

A V A N T P R O P O S

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Physiologie végétale de l'Université de Lille-Flandres Artois, sous la direction de Monsieur le Professeur BOURIQUET. Après m'avoir engagé comme Adjoint biologiste, Monsieur BOURIQUET m'a incité à entreprendre des recherches personnelles et il a facilité ma promotion à la fonction d'Assistant. Je lui sais gré d'avoir suivi mon travail avec une attention toujours bienveillante et d'en avoir permis sa réalisation. Ses conseils et ses critiques ont contribué, pour une grande part, à la mise au point du texte de ce manuscrit. Je suis très heureux de pouvoir lui exprimer ma reconnaissance.

Monsieur GASPAR, Directeur du Laboratoire d'Hormonologie fondamentale et appliquée de l'Université de Liège, m'a accueilli de nombreuses fois et m'a fait bénéficier de sa très grande expérience des peroxydases. Je lui adresse mes plus vifs remerciements et je lui suis reconnaissant d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Pour leur participation à la commission d'examen, j'adresse mes sincères remerciements à Monsieur PENEL, Maître d'enseignement et de recherche à l'Université de Genève, qui a bien voulu se charger du rapport des recherches exposées ici, et à Monsieur le Professeur KREMBEL de l'Université de Lille-Flandres Artois pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce mémoire.

751

50376
1987
243

50376
1987
243

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le titre de

DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

Bernard LEGRAND



**PEROXYDASES ET LEUR REGULATION
AU COURS DE LA NEOFORMATION DE
BOURGEONS PAR DES TISSUS DE
*ACHORIMUM INTYBUS L. CULTIVES IN VITRO***



030 017133 5

Soutenu le 14 Octobre 1987 devant la Commission d'Examen

R. BOURIQUET
Th. GASPAR
J. KREMBEL
C. PENEL
J. VASSEUR

Il m'est particulièrement agréable de remercier Monsieur VASSEUR, Maître de Conférences au Laboratoire de Physiologie végétale de Lille, qui siège à ce jury d'examen, pour l'étroite collaboration et les entretiens fructueux que nous avons toujours eus tout au long de ce travail. Il a su par son enthousiasme et la clarté de sa réflexion m'encourager à rédiger ce mémoire.

Mes remerciements vont aussi à mes collègues du laboratoire, J.P COUILLEROT, J. DUBOIS, R. LEFEBVRE et S. RAMBOUR pour l'aide amicale qu'ils m'ont accordée.

Enfin je remercie le personnel technique du laboratoire et tout particulièrement Madame JOVENIN pour le soin qu'elle a apporté à la dactylographie de ce mémoire.

INTRODUCTION

La néoformation d'organes, notamment de bourgeons, demeure un problème actuel qui présente un grand intérêt tant sur le plan théorique que sur le plan pratique.

La culture *in vitro* des tissus végétaux fournit un moyen commode pour l'étude de la croissance et de la différenciation dans des conditions bien définies. Cette technique a été largement utilisée comme support d'études cytologiques, histologiques et morphologiques, mais très peu de travaux se sont intéressés aux modifications biochimiques en relation avec la différenciation organogène.

Pour contribuer aux recherches dans ce domaine nous avons envisagé le problème de la manière suivante :

Le processus de bourgeonnement peut se diviser en plusieurs étapes. Il débute par une activation et une dédifférenciation cellulaire, puis par la reprise des activités mitotiques et l'induction des nodules méristématiques et enfin par le développement des bourgeons. Cette dernière étape est ce que nous constatons pour arguer de l'influence d'un facteur sur la néoformation des bourgeons, puisque c'est la variation du nombre de bourgeons néoformés que nous mesurons. Mais ceci ne peut être que le reflet de l'intervention, du facteur considéré, au cours des étapes précédentes et nous pensons que cette intervention se fait au niveau moléculaire.

Nous avons alors analysé l'influence de facteurs physiques et/ou chimiques sur le bourgeonnement de tissus foliaires ou racinaires de *Cichorium intybus* L. dont la capacité de régénération est bien connue.

↵ Nous avons ensuite recherché si l'action des facteurs qui modifient le bourgeonnement, se répercute au niveau moléculaire. Les peroxydases nous ont semblé particulièrement intéressantes pour ce travail ; d'abord à cause du nombre considérables de faits expérimentaux montrant que l'activité de ces enzymes est sous la dépendance de facteurs génétiques, hormonaux et/ou externes (GALSTON et Coll., 1968 ; GALSTON et DAVIES 1969) et surtout parce que ce sont elles qui contrôlent en partie le taux en auxine endogène (GASPAR et Coll., 1982) et sont donc susceptibles d'intervenir dans l'équilibre hormonal auxine-cytokinine qui règle les phénomènes d'organogénèse (SKOOG et MILLER, 1957).

