull. Soc. roy. Sci., Liège, 32, supp., 430-448.
- LIEBERT (J.) & (M.) TRAN THANH VAN.- 1972. Progrès de la multiplication clonale intense chez les plantes cultivées : cas de l'endive. Etudes de la capacité néoformatrice des couches minces de cellules de type épidermique de *Cichorium intybus* L. C. R. Acad. Agric. Fr., 58, 472-479.
- LINDBERG (U.) & (T.) PERSSON.- 1972. Isolation of mRNA from KB cells by affinity chromatography on polyuridylic acid covalently linked to sepharose. Eur. J. Biochem., 31, 246-254.

- LINSMAIER (E.M.) & (F.) SKOOG.- 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 18, 100-127.
- LINSMAIER (E.M.) & (F.) SKOOG.- 1966. Thiamine requirement in relation to cytokinin in "normal" and "mutant" strains of tobacco callus. *Planta*, 72, 146-154.
- LIORET (C.).- 1960. Recherches sur le métabolisme de deux tissus végétaux cultivés "in vitro". Thèse de Doctorat d'Etat, Paris, 127 p.
- LIPETZ (J.).- 1967. Wound healing in Kalanchoë. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 144, 320-325.
- LOBOV (V.P.).- 1971. Action de l'hydrazide maleique sur la biosynthèse des protéines, de l'ARN et de l'ADN dans les racines de plantules de pois (en russe). *Fiziol. Rast.*, SSSR, 18, 116-120.
- LODISH (H.F.), (R.A.) FIRTEL & (A.) JACOBSON.- 1973. Transcription and structure of the genome of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 38, 899-914.
- LODISH (H.F.), (A.) JACOBSON, (R.) FIRTEL, (T.) ALTON & (J.) TUCHMAN.- 1974. Synthesis of messenger RNA and chromosome in the cellular slime mold. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 71, 5103-5108.
- LOENING (U.).- 1968. RNA structure and metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 19, 37-70.
- LOVELESS (A.).- 1953. Chemical and biochemical problems arising from the study of chromosome breakage by alkylating agents and heterocyclic compounds. *Heredity*, 6, supp., 293-298.
- LOWRY (O.H.), (N.J.) ROSEBROUGH, (A.L.) FARR & (R.J.) RANDALL.- 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- LUTZ (A.) & (C.) BELIN.- 1974a. Etude du comportement organogène d'une souche anergiée de Tabac en fonction de concentrations variées en acide indolyl-acétique et en kinétine. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 279, 1425-1427.

- LUTZ (A.) & (C.) BELIN.- 1974b. Analyse des aptitudes organogénétiques de clones d'origine unicellulaire issus d'une souche anergiée de Tabac, en fonction de concentrations variées en acide indolylacétique et en kinétine. C. R. Acad. Sci. Paris, 279, 1531-1533.
- MAC DONALD (I.R.) & (P.C.) DEKOCK.- 1958. Temperature control and metabolic drifts in aging disks of storage tissue. Ann. Bot., 22, 429-448.
- MAC HALE (J.S.) & (L.D.) DOVE.- 1969. Age-governed responses of detached Tomato leaves to phytochemicals. New Phytol., 68, 79-91.
- MACHE (R.).- 1976. Les acides ribonucléiques des ribosomes chloroplastiques. Physiol. vég., 14, 49-66.
- MACHEIX (J.J.).- 1974. Les esters hydroxycinnamiques de la pomme : identification, variations au cours de la croissance du fruit et métabolisme. Thèse de doctorat d'Etat, Paris, 168 p.
- MAC LAUGHLIN (C.S.), (J.R.) WARNER, (M.) EDMONDS, (H.) NAKAZATO & (M.H.) VAUGHAN. 1973. Polyadenylic acid sequences in Yeast messenger ribonucleic acid. J. Biol. Chem., 248, 1466-1471.
- MAC LEISH (J.).- 1953. The action of maleic hydrazide in Vicia. Heredity, 6, supp., 125-147.
- MAC MANUS (M.A.).- 1960. Certain mitotic effects of kinetin, gibberellic acid, indole acetic acid and maleic hydrazide on the root of Allium cepa. Nature, 185, 44-45.
- MANAHAN (C.O.) & (A.A.) APP.- 1973. The presence of polyadenylate sequences in the ribonucleic acid of higher plant. Biochem. Biophys. Res. Commun., 53, 588-595.
- MANDEL (H.G.), (P.E.) CARLO & (P.K.) SMITH.- 1954. The incorporation of 8-azaguanine into nucleic acids of tumor-bearing mice. J. Biol. Chem., 206, 181-189.
- MANDELL (J.D.) & (A.D.) HERSHEY.- 1960. A fractionating column for analysis of nucleic acids. Analyt. Biochem., 1, 66-77.

- MARCELLE (R.).- 1963. Effet de la gibbérelline sur la formation et la croissance des bourgeons épiphyllés chez *Bryophyllum tubiflorum* Harv. *Physiol. vég.*, 1, 359-368.
- MARCELLE (R.).- 1970. Effets de la gibbérelline et des freinants, phosphon D et CCC, sur le bourgeonnement épiphyllé chez *Bryophyllum tubiflorum* Harv. *Physiol. vég.*, 8, 125-133.
- MARGARA (J.).- 1969a. Etude préliminaire des facteurs de la néoformation de bourgeons chez le chou-fleur (*Brassica oleracea* L., var. *botrytis*). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 268, 686-688.
- MARGARA (J.).- 1969b. Etude des facteurs de la néoformation de bourgeons en culture in vitro chez le chou-fleur (*Brassica oleracea* L., var. *Botrytis*). *Ann. Physiol. vég.*, 11, 95-112.
- MARGARA (J.).- 1977. Effet d'auxines et d'antiauxines sur la néoformation de bourgeons in vitro chez le chou-fleur (*Brassica oleracea* L., var. *Botrytis*). *C. R. Acad. Sci. Paris*, 284, 1883-1885.
- MARGARA (J.) & (A.) BOUNIOLS. 1967. Comparaison in vitro de l'influence du milieu liquide ou gélosé sur l'initiation florale, chez *Cichorium intybus* L. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 264, 1166-1168.
- MARGARA (J.), (M.) RANCILLAC & (A.) BOUNIOLS.- 1968. La néoformation in vitro de bourgeons inflorescentiels chez *Cichorium intybus* L. Etude méthodologique. Dans : "Les cultures de tissus de plantes". Colloques nationaux du C.N.R.S., n° 920, Strasbourg, 71-82.
- MARKO (A.M.) & (G.C.) BUTLER.- 1951. The isolation of sodium desoxyribonucleate with sodium dodecyl sulfate. *J. Biol. Chem.*, 190, 165-176.
- MAROTI (M.).- 1970. Growth inhibition of tissue cultures. *Acta Bot. Acad. Sci. Hung.*, 16, 153-163.
- MASUDA (Y.).- 1966. Auxin-induced growth of tuber tissue of jerusalem artichoke. II. The relation to protein and nucleic acid metabolism. *Plant Cell Physiol.*, 71, 75-91.