L'étude présentée comporte un historique qui, d'une part résume succinctement l'essentiel des données acquises sur la néoformation des bourgeons par des tissus cultivés *in vitro* et d'autre part rappelle les propriétés physico-chimiques et physiologiques des peroxydases.

A cet historique font suite, l'étude critique des méthodes expérimentales et du matériel végétal utilisés, un exposé de l'ensemble des résultats obtenus avec relations entre les modifications de l'intensité du bourgeonnement à celles des activités peroxydasiques et une tentative d'explication de la régulation des peroxydases par les composés phénoliques.

Enfin, dans un chapitre de considérations générales, nous situerons nos propres résultats parmi ceux de nos prédécesseurs. Cette analyse nous permettra de dégager les idées susceptibles d'orienter la poursuite de ce travail.

HISTORIQUE

I - LE BOURGEONNEMENT

La néoformation des points végétatifs est fréquente dans les cultures de tissus végétaux (GAUTHERET, 1942).

Habituellement ces points végétatifs proviennent de la différenciation d'un petit groupe de cellules qui forment un nodule s'organisant rapidement en méristème racinaire ou caulinaire. Le déterminisme des phénomènes d'organogénèse *in vitro* semble d'ailleurs fort complexe car en fait il résulte d'interactions encore mal connues. Aborder celui du bourgeonnement est l'une des démarches les plus délicates en physiologie végétale. En effet dans ce domaine les observations semblent si divergentes d'une espèce à l'autre qu'il apparaît bien difficile de concevoir un processus commun. Toutefois on peut réunir très approximativement les travaux relatifs à ce sujet en deux ensembles ; l'un regroupant les recherches montrant le rôle organogénétique des régulateurs de croissance, l'autre concernant le rôle morphogène des facteurs de l'environnement. Il existe d'ailleurs une très grande disproportion entre ces deux courants d'investigation, le premier ayant été considérablement exploité, tandis que les travaux traitant du deuxième sont peu nombreux.

D'après les travaux consacrés à l'étude du bourgeonnement (PREVOT, 1939 ; SKOOG, 1944, 1950, 1954 et 1955 ; GAUTHERET, 1959, 1963, 1966 ; CHAMPAGNAT, 1961 ; DORE, 1965 ; PAULET, 1965 ; BUTENKO, 1968 ; BIGOT, 1971 ; MURASHIGE, 1974 ; VASSEUR, 1979), l'hypothèse formulée par SKOOG et MILLER (1957) de l'intervention du rapport auxine-cytokinine dans le déterminisme du type d'organe formé semble généralement admise.

Souvent, des apports exogènes d'acide indolyl-acétique ou d'autres composés auxino-mimétiques tendent à induire la formation des racines, les cytokinines par contre sont dans de nombreux cas d'excellentes inductrices de la formation des bourgeons. Les résultats concernant l'action des gibbérellines sur la néoformation des bourgeons ne permettent pas de définir, contrairement aux groupes d'hormones évoqués précédemment, une règle générale. Les gibbérellines stimulent la néoformation des bourgeons chez *Cardamine pratensis* (PAULET et NITSCH, 1959), chez *Chondrilla juncea* (KEFFORD et CASO, 1972) au contraire elles l'inhibent chez le *Bégonia rex* (SCHRAUDOLF et REINERT, 1959 ; NITSCH, 1968 ; PREVOT et CHLYAH, 1968) chez le *Bryophyllum tubiflorum* (MARCELLE, 1970) sur les

tissus de feuilles chlorophylliennes de *Cichorium intybus* (BESEMER et Coll., 1969, chez *Nicotiana tabacum* (MURASHIGE, 1964 ; THORPE et MEIER, 1973) et chez *Plumbago indica* (NITSCH et NITSCH, 1967) enfin, elles sont sans effets sur les tissus de racine de *Cichorium intybus* (REINERT et BESEMER, 1967) et chez *Datura innoxia* (ENGVILD, 1973).

A ces hormones on peut également ajouter l'éthylène, dont les interactions avec les substances de croissance ont été maintes fois soulignées (PRATT et GOESCHL, 1969), mais dont le rôle sur la néoformation des bourgeons est encore peu démontré (BOURIQUET, 1972 ; LEFEBVRE, 1972, 1978 ; HUXTER et Coll. 1981 ; VAN AARTRIJK, 1984).

Nous ne développerons pas dans cet historique sommaire le rôle des facteurs d'environnement car nous aurons l'occasion de les évoquer en détails au cours de la discussion de nos propres résultats.