- MASUDA (Y.) & (S.) KAMISAKA.- 1969. Rapid stimulation of RNA biosynthesis by auxin. *Plant Cell Physiol.*, 10, 79-86.
- MAYER (L.).- 1956. Wachstum und Organbildung an in vitro kultivierten Segmenten von *Pelargonium zonale* und *Cyclamen persicum*. *Planta*, 47, 401-446.
- MENDECKI (J.), (S.Y.) LEE & (G.) BRAWERMAN.- 1972. Characteristics of the polyadenylic segment associated with messenger ribonucleic acid in mouse sarcoma 180 ascites cells. *Biochemistry*, 11, 792-798.
- MENHENETT (R.).- 1970. Effects of adenine on the formation of roots and buds in leaf squares. *New Phytol.*, 69, 537-547.
- MIASSOD (R.).- 1974. Biosynthèse des ARNs ribosomiques dans les cellules d'érable en culture stérile. Thèse de doctorat d'Etat, Aix-Marseille, 161 p.
- MIASSOD (R.), (P.) PENON, (M.) TEISSERE, (J.P.) CECCHINI & (J.) RICARD.- 1969. Stimulation, sous l'influence de l'acide  $\beta$ -indolylacétique de la synthèse d'acides ribonucleiques à marquage rapide dans les racines de Lentille. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 268, 2741-2744.
- MIASSOD (R.), (P.) PENON, (M.) TEISSERE, (J.) RICARD & (J.P.) CECCHINI.- 1970. Contribution à l'étude d'acides ribonucléiques à marquage rapide de la racine de lentille. Isolement et caractérisation, action d'une hormone sur leur synthèse et sur celle des peroxydases. *Biochim. Biophys. Acta*, 224, 423-440.
- MILCAREK (C.), (R.) PRICE & (S.) PENMAN.- 1974. The metabolism of a poly (A) minus mRNA fraction in Hela cells. *Cell*, 3, 1-10.
- MILLER (C.O.).- 1953. Reversible inhibition of cell division and enlargement in plant tissue by 2,6-diaminopurine. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 83, 561-565.
- MILLER (C.O.).- 1963. Kinetin and kinetin-like compounds. Dans : "Modern methods of Plant Analysis". (Linskens H.F. et Tracey M.V. édit.), Springer-Verlag, Berlin, IV, 194-202.

- MILLER (A.O.A.), (E.) DHONT, (A.) MILLER-FAURES & (A.) AGUILERA.- 1976.  
Study of messenger-like RNA extracted from HeLa cells polysomes.  
II. Identification of the types of RNA eluted from methylated  
albumin kieselguhr columns. Arch. intern. Physiol. Biochim., 84,  
15-33.
- MILLER (C.O.) & (F.) SKOOG.- 1953. Chemical control of bud formation in tobacco  
stem segments. Amer. J. Bot., 40, 768-773.
- MILLER (C.O.), (F.) SKOOG, (F.S.) OKUMURA, (M.H.) VON SALTZA & (F.M.) STRONG.-  
1955. Structure and synthesis of kinetin. J. amer. Chem. Soc.,  
77, 2662-2663.
- MILLER (C.O.), (F.) SKOOG, (F.S.) OKUMURA, (M.H.) VON SALTZA & (F.M.) STRONG.-  
1956. Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance  
promoting cell division. J. amer. Chem. Soc., 78, 1375-1380.
- MILLER (C.O.), (F.) SKOOG, (M.H.) VON SALTZA & (F.M.) STRONG.- 1955.  
Kinetin, a cell division factor from desoxyribonucleic acid.  
J. amer. Chem. Soc., 77, 1392-1393.
- MITCHELL (J.P.).- 1969. RNA accumulation in relation to DNA and protein accumu-  
lation in Jerusalem artichoke callus cultures. Ann. Bot., 33, 25-34.
- MOEWUS (F.).- 1959. Competitive antagonism between kinetin and 8-azaguanine  
in *Polytoma uvella*. Science, 130, 921-922.
- MOLLOY (G.) & (L.) PUCKETT.- 1976. The metabolism of heterogenous nuclear  
RNA and the formation of cytoplasmic messenger RNA in animal cells.  
Prog. Biophys. mol. Biol., 31, 1-38.
- MONTUELLE (B.).- 1962. Les gibberellines. Bull. Soc. bot. Nord Fr., 15,  
73-90.
- MOREL (G.) & (S.) DEMETRIADES.- 1955. Action de régulateurs de croissance  
sur l'activité oxydasique des tissus de topinambour. Ann. Biol.,  
31, 227-236.
- MUKHERJEE (R.N.).- 1961. Effect of chromosome uncoiling on the induction of  
chromosome breakage by maleic hydrazide in *Vicia faba*. Nucleus, 4, 145.

- MUNRO (H.N.) & (A.) FLECK.- 1966. Recent developments in the measurement of nucleic acids in biological materials. *Analyst*, 91, 78-88.
- MURASHIGE (T.).- 1964. Analysis of the inhibition of organ formation in tobacco tissue culture by gibberellin. *Physiol. Plant.*, 17, 636-643.
- MURASHIGE (T.).- 1965. Effect of stem-elongation retardants and gibberellin on callus growth and organ formation in tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 18, 665-673.
- MURASHIGE (T.).- 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25, 135-166.
- MURASHIGE (T.), (M.N.) SHABDE, (P.M.) HASEGAWA, (F.H.) TAKATORI & (J.B.) JONES.- 1972. Propagation of Asparagus through shoot apex culture. I. Nutrient medium for formation of plantlets. *J. Amer. Soc. hort. Sci.*, 97, 158-161.
- MURASHIGE (T.) & (F.) SKOOG.- 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- NAEF (J.).- 1972. Néoformation de bourgeons par une souche de tissu médullaire de tabac cultivée en présence de cytokinines. *Saussurea*, 3, 111-117.
- NAG (N.K.) & (B.M.) JOHRI.- 1970. Effects of cytokinins and injury on the formation of shoot buds by leaves of *Dendrophthoe faldatta*. *Planta*, 90, 360-364.
- NAGUIB (M.I.).- 1966. Effect of maleic hydrazide on the nitrogen metabolism of starved and sucrose-fed etiolated barley leaves. *Indian J. Agric. Sci.*, 35, 179-185.
- NAKAZATO (H.), (M.) EDMONDS & (D.W.) KOPP.- 1974. Differential metabolism of large and small poly (A) sequences in the heterogenous nuclear RNA of HeLa cells. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 71, 200-204.
- NASH (D.) & (M.) DAVIES.- 1972. Some aspects of growth and metabolism of Paul's Scarlet Rose cell suspensions. *J. exp. Bot.*, 23, 75-91.

- NAYLOR (A.W.) & (E.A.) DAVIS.- 1951. Respiration response to root-tips to maleic hydrazide. Bull. Torrey Bot. Club, 78, 73-79.
- NEMER (M.), (M.) GRAHAM & (L.M.) DUBROFF.- 1974. Co-existence of non-histone messenger RNA species lacking and containing polyadenylic acid in sea urchin embryos. J. mol. Biol., 89, 435-454.
- NETIEN (G.).- 1959. Effets de la gibbérelline sur la culture des tissus végétaux. Bull. Soc. fr. Physiol. vég., 5, 23-24.
- NIEMAN (R.H.) & (L.L.) POULSEN.- 1963. Spectrophotometric estimation of nucleic acid of plant leaves. Plant Physiol., 38, 31-35.
- NISHIYAMA (I.) & (T.) TAIRA.- 1966. The effect of kinetin and indole-acetic acid on callus growth and organ formation in two species of Nicotiana. Jap. J. Genet., 41, 357-366.
- NITSAN (J.) & (A.) LANG.- 1965. Inhibition of cell division and cell elongation in higher plants by inhibitors of DNA synthesis. Develop. Biol., 12, 358-376.
- NITSCH (J.P.).- 1962. The mediation of climatic effects through regulating substances. Dans : "Environmental Control of Plant Growth" (Evans L.T. édit.), Academic Press, 175-192.
- NITSCH (J.P.).- 1966. Phytohormones et genèse des bourgeons végétatifs et floraux. Dans : "Les phytohormones et l'organogenèse". Congrès international, Université de Liège, 38, 265-299.
- NITSCH (J.P.).- 1968a. Natural cytokinins. Dans "Plant Growth Regulators". Society for chemical Industry, Monograph., 31, 111-123.
- NITSCH (J.P.).- 1968b. Physiologie de la division cellulaire chez les cultures de tissus de Nicotiana. Dans : "Les cultures de tissus de plantes". Colloques nationaux du C.N.R.S., n° 920, Strasbourg, 131-141.

NITSCH (J.P.).- 1968c. Studies on the mode of action of auxins, cytokinins and gibberellins at the subcellular level. Dans : "Biochemistry and physiology of plant growth substances". Proc. of the 6<sup>th</sup> intern. Conf. on Plant Growth Substances. Ottawa (Wightman F. & Setterfield G. édit.) The Runge Press Ltd, 563-580.

NITSCH (J.P.).- & (D.) BUI DANG HA.- 1967. Effet de l'ordre d'application de l'acide indolyl-3-acétique et de la kinétine sur la division cellulaire. C. R. Acad. Sci. Paris, 264, 288-291.

NITSCH (J.P.), (D.) BUI DANG HA & (C.) NITSCH.- 1966. Extraction d'un facteur de bourgeonnement de l'Endive (*Cichorium intybus* L.). Bull. Soc. bot. Fr., 113, 425-429.

NITSCH (J.P.) & (A.) LANCE-NOUGAREDE.- 1967. L'action conjuguée des auxines et des cytokinines sur les cellules de moelle de tabac : étude physiologique et microscopie électronique. Bull. Soc. fr. Physiol. vég., 13, 81-118.

NITSCH (J.P.) & (C.) NITSCH.- 1959a. Modifications du métabolisme des auxines par l'acide gibbérellique. Bull. Soc. fr. Physiol. vég., 5, 20-23.

NITSCH (J.P.) & (C.) NITSCH.- 1959b. Synergie d'action entre les dérivés de l'acide chlorogénique et l'acide 3-indolyl-acétique. Bull. Soc. bot. Fr., 106, 414-417.

NITSCH (J.P.) & (C.) NITSCH.- 1960. Le problème de l'action des auxines sur la division cellulaire : présence d'un cofacteur de division dans le tubercule de Topinambour. Ann. Physiol. vég., 4, 261-268.

NITSCH (J.P.) & (C.) NITSCH.- 1961. Synergistes naturels des auxines et des gibberellines. Bull. Soc. bot. Fr., 108, 349-362.

NITSCH (C.) & (J.P.) NITSCH.- 1967. The induction of flowering in vitro in stem segments of *Plumbago indica* L. I. The production of vegetative buds. *Planta*, 72, 355-370.

NITSCH (J.P.), (C.) NITSCH, (L.M.E.) ROSSINI & (D.) BUI DANG HA.- 1967. The role of adenine in bud differentiation. *Phytomorphology*, 17, 446-453.

- NITTA (T.) & (T.) SHIROYA.- 1976. Three size classes of higher plant DNA-like RNA grouped by MAK column chromatography III. Selective extractions and distributions in cytoplasm. *Plant Cell Physiol.*, 17, 1003-1014.
- NOBECOURT (P.).- 1957. La culture des tissus végétaux. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 104, 623-665.
- NOODEN (L.D.).- 1969. The mode of action of maleic hydrazide. Inhibition of growth. *Physiol. Plant.*, 22, 260-270.
- NOODEN (L.D.).- 1972. Inhibition of nucleic acid synthesis by maleic hydrazide. *Plant Cell Physiol.*, 13, 609-621.
- NOODEN (L.D.).- 1973. Failure of maleic hydrazide to act as sulfhydryl or carbonyl reagent. *Plant Physiol.*, 51, 810-811.
- NOUGAREDE (A.), (P.A.) SIMONIN & (P.E.) PILET.- 1973. Activité  $\alpha$ -amylasique et comportement des plastes amylières du coleoptile du *Triticum durum* traité par la kinétine ou par l'acide gibbéréllique. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 276, 3299-3302.
- OGUR (M.) & (G.) ROSEN.- 1950. The nucleic acids of plant tissues. I. The extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *Arch. Biochem.*, 25, 262-276.
- OKAZAWA (Y.).- 1969. Action of inhibitors of RNA synthesis on auxin-induced callus formation of Potato tissue. *Proc. Crop Sci. Soc. Jap.*, 38, 622-626.
- OLSZEWSKA (M.J.).- 1959. Etude autoradiographique de l'influence de la kinétine sur l'incorporation d'adénine dans les cellules de méristème racinaire d'*Allium cepa*. *Exp. Cell Res.*, 16, 193-201.
- OTAKA (E.), (S.) OSAWA & (Y.) OOTA.- 1961. The effect of 8-azaguanine on the ribonucleic acid of the ribosomes in *Bacillus cereus*. *J. mol. Biol.*, 3, 693-698.
- PALEG (L.G.).- 1965. Physiological effects of gibberellins. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 16, 291-322.

- PARANJOTHY (K.) & (P.F.) WAREING.- 1971. The effects of abscisic acid, kinetin and 5-fluoro-uracil on ribonucleic and protein synthesis in senescing radish leaf disks. *Planta*, 99, 112-119.
- PARKASH (V.).- 1972. Cytokinins. Their mode of action. *J. Sci. Ind. Res.*, 31, 35-38.
- PATAU (K.), (N.K.) DAS & (F.) SKOOG.- 1957. Induction of DNA synthesis by kinetin and indoleacetic acid in excised tobacco pith tissue. *Physiol. Plant.*, 10, 946-966.
- PAULET (P.).- 1965. Etude de la néoformation in vitro de bourgeons végétatifs et floraux. Thèse de Doctorat d'Etat, Paris, 102 p. et *Rev. gén. Bot.*, 72, 697-792.
- PAULET (P.).- 1966. Stimulation de la néoformation in vitro de bourgeons végétatifs et floraux chez deux *Nicotiana* et leur hybride. Dans : "Les phytohormones et l'organogénèse". Congrès international, Université de Liège, 38, 323-340.
- PAULET (P.) & (C.) LIORET.- 1966. La néoformation de bourgeons chez *Nicotiana* sensibilité aux composés phénoliques externes, insensibilité aux composés phénoliques internes. Dans : "Les phytohormones et l'organogénèse" Congrès international, Université de Liège, 38, 341-347.
- PAULET (P.) & (J.P.) NITSCH.- 1959. Stimulation chimique du bourgeonnement chez *Cardamine pratensis* L. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 106, 425-441.
- PAULET (P.) & (J.P.) NITSCH.- 1963. Etude préliminaire du bourgeonnement in vitro de *Nicotiana glauca*, *N. suaveolens* et leur hybride. *Bull. Soc. bot. Fr.*, 110, 361-366.
- PAUPARDIN (C.).- 1970. Contribution à l'étude du rôle des composés phénoliques dans les phénomènes de morphogénèse manifestés par quelques tissus végétaux. Thèse de Doctorat d'Etat, Paris, 69 p. et *Ann. Sci. Nat. Bot.*, 1972, 13, 141-210.
- PAYNE (P.I.).- 1976. The long-lived messenger ribonucleic acid of flowering plant seeds. *Biol. Rev.*, 51, 329-363.

- PEAUD-LENOEL (C.) & (J.P.) JOUANNEAU.- 1971. Contrôle du cycle mitotique dans les suspensions de cellules de tabac cultivées en milieu liquide. Dans : "Les cultures de tissus de plantes". Colloques internationaux du C.N.R.S., n° 193, Strasbourg, 95-102.
- PEAUD-LENOEL (C.), (J.P.) JOUANNEAU & (N.) TANDEAU DE MARSAC.- 1972. Bases moléculaires de l'activité des cytokinines. Bull. Soc. bot. Fr., Mémoires (Coll. Morphologie), 161-172.
- PENMAN (S.).- 1966. RNA metabolism in the Hela cell nucleus. J. mol. Biol., 17, 117-130.
- PENON (P.).- 1970. Contribution à l'étude de la biosynthèse des peroxydases et des acides ribonucléiques à marquage rapide de la racine de lentille. Thèse de Doctorat d'Etat, Marseille, 121 p.
- PENON (P.).- 1972. Ribonucleic acid synthesis and hormone action in Lentil roots. Dans : "Nucleic acids and proteins in higher plants" (Farkas G.L. édit.), Symp. Biol. Hung., 13, 325-334.
- PERRY (R.P.), (J.) LA TORRE, (D.E.) KELLEY & (J.R.) GREENSBERG.- 1972. On the ability of poly (A)-sequences during extraction of messenger RNA from polysomes. Biochim. Biophys. Acta, 262, 220-226.
- PHILIPSON (L.), (R.) WALL, (G.) GLICKMAN & (J.E.) DARNELL.- 1971. Addition of Polyadenylate sequences to virus-specific RNA during Adenovirus replication. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A., 68, 2806-2809.
- PIERIK (R.L.M.) & (H.H.M.) STEEGMANS.- 1975. Effect of auxins, cytokinins, gibberellins, abscisic acid and ethephon on regeneration and growth of bulblets on excised bulb scal segments of Hyacinth. Physiol. Plant., 34, 14-17.
- PILET (P.E.).- 1956a. Emploi de l'hydrazide maléique (1,2-dihydropyridazine-3,6-dione) en physiologie végétale. Phytol., 6, 275-306.
- PILET (P.E.).- 1956b. Action de l'acide  $\beta$ -indolyl-acétique, du D L - tryptophane et de l'hydrazide maléique sur la croissance et la teneur en auxines des racines. Bull. Soc. bot. Suisse, 66, 26-38.