II - LES PEROXYDASES

LINOSSIER (1898) utilise pour la première fois le terme peroxydase *pour des corps dont la fonction est de décomposer le peroxyde d'hydrogène et de provoquer l'oxydation d'autres corps.*

Les peroxydases (H_2O_2 oxydoreductases) répertoriées selon les normes internationales comme : EC1.11.1.7 sont des enzymes qui existent chez presque toutes les espèces de végétaux supérieurs ; c'est dans la racine de Raifort et dans la sève de Figuier qu'on les trouve en plus grandes quantités.

Isolées pour la première fois chez les végétaux, les peroxydases sont des hémoprotéines (KHUN et Coll., 1931). Les nombreux travaux réalisés sur la peroxydase de Raifort (HRP : horse radish peroxydase), purifiée et cristallisée par THEORELL (1942), sur la peroxydase de navet (TP 7 : turnip peroxydase) par RICARD (1969), MAZZA et Coll., (1970) et sur la peroxydase du radis japonais (JRP : japonese radish peroxydase) par MORITA (1977), ont permis d'en connaître les caractéristiques structurales. Leur poids moléculaire oscille entre 44 000 et 52 000 daltons, elles sont constituées d'une apoenzyme qui est une glucoprotéine incolore comprenant environ 287 amino-acides associés à des acides uroniques en quantité importante (18,4 %) et d'un groupement prosthétique qui est une porphyrine ferrique brune la protohématine IX (Figure I).

PEROXYDASE

PROTOHEMATINE IX

+

GLUCOPROTEINE

 Fe^{3+}

+

PROTOPORPHYRINE IX

Figure I : Structure de la peroxydase

La protohématine IX est un composé héminique dans lequel le fer a six positions de coordination, dont quatre sont liées aux atomes d'azote porphyrinique ; la cinquième est liée à la glucoprotéine et la sixième à une molécule d'eau (Figure II).

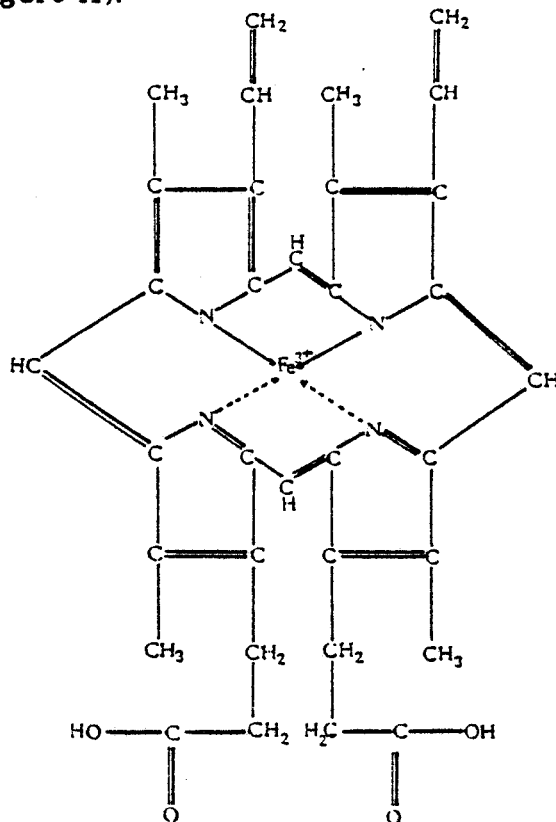


Figure II : Structure de la protohématine IX

C'est par échange de cette sixième position que la peroxydase réagirait dans les réactions de peroxydation. Le spectre de la protohématine IX, comme celui des porphyrines métalliques présente trois bandes d'absorption dénommées alpha, beta et gamma (NARI et PENON, 1968). La bande d'absorption la plus intense a son maximum à 403 nanomètres et est dénommée bande de SORET, bande gamma sur la figure III.