PILET (P.E.).- 1957. Action des gibbérellines sur l'activité auxine-  
oxydasique des tissus cultivés in vitro. C. R. Acad. Sci. Paris,  
245, 1327-1328.

PILET (P.E.).- 1961a. Les phytohormones de croissance. Masson et Cie édit.,  
Paris, 774 p.

PILET (P.E.).- 1961b. Culture in vitro de tissus de Carotte et organogénèse.  
Bull. Soc. bot. Suisse, 71, 189-208.

PILET (P.E.) & (G.) COLLET.- 1959. Acide gibbérellique et destruction  
auxinique in vitro. C. R. Acad. Sci. Paris, 249, 298-299.

PILET (P.E.) & (G.) COLLET.- 1960. Etude du nanisme : I. Action de l'acide  
gibbérellique sur la croissance et la destruction in vitro des auxines.  
Bull. Soc. bot. Suisse, 70, 180-194.

PITT (D.).- 1971. Purification of a ribonuclease from potato tubers and its  
use as an antigen in the immunochemical assay of this protein following  
tuber damage. Planta, 101, 333-351.

PITT (D.).- 1974. Activation and de novo synthesis of ribonuclease following  
mechanical damage to leaves of Solanum tuberosum L. Planta, 117,  
43-55.

PITT (D.) & (M.) GALPIN.- 1971. Increase in ribonuclease activity following  
mechanical damage to leaf and tuber tissues of Solanum tuberosum L.  
Planta, 101, 317-332.

PLUMMER (T.H.).-1957. Chemical treatment for bud formation in Saintpaulia.  
Proc. amer. Soc. hortic., 70, 442-444.

PLUMMER (T.H.) & (A.C.) LEOPOLD.- 1957. Chemical treatment for bud formation  
in Saintpaulia. Amer. Soc. hortic. Sci., 70, 442-444.

POULSON (R.) & (L.) BEEVERS.- 1973. RNA metabolism during the development  
of cotyledon of Pisum sativum L. Biochim. Biophys. Acta, 308, 381-389.

POVOLOTSKAYA (K.L.).- 1961. On the mechanism of action of maleic acid  
hydrazide in plants. (en russe). Izvest. Akad. Nauk. SSSR, Biol., 2, 250-255

POVOLOTSKAYA (K.L.), (Y.A.) BASKAKOV & (I.V.) KHOVANSKAYA.- 1960.

Interaction of uracil, riboflavin and maleic hydrazide in plants (en russe)  
Fiziol. Rast. SSSR, 7, 73-80.

PREVOT (P.).- 1939a. La néoformation des bourgeons chez les végétaux.

Mém. Soc. roy. Belg., 3, 175-342.

PREVOT (P.).- 1939b. Relation entre l'épiderme et les autres tissus de  
la feuille dans la néoformation de bourgeons chez Begonia rex Putz.

Bull. Soc. roy. Sci. Belg., 7, 288-294.

PREVOT (P.).- 1976. Ségrégation et néoformation. Bull. Soc. bot. Fr., 123,  
113-118.

PREVOT (P.) & (A.) CHLYAH.- 1968. L'acide gibbérellique, inhibiteur des  
corrélations de néoformation. C. R. Acad. Agric., 54, 1290-1293.

PROFUMO (P.).- 1967. Osservazioni sulla coltura "in vitro" di foglie e  
frammenti fogliari di "Cichorium intybus" L. Giorn. bot. Ital., 101, 311.

PROFUMO (P.) & (R.M.) DAMERI.- 1969. Proliferazione e rizogenesi in frammenti  
fogliari di Cichorium intybus L. : osservazioni istologiche. Giorn.  
bot. Ital., 103, 301-324.

RAAFAT EL-GEWELY (M.) & (H.) TYSON.- 1974. Isolation and characterisation  
of RNA from Flax (*Linum usitatissimum* L.). Analyt. Biochem., 62,  
341-348.

RABIN (R.S.) & (R.M.) KLEIN.- 1957. Chlorogenic acid as a competitive inhi-  
bitor of indolacetic oxydase. Arch. Biochem. Biophys., 70, 11-15.

RAGG (H.), (J.) SCHRODER & (K.) HAHNBROCK.- 1977. Translation of poly (A)  
containing and poly (A)-free messenger RNA for phenylalanine-ammonia-  
lyase, a plant specific protein in a reticulocyte lysate. Biochim.  
Biophys. Acta, 474, 226-233.

RAGHAVAN (V.).- 1965. Action of purine and pyrimidine analogs on the growth  
and differentiation of the gametophytes of the fern *Asplenium nidus*.  
Amer. J. Bot., 52, 900-910.

- RAGHAVAN (V.).- 1968. A role of purines and pyrimidines of RNA in the induction of two dimensional growth in the gametophytes of the fern *Asplenium nidus*. J. exp. Bot., 19, 553-559.
- RAJU (M.V.S.) & (H.E.) MANN.- 1970. Regenerative studies on the detached leaves of *Echeveria elegans*. Anatomy and regeneration of leaves in sterile culture. Canad. J. Bot., 48, 1887-1891.
- RAKITIN (Yu. V.) & (B.D.) STRELNIKOVA.- 1970. Effect of sodium maleic hydrazide on the content of total nitrogen, proteins and nucleic acids in potato tubers (en russe). Fiziol. Rast. SSSR, 17, 91-95.
- RAKITIN (Yu. V.), (S.V.) VLADIMIRTZEVA & (L.N.) NIKOLAEVA.- 1974. Effect of maleic hydrazide on germination of potato tubers and on the content of protein and nucleic acids in their buds (en russe). Fiziol. Rast., SSSR, 21, 116-120.
- RAMBOUR (S.), (J.) VASSEUR & (J.) DUBOIS.- 1977. Mise en évidence d'ARN polyadénylés dans des suspensions cellulaires de *Silene alba*. C.R. Acad. Sci. Paris, 284, 1063-1066.
- RAO (P.S.), (W.) HANDRO & (H.) HARADA.- 1973. Hormonal control of differentiation of shoots, roots and embryos in leaf and stem cultures of *Petunia inflata* and *Petunia hybrida*. Physiol. Plant., 28, 458-463.
- RATAJCZAK (W.) & (A.) SZWEYKOWSKA.- 1973. Bud-inducing effect of kinetin and the levels of nucleic acids and proteins in cultures of moss gametophytes. Bull. Soc. Amis Sci. Lettr., Poznan, 14, 25-31.
- RAVELOMANANA (D.), (H.H.) OHLENBUSCH & (R.) JONARD.- 1975. Radiorestauration des tissus végétaux cultivés in vitro par les s-ARN de levures et leurs nucléotides. Le facteur de radiorestauration que renferment les s-ARN est contenu dans leur fraction mononucléotidique. C. R. Acad. Sci. Paris, 280, 1047-1050.
- RAY (P.M.).- 1969. The action of auxin on cell enlargement in plants. Develop Biol., 3, 172-205.
- REINERT (J.) & (J.) BESEMER.- 1967. Gibberellinsäure, ein Inhibitor morphogenetischer Prozesse. Wiss. Z. Univ. Rostock Math. Naturwiss., 16, 599-604.

- RHOADS (R.E.).- 1975. Ovalbumin messenger ribonucleic acid. Purification and fractionation on the basis of polyadenylate content by thermal elution from oligo (dT) cellulose. *J. Biol.Chem.*, 250, 8088-8097.
- RICARD (J.), (M.) TEISSERE, (Y.) AZOU & (P.) PENON.- 1976. Hormonal control of ribonucleic acid and protein synthesis in plants. *J. Microscopie Biol. Cell.*, 26, 139-150.
- RIEDEL (M.), (P.) BARTHE, (J.) BAYANOVE & (R.) JONARD.- 1977. Sur le rôle des cytokinines dans l'activité radiorestauratrice des extraits de levure, des t-RNA et d'un extrait particulier d'acides aminés de levure. *C. R. Acad. Sci.Paris*, 284, 1457-1460.
- RIMON (D.) & (E.) GALUN.- 1967. Morphogenesis in *Spirodela oligorrhiza* : effects of pyrimidine base analogues on initiation, elongation and differentiation of fronds. *Plant Cell Physiol.*, 8, 283-291.
- RIMON (D.), (J.) GRESSEL & (E.) GALUN.- 1969. Pyrimidine analogues and nucleic acid synthesis in *Spirodela*. *Israel J. Bot.*, 18, 113-121.
- RINGE (F.) & (J.P.) NITSCH.- 1968. Conditions leading to flower formation on excised *Begonia* fragments cultured in vitro. *Plant Cell Physiol.*, 9, 639-652.
- ROMBERGER (J.A.) & (C.A.) TABOR.- 1971. The picea abies shoot apical meristem in culture. I. Agar and autoclaving effects. *Amer. J. Bot.*, 58, 131-140.
- ROSE (R.J.), (J.) GREGORY & (F.V.) MERCIER.- 1970. The effect of 5-fluorouracil on the growth and nucleoles of wheat coleoptiles. *Aust. J. Biol. Sci.*, 23, 561-571.
- ROSE (R.J.) & (G.) SETTERFIELD.- 1971. Cytological studies on the inhibition by 5-fluorouracil of ribosome synthesis and growth in jerusalem artichoke tuber slices. *Planta*, 101, 210-230.
- ROSEN (D.) & (M.) EDELMAN.- 1976. Poly (A)-associated RNA from the mitochondrial fraction of the fungus *Trichoderma*. *Eur. J. Biochem.*, 63, 525-532.
- ROSS (C.V.).- 1962. Nucleotide composition of ribonucleic acid from vegetative and flowering Cocklebur-shoot tips. *Biochim. Biophys. Acta*, 55, 387-388.

- ROSS (C.).- 1964. Metabolism of 6-azauracil and its incorporation into RNA in the Cocklebur. *Phytochemistry*, 3, 603-607.
- ROUX (L.).-1963. Les nucléotides libres du tissu foliaire de Tomate. *Ann. Physiol. vég.*, 5, 203-215.
- RUCKER (W.) & (C.) PAUPARDIN.- 1969. Action de quelques acides-phénols sur la rhizogenèse des tissus de tubercules de Topinambour (var. Violet de Rennes) cultivés in vitro. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 268, 1279-1281.
- SACHER (J.A.) & (D.D.) DAVIES.- 1974. Demonstration of de novo synthesis of RNase in Rhoec leaf sections by deuterium oxide labeling. *Plant Cell Physiol.*, 15, 157-161.
- SACHER (J.A.) & (P.) DE LEO.- 1977. Wound-induced RNase in senescing bean pod tissue : post-transcriptional regulation of RNase. *Plant Cell Physiol.*, 18, 161-171.
- SACHER (J.A.), (E.J.) MORGAN & (D.) DE LA ROSA.- 1975. Paradoxical effect of actinomycin D. Regulation of synthesis of wound RNase at translation in turnip tissue. *Plant Physiol.*, 56, 442-449.
- SACHS (R.M.) & (A.) LANG.- 1961. Shoot histogenesis and the subapical meristem ; the action of gibberellic acid, Amo 1618 and maleic hydrazide. Dans : "Plant Growth Regulation". 4<sup>th</sup> Conf. intern. on Plant Growth Regulation. Iowa State Univ. Press, 567-578.
- SACHER (J.A.).- 1966. Dual effect of auxin : inhibition of uptake and stimulation of RNA and protein synthesis : assessment of synthesis. *Z. Pflanzenphysiol.*, 56, 410-426.
- SACHER (D.), (M.) EDELMAN, (K.M.) JACOB.- 1974. Poly (A) associated RNA in plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 349, 32-38.
- SCHAEFFER (G.W.) & (F.T.) SHARPE.- 1970. Kinetics of benzyladenine stimulation of tobacco buds. *Ann. Bot.*, 34, 707-719.
- SCHAEFFER (G.W.) & (T.) SOROKIN.- 1966. Growth inhibition of tobacco cultures with 6-azauracile, 6-azauridine and maleic hydrazide. *Plant Physiol.*, 41, 971-975.

- SCHAEFFER (G.W.) & (G.L.) STEFFENS.- 1965. Azauracil and related nucleic acid analogs as inhibitors of axillary bud growth in tobacco. *Tobacco Sci.*, 9, 146-148.
- SCHERRER (K.) & (J.E.) DARNELL.- 1962. Sedimentation characteristics of rapidly labelled RNA from Hela cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 7, 486-490.
- SCHMID (B.D.), (N.R.) SIEGEL & (L.N.) VANDERHOEF.- 1975. The isolation and characterization of adenosine monophosphate-rich polynucleotides synthesized by Soybean hypocotyl cells. Their relation to messenger ribonucleic acid. *Plant Physiol.*, 55, 277-281.
- SCHMIDT (G.) & (S.J.) THANNHAUSER.- 1945. A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 161, 83-89.
- SCHMITZ (R.Y.), (F.) SKOOG, (S.M.) HECHT, (R.M.) BOCK & (N.J.) LEONARD.- 1972. Comparison of cytokinin activities of naturally occurring ribonucleosides and corresponding bases. *Phytochemistry*, 11, 1603-1610.
- SCHNEIDER (W.C.).- 1945. Phosphorus compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 161, 83-89.
- SCHNEIDER (M.L.), (J.C.J.) LIN & (F.) SKOOG.- 1969. Nucleic acid metabolism during cytokinin induced cellular differentiation. *Plant Physiol.*, 44, 1207-1210.
- SCHOENE (D.L.) & (O.L.) HOFFMAN.- 1949. Maleic hydrazide, a unique growth regulant. *Science*, 109, 588-590.
- SCHOUTEDEN-WERY (J.).- 1920. Quelques expériences de régénération des bourgeons chez les racines de Chicorée. *Bull. Acad. roy. Belg.*, 6, 152-166.
- SCHRAUDOLF (H.) & (J.) REINERT.- 1959. Interaction of plant growth regulators in regeneration processes. *Nature*, 184, 465-466.