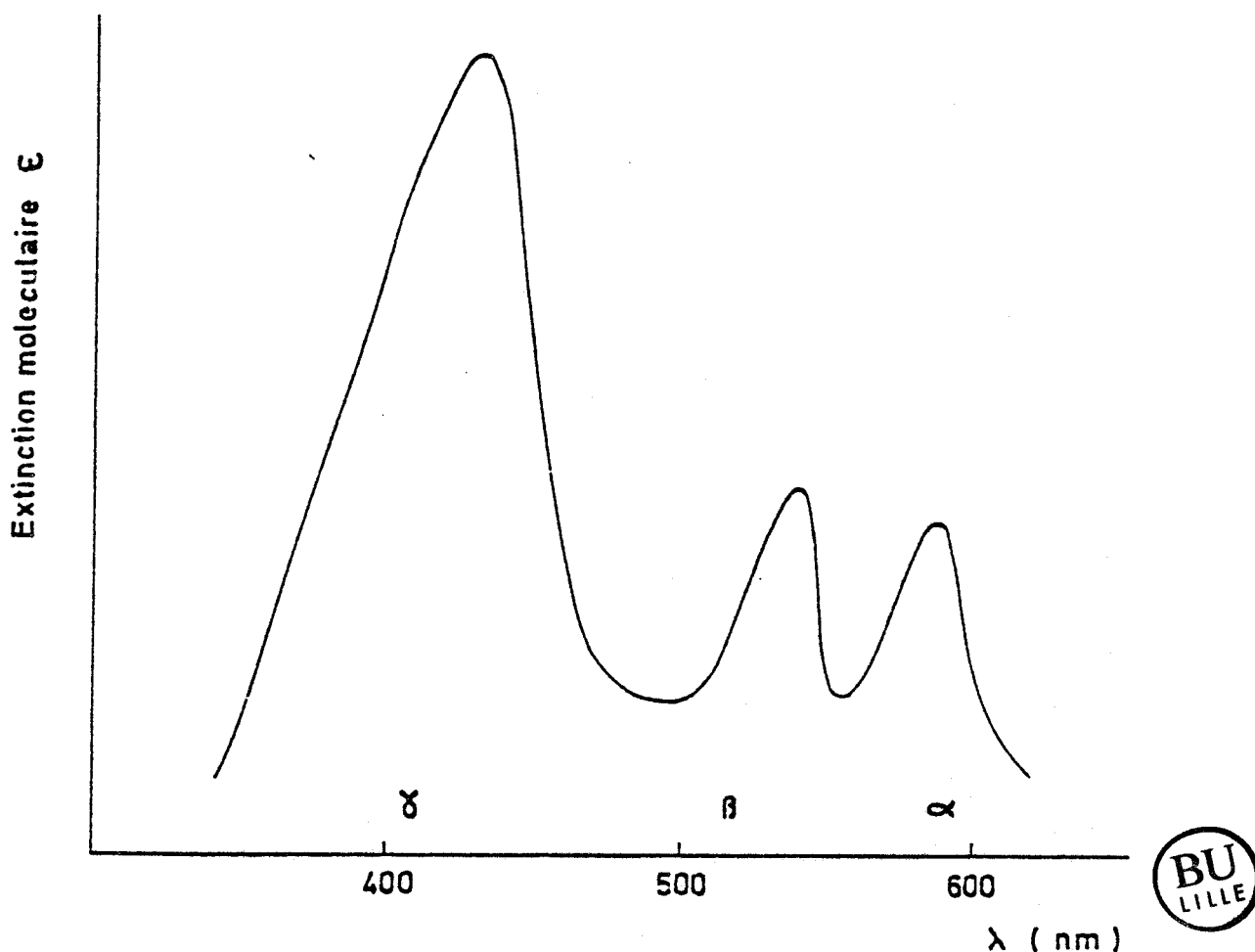


Figure III : Spectre d'absorption des porphyrines métalliques

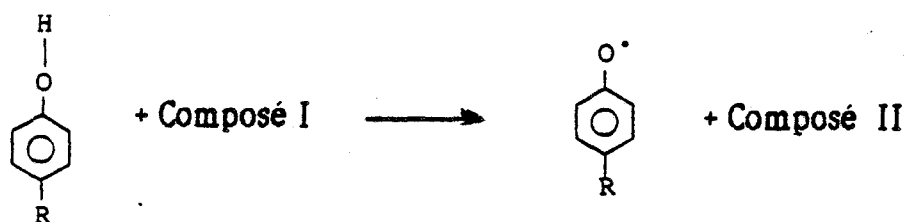
Il n'existe pas encore de modèle cristallographique d'une peroxydase végétale, mais l'alignement des acides aminés et la structure complète de deux peroxydases, l'HRPC par WELINDER (1979) et la TP 7 par MAZZA et WELINDER (1980) est connue. Il semblerait que l'hème soit attaché à la protéine par deux segments peptidiques qui tous deux

contiennent de l'histidine. La conformation structurale de la protéine serait maintenue par des liaisons calcium (OGAWA et Coll. 1979). Ces peroxydases présentent des sites actifs identiques bien que leurs structures primaires soient différentes, mais les analyses spectrales suggèrent que seulement quelques amino-acides proximaux de l'hème interviendraient dans les caractéristiques puisque les structures secondaires sont similaires.