- SEARLE (N.E.).- 1965. Bioassay of floral stimulus in Xanthium. *Plant Physiol.*, 40, 261-267.
- SEIGLE-MURANDI (F.).- 1971. Sur l'évolution des acides ribonucleiques dans l'albumen immature de Zea mays L. Thèse de Doctorat d'Etat, Grenoble, 161 p.
- SEITZ (U.) & (G.) RICHTER.- 1970. Isolierung und Charakterisierung schnellmarkierter, hochmolekularer RNS aus frei suspendierten Calluszellen der Petersilie (*Petroselinum sativum*). *Planta*, 92, 309-326.
- SEITZ (U.) & (U.) SEITZ.- 1971. Selektive Hemmung der Synthese der AMP-reichen RNS durch  $\alpha$ -Amanitin in zellen höherer Pflanzen. *Planta*, 97, 224-229.
- SEITZ (U.) & (U.) SEITZ.- 1972. Ribosomal RNA synthesis in nuclei of freely suspended cells of higher plants. Dans : "Nucleic acids and proteins in higher plants" (Farkas G.L. édit.), *Symp. Biol. Hung.*, 13, 213-220.
- SEN (P.K.) & (R.N.) BASU.- 1960. Effect of growth substances on root formation in cuttings of *Justicia gendarussa* L. as influenced by varying levels of nitrogen nutrition of stock plants. *Indian J. Plant Physiol.*, 3, 72-83.
- SETFERFIELD (G.).- 1963. Growth regulation in excised slices of jerusalem artichoke tuber tissue. *Symp. Soc. exp. Biol.*, 17, 98-126.
- SHEINESS (D.) & (J.E.) DARNELL.- 1973. Polyadenylic acid segment in mRNA becomes shorter with age. *Nature New Biol.*, 241, 265-268.
- SHEINESS (D.), (L.) PUCKETT & (J.E.) DARNELL.- 1975. Possible relationship of poly (A) shortening to mRNA turnover. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 72, 1077-1081.
- SHELDON (R.), (C.) JURALE & (J.) KATES.- 1972. Detection of polyadenylic acid sequences in viral and eucaryotic RNA. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 69, 417-421.
- SHORT (K.C.), (E.G.) BROWN & (H.E.) STREET.- 1969. Studies on the growth in culture of plant cells. VI. Nucleic acid metabolism of *Acer pseudo-platanus* cell suspensions. *J. exp. Bot.*, 20, 579-590.

- SIELIWANOWICZ (B.), (M.) KALINOWSKA & (I.) CHMIELEWSKA.- 1977. Appearance of poly (A)-rich RNA in germinating Pea seeds. *Acta Biochim. Pol.*, 24, 59-64.
- SILBERGER (J., Jr.) & (F.) SKOOG.- 1953. Changes induced by AIA in nucleic acid contents and growth of tobacco pith tissue. *Science*, 118, 443-444.
- SIMARD (A.).- 1971. Initiation of DNA synthesis by kinetin and experimental factors in tobacco pith tissues in vitro. *Can. J. Bot.*, 49, 1541-1550.
- SINGH (H.) & (D.) KELLER.- 1968. Studies on wheat-embryo ribosomal RNA I. Behaviour on methylated albumin kieselguhr columns. *Biochim. Biophys. Acta*, 169, 150-162.
- SIPPEL (A.E.), (J.G.) STAURIANOPOULOS, (G.) SCHUTZ & (P.) FEIGELSON.- 1974. Translational properties of rabbit globin mRNA after specific removal of poly A with ribonuclease H. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 71, 4635-4639.
- SKINNER (C.) & (W.) SHIVE.- 1955. Synthesis of some 6-(substituted)-amino-purines. *J. Amer. Chem. Soc.*, 77, 6692-6693.
- SKOOG (F.).- 1944. Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. *Amer. J. Bot.*, 31, 19-24.
- SKOOG (F.).- 1950. Chemical control of growth and organ formation in plant tissues. *Ann. Biol.*, 26, 545-562.
- SKOOG (F.).- 1954. Substances involved in normal growth and differentiation of plants. *Brockhaven Symp. in Biol.*, 6, 1-21.
- SKOOG (F.).- 1955. Growth factors, polarity and morphogenesis. *Ann. Biol.*, 31, 201-213.
- SKOOG (F.).- 1970. Aspects of growth factor interactions in morphogenesis of tobacco tissue cultures. Dans : "Les cultures de tissus de plantes". *Colloques internationaux du C.N.R.S.*, n° 193, Strasbourg, 115-135.
- SKOOG (F.) & (D.J.) ARMSTRONG.- 1970. Cytokinins. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 21, 359-384.

- SKOOG (F.) & (C.O.) MILLER.- 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. exp. Biol., Cambridge Univ. Press, 11, 118-131.
- SKOOG (F.) & (C.) TSUI.- 1948. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured in vitro. Amer. J. Bot., 35, 782-787.
- SKOOG (F.) & (C.) TSUI.- 1951. Growth substances and the formation of buds in plant tissues. Dans : "Plant growth substances". (Skoog F. édit.) University of Wisconsin Press, 263-285.
- SLATER (I.), (D.) GILLESPIE & (D.W.) SLATER.- 1973. Cytoplasmic adenylation and processing of maternal RNA. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A., 70, 406-411.
- SLOTOVA (J.), (Z.) KARPFFEL & (D.) KUBICKOVA.- 1971. The effect of maleic hydrazide and exogenous DNA on chromosomes of *Vicia faba*. Biol. Plant., 13, 295-304.
- SMILLIE (R.M.) & (G.) KROTKOV.- 1960. The estimation of nucleic acids in some algae and higher plants. Can. J. Bot., 38, 31-49.
- SMITH (J.D.) & (R.E.F.) MATTHEWS.- 1957. The metabolism of 8-azapurines. Biochem. J., 66, 323-333.
- SOBCZYK (U.) & (A.) SZWEYKOWSKA.- 1973. The effect of 3-indolylacetic acid on the accumulation of starch in the root tissue of *Cichorium intybus* L. cultured in vitro. Acta Soc. bot. Pol., 19, 297-303.
- SOREQ (H.), (U.) NUDEL, (R.) SALOMON, (M.) REVEL & (U.Z.) LITTAUER.- 1974. In vitro translation of polyadenylic acid-free rabbit globin messenger RNA. J. mol. Biol., 88, 233-245.
- SOROKIN (H.P.) & (K.V.) THIMANN.- 1964. The histological basis for inhibition of axillary buds in *Pisum sativum* and the effects of auxins and kinetin on xylem development. Protoplasma, 39, 326-350.
- SPANJERSBERG (G.) & (R.J.) GAUTHERET.- 1964. Nouvelles recherches sur l'action de l'acide gibbéréllique sur les tissus de topinambour cultivés "in vitro". C. R. Acad. Sci. Paris, 258, 4121-4125.

- SRIVASTAVA (B.I.S.).- 1967. Cytokinins in plants. Intern. Rev. Cytol., 22, 341-387.
- STEELE (W.J.), (N.) OKAMURA & (H.) BUSCH.- 1964. Prevention of loss of RNA, DNA and protein into lipid solvents. Biochim. Biophys. Acta, 87, 490-492.
- STEGMANN (J.) & (H.) HAHN.- 1974. Poly-A-Sequenzen in polysomaler RNA aus *Funaria hygrometrica*. Z. Pflanzenphysiol., 74, 143-151.
- STERLING (C.).- 1950. Histogenesis in tobacco stem segments cultured in vitro. Amer. J. Bot., 37, 464-470.
- STERLING (C.).- 1951. Origin of buds in tobacco stem segments cultured in vitro. Amer. J. Bot., 38, 761-767.
- STEWARD (F.C.), (A.E.) KENT & (M.O.) MAPES.- 1967. Growth and organization in cultured cells : sequential and synergistic effects of growth regulating substances. Ann. N.Y. Acad. Sci., 144, 326-334.
- STEWARD (F.C.) & (E.M.) SHANTZ.- 1959. The chemical regulation of growth (some substances and extracts which induce growth and morphogenesis). Ann. Rev. Plant. Physiol., 10, 379-404.
- STICHEL (E.).- 1959. Gleichzeitige Induktion von Sprossen und Wurzeln an in vitro kultivierten Gewebestücken von *Cyclamen persicum*. Planta, 53, 293-317.
- STILES (J.I.), (Jr.) DAVIES & (P.J.) DAVIES.- 1976. RNA metabolism in apices of *Pharbitis nil* during floral induction. Plant Cell Physiol., 17, 825-833.
- STREET (H.E.).- 1966. Growth, differentiation and organogenesis in plant tissue and organ cultures. Dans : "Cells and tissues in cultures". (Willmer E.N. édit.) Academic Press, III, 631-689.
- SUEOKA (N.) & (T.Y.) CHENG.- 1962. Fractionation of nucleic acids with the methylated albumin column. J. mol. Biol., 4, 161-172.
- TANIMOTO (E.) & (Y.) MASUDA.- 1969. Auxin induced synthesis of TB-RNA in pea stems. Plant Cell Physiol., 10, 485-489.