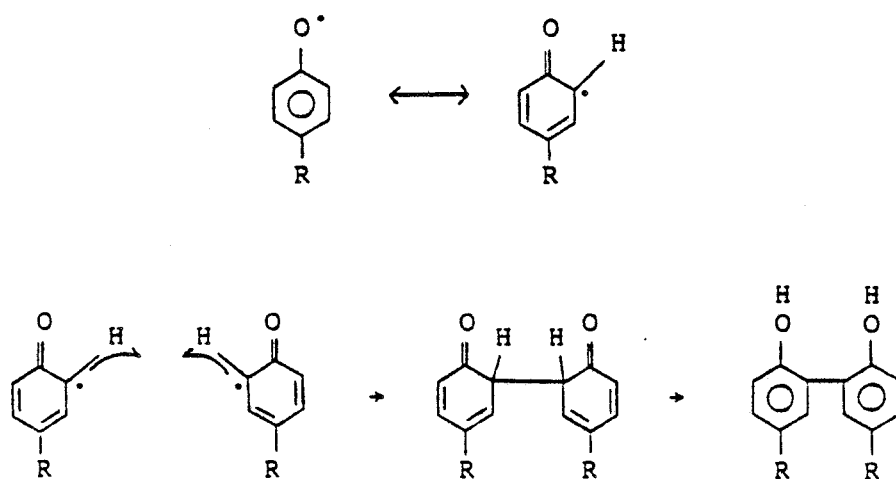
Certaines peroxydases ne présenteraient apparemment pas de composés glucidiques (POWELL et Coll., 1975 ; KIM et Coll., 1980), et l'hydroxyproline serait présente dans les peroxydases pariétales (DARIMONT et Coll., 1973) ou cytoplasmiques (SHANNON et Coll. 1966 ; MORITA et Coll., 1971).

Les peroxydases réagissent avec les peroxydes pour former des composés que l'on peut distinguer par spectrophotométrie ; les composés I et II sont formés en présence de faibles quantités de peroxyde d'hydrogène et le composé III n'apparaît qu'en présence de fortes quantités d' H_2O_2 dans le milieu réactionnel.

Dans leur cycle conventionnel les peroxydases utilisent à la fois un substrat oxydant et un composé réducteur, le premier étant généralement un peroxyde qui réagit avec l'enzyme native pour former le Composé I (MORISHIMA et Coll., 1984 ; PAUL et Coll., 1986) ; le second est souvent un phénol qui sera oxydé.

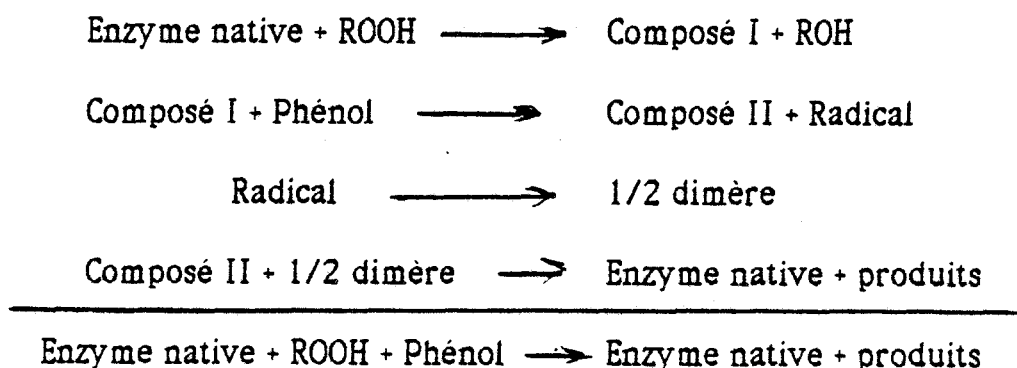


Un radical libre se forme, il peut être une source de complication pour la réaction.



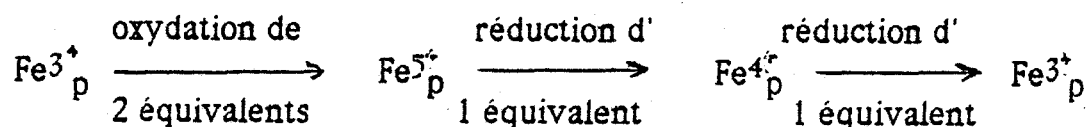
Dans l'exemple ci-contre un dimère est formé dont chaque groupe fonctionnel a une réactivité comparable au monomère d'origine. Dans ce cas l'enzyme et le phénol ne réagissent plus selon un rapport 1/1 mais le rapport est de 2/1.

Dans un but de simplification, la réaction générale s'écrira comme suit (d'après DUNFORD, 1986).



L'intérêt de cette réaction est de montrer que les composés I et II doivent être considérés comme des enzymes intermédiaires obligatoires pour une réaction enzymatique complète régénérant l'enzyme native c'est à dire la ferriperoxydase.