- TATA (J.R.).- 1966. Hormones and the synthesis and utilization of ribonucleic acids. Prog. in Nucleic Acid Res. mol. Biol., 5, 191-250.
- TAYLORSON (R.) & (L.G.) HOLM.- 1961. Maleic hydrazide-auxin interactions in water uptake of potato disks. Plant Physiol., 36, 465-471.
- TEISSERE (M.).- 1974. Contrôle hormonal de la transcription chez les végétaux. Thèse de Doctorat d'Etat, Aix-Marseille, 188 p.
- TEISSERE (M.), (P.) PENON, (J.) RICARD & (G.) RATLE.- 1972. Sequence similarity between heterogeneous nuclear RNA and polysomal messenger RNA in higher plants. Febs Letters, 23, 65-68.
- TEPPAZ-MISSON (C.) & (M.) GENDRAUD.- 1970. Activité saccharasique mesurable dans les extraits de tiges de Topinambour (*Helianthus tuberosus* L.) cultivées in vitro en relation avec leur mode de croissance. Influence de l'acide gibbérellique sur cette activité enzymatique. C. R. Acad. Sci. Paris, 270, 489-492.
- TESTER (C.) & (L.S.) DURE.- 1967. Nucleic acid synthesis during hormone-stimulated growth of excised oat coleoptiles. Biochemistry, 6, 2532-2538.
- THIMANN (K.V.).- 1969. The auxins. Dans : "The physiology of plant growth and development". (Wilkins M.B. édit.) Mc Grave-Hill, N.Y., 3-45.
- THOMAS (J.C.), (A.)GORIS & (R.) BOURIQUET.- 1971. Sur les propriétés exitoformatrices du suc de xylème de Carotte. 96e Congrès nat. Soc. savantes, Toulouse, Sci., 4, 163-172.
- THORPE (T.A.) & (D.D.) MEIER.- 1972. Starch metabolism, respiration and shoot formation in tobacco callus cultures. Physiol. Plant., 27, 365-369.
- THORPE (T.A.) & (D.D.) MEIER.- 1973. Effects of gibberellic acid and abscisic acid on shoot formation in tobacco callus cultures. Physiol. Plant, 29, 121-124.
- THORPE (T.A.) & (T.) MURASHIGE.- 1968. Starch accumulation in shoot-forming tobacco callus cultures. Science, 160, 421-422.

- THORPE (T.A.) & (T.) MURASHIGE.- 1970. Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus cultures. *Can. J. Bot.*, 48, 277-285.
- TOBIN (E.M.) & (A.O.) KLEIN.- 1975. Isolation and translation of plant messenger RNA. *Plant Physiol.*, 56, 88-92.
- TOPONI (M.).- 1963a. Sur la culture de fragments de feuilles d'Endive (*Cichorium intybus* L.) *C. R. Acad. Sci., Paris*, 257, 3212-3215.
- TOPONI (M.).- 1963b. Action combinée de la kinétine et de l'acide indolylacétique sur la néoformation d'organes par des fragments de feuilles d'endive (*Cichorium intybus* L.) cultivés in vitro. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 257, 3030-3033.
- TORREY (J.G.).- 1956. Chemical factors limiting lateral root formation in isolated pea roots. *Physiol. Plant.*, 9, 370-388.
- TORREY (J.G.).- 1962. Auxin and purine interactions in lateral root initiation in isolated pea root segments. *Physiol. Plant.*, 15, 177-185.
- TORREY (J.G.).- 1966. The initiation of organized development in plants. *Adv. Morphogen.*, 5, 39-92.
- TRAN THANH VAN (M.) & (A.) DRIRA.- 1970. Definition of a simple experimental system of directed organogenesis de nuevo : organ neof ormation from epidermal tissue of *Nautilocalyx lynchei*. Dans : "Les cultures de tissus de plantes". Colloques internationaux du C.N.R.S., n° 193, Strasbourg, 169-176.
- TRAN THANH VAN (M.), (N.) THI DIEN & (A.) CHLYAH.- 1974. Regulation of organogenesis in small explants of superficial tissue of *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, 119, 149-159.
- TRAPY (G.), (R.B. Van) HUYSTEE & (R.) ESNAULT.- 1975. RNA polyadénylés de méristème de racine de fève : extraction séquentielle en fonction du pH. *Biochimie*, 57, 123-125.
- TREWAVAS (A.).- 1968. Effect of IAA on RNA and protein synthesis. *Arch. Biochem.*, 123, 324-335.

- TSANEV (R.) & (G.) MARKOV.- 1960. Substances interfering with spectrophotometric estimation of nucleic acids and their elimination by the two-wavelength method. *Biochim. Biophys. Acta*, 42, 442-452.
- UDVARDY (J.), (G.L.) FARKAS & (E.) MARRE.- 1969. On RNase and other hydrolytic enzymes in excised *Avena* leaf tissues. *Plant Cell Physiol.*, 10, 375-386.
- USCIATI (M.), (M.) CODACCIONI & (C.) RAUTUREAU.- 1969. Sur la cinétique de levée d'inhibition de croissance des bourgeons axillaires chez le *Cicer arietinum*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 268, 3053-3056.
- USCIATI (M.), (M.) CODACCIONI, (C.) RAUTUREAU & (P.) BERREUR.- 1970. Influence de la 6-benzylaminopurine sur le métabolisme des acides nucléiques de bourgeons axillaires du *Cicer arietinum*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 270, 1796-1799.
- VANDERHOEF (L.N.) & (J.L.) KEY.- 1968. Inhibition by kinetin of cell elongation and RNA synthesis in excised soybean hypocotyl. *Plant Cell Physiol.*, 9, 343-351.
- VANDERHOEF (L.N.) & (J.L.) KEY.- 1970. The fractionation of transfer ribonucleic acid from roots of pea seedlings. *Plant Physiol.*, 46, 294-298.
- VAN DE WALLE (C.).- 1973. Polyadenylic sequences in plant RNA. *FEBS Letters* 34, 31-34.
- VAN DE WALLE (C.) & (R.) DELTOUR.- 1974. Presence of heterodisperse nuclear RNA in a plant, *Zea mays*. *FEBS Letters*, 49, 87-91.
- VAN OVERBEEK (J.), (M.E.) CONKLIN & (A.F.) BLAKESLEE.- 1941. Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. *Science*, 94, 350-351.
- VAN SITTERT (N.J.), (A.M.) LEDEBOER, (C.J.S. Van) RIJN, (E.) BOON & (R.A.) SCHILPEROORT.- 1975. RNA from callus cultures and leaves of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry*, 14, 637-646.
- VARDAR (Y.) & (P.) ACARER.- 1957. Auxin relation to the development of epiphyllous buds in *Bryophyllum*. *Phyton*, 8, 109-118.