Les transformations de la peroxydase en ces composés sont des réactions d'oxydations et de réductions comme le montre le schéma suivant :



Le composé III est une oxyferroperoxydase, il serait formé en présence d'un excès d' H_2O_2 (KEILIN et HARTREE, 1951 ; GEORGE, 1953). Ce serait en fait un hybride entre le complexe ferropéroxydase-oxygène ($Fe^{2+}pO_2$) et la ferriperoxydase superoxyde anion ($Fe^{3+}pO_2^-$).

De nombreux rôles ont été attribués aux peroxydases. Elles sont en fait capables *in vitro* de catalyser une foule de réactions biochimiques. Elles interviennent dans l'oxydation des phénols, c'est d'ailleurs ce qui a permis leur découverte (CHODAT et BACH, 1903). En présence de quantités catalytiques de peroxyde d'hydrogène, les peroxydases peuvent favoriser l'incorporation d'oxygène dans certains polyphénols tels les chalcones (RATHMELL et BENDALL, 1972). Mais les phénols et les amines ne sont pas les seules molécules auxquelles elles peuvent s'attaquer. Elles oxydent le tryptophane, la tyrosine et certains peptides (SAUNDERS et Coll., 1964), les pyridines nucléotides NADP (YOKOTA et YAMAZAKI, 1965), le pyridoxal (HILL, 1970) et l'acide ascorbique (CHMIELNICKA et Coll., 1971). Ce dernier est à l'origine de l'absence apparente d'activité peroxydasique dans des extraits bruts de végétaux supérieurs comme le *Fragaria* (GASPAR et Coll., 1975), le *Pelargonium* (CASTILLO et Coll., 1981) ; il n'est pas un inhibiteur de la réaction enzymatique mais il empêche sa mise en évidence en réduisant au fur et à mesure les produits de la réaction. Cette propriété est à l'origine d'une technique chronométrique de dosage des peroxydases, basée sur la vitesse d'apparition de la coloration, (TORRECILLAS et Coll., 1985). Enfin les peroxydases agissent également en présence de réducteurs adéquats, comme des nitrates réductases (IVANOVA et PEIVE, 1973).

Ces différents types de réactions et la recherche de nouveaux substrats réducteurs ont été inventoriés par GASPAR et Coll. (1982). La liste en est impressionnante et contribue à compliquer le problème de la spécificité des peroxydases.

Néanmoins, les interventions possibles de ces dernières dans la dégradation de l'auxine, dans la lignification et dans le synthèse d'éthylène ont fait l'objet d'investigations approfondies et ont conduit à attribuer un rôle à ces enzymes dans certains processus physiologiques.

La dégradation de l'acide indolyl-acétique

Les très nombreuses mises au point publiées par LARSEN (1951), GORDON (1954), KENTEN (1955), BONNER (1957), RAY (1958), GALSTON et HILLMAN (1961), PILET (1961), HARE (1964), MAHADEVAN (1964), MEUDT (1964), GASPAS (1965), PILET et GASPAS (1968), enfin GASPAS et Coll., (1982) et VAN HUUSTEE (1986) montrent combien les recherches relatives au catabolisme auxinique ont intéressé les chercheurs.

Si l'intervention des peroxydases dans la dégradation de l'acide indolyl-acétique a été soupçonnée très tôt par TANG et BONNER (1947), il faudra attendre jusqu'en 1965 (YAMAZAKI et Coll.) et 1966, (RICARD et NARI) pour qu'elle soit confirmée.

A partir de la peroxydase purifiée de Raifort (GALSTON et Coll., 1953) dégradent l'AIA avec ou sans peroxyde d'hydrogène. On pouvait penser comme YAMAZAKI et Coll. (1965) que l'absence d'H₂O₂ était compensée par la formation dans le milieu réactionnel de traces de peroxyde, probablement par suite de l'auto-oxydation d'un donneur d'électrons et il ne s'agissait donc que d'une réaction de peroxydation. Mais, RICARD et NARI (1966) ont proposé un schéma (Figure IV) permettant d'expliquer la dégradation de l'AIA en absence de peroxyde introduit dans le milieu réactionnel. L'oxydation de l'hormone se réalise selon deux mécanismes différents du moins en fonction des conditions expérimentales.

Le premier serait une peroxydation typique, le peroxyde étant formé dans le milieu. La dégradation n'aurait pas lieu en présence de catalase qui détruirait l'H₂O₂ au fur et à mesure de sa formation.

Le second au contraire ferait intervenir la ferriperoxydase et le Composé III doué de réactivité vis-à-vis de l'AIA. Ce second cycle fonctionne uniquement en milieu acide, pH compris entre 3 et 4, et repose sur la réaction primaire suivante :



L'AIA réduirait donc la ferriperoxydase.