- VARDJAN (M.) & (J.P.) NITSCH.- 1961. La régénération chez *Cichorium endivia* L : étude des auxines et des "kinines" endogènes. Bull. Soc. bot. Fr., 108, 363-374.
- VARGA (M.).- 1971. On the mechanism of gibberellin-auxin interaction VII. Effects of gibberellic acid on the utilization of auxin precursors in indoleacetic synthesis. Acta Biol. Szeged, 17, 113-118.
- VARNER (J.E.) & (G.) RAM CHANDRA.- 1964. Hormonal control of enzyme synthesis in barley endosperm. Proc. nat. Acad. Sci.U.S.A., 52, 100-106.
- VASIL (I.K.) & (A.C.) HILDEBRANDT.- 1966. Variations of morphogenetic behavior in plant tissue cultures. I. *Cichorium endivia*. Amer. J. Bot., 53, 860-869.
- VASSEUR (J.).- 1965a. Recherches sur la culture "in vitro" de tissus d'endive. Diplôme d'Etudes supérieures, Lille.
- VASSEUR (J.).- 1965b. Sur les conditions de culture "in vitro" des tissus de feuilles d'endive. Bull. Soc. bot. Nord Fr., 18, 205-212.
- VASSEUR (J.).- 1966a. Action de quelques facteurs de croissance sur le développement "in vitro" des tissus de feuilles d'endive. Bull. Soc. bot. Nord Fr., 19, 37-43.
- VASSEUR (J.).- 1966b. Sur la polarité des tissus de feuilles d'endive cultivés "in vitro". Bull. Soc. bot. Nord Fr., 19, 188-194.
- VASSEUR (J.).- 1972. Incorporation d'acide orotique-<sup>14</sup>C et d'uracile-<sup>14</sup>C dans les ribonucléotides de fragments de feuilles d'Endive cultivés in vitro. C. R. Acad. Sci. Paris, 275, 2865-2868.
- VASSEUR (J.) & (R.) BOURIQUET.- 1969. Action de l'hydrazide maléique sur le bourgeonnement des tissus de feuilles d'endive (*Cichorium intybus* L.) cultivés "in vitro". Bull. Soc. bot. Fr. 22, 169-176.
- VASSEUR (J.) & (R.) BOURIQUET.- 1973. Interaction de l'hydrazide maléique et des bases pyrimidiques ou puriques sur le bourgeonnement "in vitro" de fragments de feuilles d'endive. C. R. Acad. Sci. Paris, 277, 641-644.

- VASSEUR (J.) & (B.) LEGRAND.- 1972. Répartition des protéines, des acides nucléiques et des activités enzymatiques : auxines-oxydases, peroxydases et catalases dans les feuilles d'endive (*Cichorium intybus* L.).  
Rev. gén. Bot., 79, 309-317.
- VASSEUR (J.) & (S.) RAMBOUR.- 1977. Comparaison de la taille des séquences polyadényliques d'ARN obtenus par une extraction thermique différentielle. C. R. Acad. Sci. Paris, 285, 1075-1078.
- VENVERLOO (C.J.).- 1973. The formation of adventitious organs. I. Cytokinin-induced formation of leaves and shoots in callus cultures of *Populus nigra* L. "italica". Acta Bot. Neerl., 22, 390-398.
- VERDIER (G.), (G.) TRABUCHET, (P.) HEIZMANN & (V.) NIGON.- 1973. Effet de l'éclaircissement sur les synthèses de RNA et de séquences polyadényliques dans des cultures d'*Euglena gracilis* étiolées.  
Biochim. Biophys. Acta, 312, 528-539.
- VERMA (D.P.S.) & (G.A.) MAC LACHLAN.- 1976. Metabolism of poly (A) in plant cells. Discrete classes associated with free and membrane-bound polysomes. Plant Physiol., 58, 405-410.
- VERMA (D.P.S.), (D.T.) NASH & (H.M.) SCHULMAN.- 1974. Isolation and in vitro translation of soybean leghaemoglobin mRNA. Nature, 251, 74-77.
- WAGNER (E.K.), (L.) KATZ & (S.) PENMAN.- 1967. The possibility of aggregation of ribosomal RNA during hot phenol-SDS deproteinization. Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 152-159.
- WALKER (R.I.).- 1940. Regeneration in the scale leaf of *Lilium candidum* and *L. Longiflorum*. Amer. J. Bot., 27, 114-118.
- WARDELL (W.L.), (F.) SKOOG.- 1969. Flower formation in excised tobacco stem segments. I. Methodology and effects of plant hormones. Plant Physiol., 44, 1402-1406.
- WAREING (P.F.).- 1958. Interaction between indoleacetic acid and gibberellic acid in cambial activity. Nature, 181, 1744-1745.

- WARMKE (H.E.) & (G.L.) WARMKE.- 1950. The role of auxin in the differentiation of root and shoot primordia from root cuttings of *Taraxacum* and *Cichorium*. *Amer. J. Bot.*, 37, 272-280.
- WASILEWSKA (L.D.) & (K.) KLECZKOWSKI.- 1974. Phytohormone induced changes in the nuclear RNA population of plant protoplasts. *Febs Letters*, 44, 164-168.
- WATANABE (R.) & (R.E.) STUTZ.- 1960. Effect of gibberellic acid on enzyme activity and oxygen uptake in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Physiol.*, 32, 371-372.
- WEEKS (D.P.) & (A.) MARCUS.- 1971. Preformed messenger of quiescent wheat embryos. *Biochim. Biophys. Acta*, 232, 671-684.
- WEINBERG (R.A.), (Z.) BEN-ISHAI & (J.E.) NEWBOLD.- 1972. Poly-A associated with SV<sub>40</sub> messenger RNA. *Nature New Biol.*, 238, 111-113.
- WEINSTEIN (I.B.) & (D.) GRUNBERG.- 1965. Coding properties of S-RNA containing 8-azaguanine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19, 647-653.
- WELANDER (T.).- 1977. In vitro organogenesis in explants from different cultivars of *Begonia x hiemalis*. *Physiol. Plant.*, 41, 142-145.
- WHEELER (A.M.) & (M.R.) HARTLEY.- 1975. Major mRNA species from spinach chloroplasts do not contain poly (A). *Nature*, 257, 66-67.
- WIGGANS (S.C.).- 1954. Growth and organ formation on callus tissues derived from *Daucus carota*. *Amer. J. Bot.*, 41, 321-326.
- WILLEMOT (C.) & (P.K.) STUMPF.- 1967. Fat metabolism of higher plants. XXXIV. Development of fatty acid synthetase as a function of protein synthesis in aging potato tuber slices. *Plant Physiol.*, 42, 391-397.
- WILLIAMSON (R.), (J.) CROSSLEY & (S.) HUMPHRIES.- 1974. Translation of mouse globin messenger ribonucleic acid from which the poly (adenylic acid) sequence has been removed. *Biochemistry*, 13, 703-707.

- WOLLGIEHN (R.).- 1967. Nucleic acid and protein metabolism of excised leaves. Symp. Soc. exp. Biol., 21, 231-246.
- WOLLGIEHN (R.) & (B.) PARTHIER.- 1964. Ein Beitrag zur quantitativen Bestimmung von Ribonukleinsäure und Protein in Blättern. Flora, 154, 325-348.
- WYEN (N.V.), (J.) UDVARDY & (G.L.) FARKAS.- 1971. Changes in the level of acid phosphatases in Avena leaves in response to cellular injury. Phytochemistry, 10, 765-771.
- XHAUFFLAIRE (A.) & (Th.) GASPAR.- 1968. Les cytokinines. Ann. Biol., 7, 39-87.
- YEOMAN (M.M.) & (P.A.) AITCHISON.- 1973. Growth patterns in tissue (Callus) cultures. Dans : "Plant tissue and cell culture". (Street H. édit.), Blackwell Sci. Public., London, 240-268.
- YONEDA (Y.).- 1969. Organ formation in cultured leaf blades of Crepis capillaris. Bot. Mag. Tokyo, 82, 204-209.
- YOSHIDA (K.).- 1974. RNA containing poly-A sequence in Pharbitis nil cotyledons and its template activity in vitro. Plant Cell Physiol., 15, 441-456.
- ZBELL (B.) & (J.) REINERT.- 1977. Rapidly-labelled RNA species isolated from cell suspensions of Daucus carota. Protoplasma, 93, 55-70.
- ZEEVART (J.A.D.).- 1962. DNA multiplication as a requirement for expression of floral stimulus in Pharbitis nil. Plant Physiol., 37, 296-304.
- ZENKTELER (M.A.).- 1971. Development of new plants from leaves and roots of Atropa belladonna L. in in vitro culture. Acta Soc. Bot. Pol., 60, 305-313.
- ZIMMERMAN (E.F.).- 1968. Azaguanine inhibition of protein synthesis. III. Site of action in Hela cells. Biochim. Biophys. Acta, 157, 373-391.
- ZWAR (J.A.).- 1973. Effects of cytokinins on the nucleic acids of tobacco pith. J. exp. Bot., 24, 701-710.