Cette réduction n'a rien d'étonnant puisqu'à PH acide l'AIA est capable de réduire différents indicateurs d'oxydo-réduction comme le bleu de méthylène ou l'hémosafranine dont le potentiel de demi-réduction est voisin de celui de la peroxydase (RICARD et NARI, 1966 et 1967). L'AIA ainsi activé décomposerait le Composé III et serait simultanément détruit (RICARD et son équipe, 1966-1970). LEE (1977) tout en confirmant le

schéma proposé par NARI, pense en contraire que le Composé III n'aurait que peu d'affinité et ne détruirait par conséquent que peu d'auxine, mais qu'il serait le passage obligatoire (Key intermediate) vers les Composés I et II plus directement impliqués dans la dégradation de l'AIA.

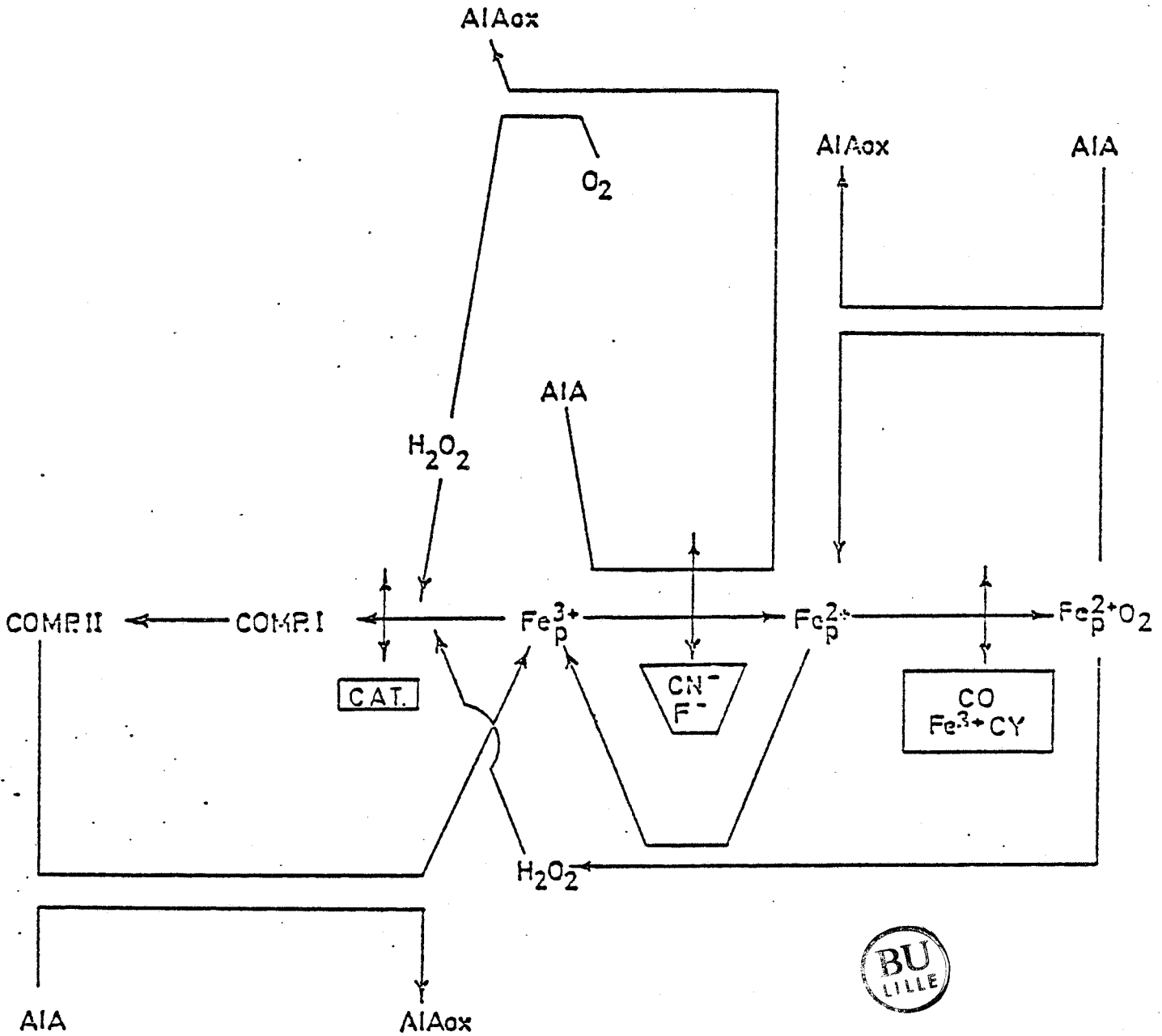


Figure IV : Schéma de RICARD et NARI (1966) proposé pour expliquer les mécanismes de la dégradation de l'AIA par la peroxydase de Raifort. Le symbole AIAox n'implique pas que les divers produits de dégradation de l'AIA, qui doivent être engendrés par suite du fonctionnement de mécanismes différents, soient identiques.

Qu'il y ait réduction par l'AIA de la ferriperoxydase ne fait aucun doute, mais le composé intermédiaire, le radical libre, quel est-il ? Pourquoi, alors que depuis longtemps, les principaux produits de "dégradation" obtenus étaient le méthylène-oxindole et l'indole-aldehyde, on démontre actuellement la présence d'autres produits comme l'indole-3-méthanol (SABATIER et Coll., 1983) ou le méthylène-indolénine (GRAMBOW et LAGENBECK-SCHWICH, 1983) dans le milieu réactionnel.

Ce qui semble bien établi actuellement est qu'auxine-oxydase et peroxydase ne sont pas deux enzymes différentes comme le soutenaient SEQUEIRA et MINEO (1966) mais qu'il s'agit d'une même enzyme ayant une double fonction catalytique probablement à partir de deux sites actifs sur la peroxydase (HOYLE, 1972), l'apoenzyme posséderait la fonction auxine-oxidasique et l'holoenzyme la fonction peroxydasique. Mais, l'arrangement spécifique et la composition du site actif de l'auxine oxydase n'ont pas encore été complètement décrits (LOBARZEWSKI et WOLSKI, 1985).

Quoiqu'il en soit, même si toute cette discussion ne permet pas d'aboutir à une explication définitive du catabolisme de l'auxine, une conclusion inéluctable et unanime, importante pour le physiologiste se dégage : la dégradation de l'AIA par la peroxydase conduira au contrôle de la concentration de l'hormone *in vivo*.

La biosynthèse de l'éthylène

Pendant longtemps on a cru que la peroxydase était impliquée dans la biosynthèse de l'éthylène à cause de quelques caractéristiques propres à la formation de l'éthylène *in vivo* telles que le besoin en oxygène (BURG, 1962), l'intervention de radicaux libres (BAKER et Coll., 1977 ; APELBAUM et Coll. 1981) et même la participation de peroxyde d'hydrogène (ADAMS et YANG, 1979).

Les travaux de LIEBERMANN et Coll. (1965) et YANG et Coll. (1967) établissaient que le principal précurseur de l'éthylène chez les végétaux supérieurs était la méthionine et YANG (1967, 1969) déclarait que l'enzyme capable de provoquer la conversion du méthional en éthylène avait les caractéristiques d'une peroxydase. La peroxydase de Raifort est capable de réaliser cette réaction. La localisation dans l'espace intercellulaire, donc entre la paroi et le plasmalemme, riche en peroxydases, de la biosynthèse de l'éthylène par MATTO et LIEBERMANN (1977) confirmait ces points de vue et permettait leur transposition *in vivo*.

Les études récentes (YANG et HOFFMAN, 1984), à partir d'éléments marqués, ont permis de préciser les différentes étapes de la synthèse de l'éthylène. Elle se ferait selon le schéma :



(SAM = S-adenosyl-méthionine ; ACC = acide carboxyl 1-amino cyclo-propane).

Il paraît douteux que la peroxydase puisse intervenir au cours des premières étapes, mais elle jouerait un rôle dans la conversion de l'ACC en éthylène.

Si MACHAKOVA et ZMRHAL (1981) déclarent que les peroxydases n'interviennent pas dans la conversion de l'ACC en éthylène ; les expériences de thigmomorphogenèse de BOYER et JAEGHER (1986) mettant en relation la synthèse d'éthylène et l'activité peroxydasique ne permettent pas de trancher et la question d'une intervention directe ou indirecte des peroxydases dans la biosynthèse de l'éthylène reste posée.

Par conséquent, très peu de résultats *in vivo* viennent confirmer ces schémas établis *in vitro*. Puisque l'apport d'auxine ou le taux d'auxine endogène influencent la synthèse d'éthylène (OSBORNE, 1978 ; DUBUCQ et Coll., 1978 ; HOFINGER et Coll., 1979) pourquoi ne pas imaginer que la biosynthèse de l'éthylène se fait pas d'autres voies enzymatiques sensibles à l'auxine et que la peroxydase n'intervient que par ses effets sur le catabolisme auxinique ?

Le processus de lignification

La participation des peroxydases aux processus de lignification a été envisagée par JENSEN (1955), SIEGEL (1956 et 1957) et FREUDENBERG, (1959). Cependant, cette contribution a été mise en doute par VAN FLEET (1959), WARDROP et BLAND (1958), KOBLITZ et KOBLITZ (1964). D'autres travaux réalisés sur des matériels expérimentaux

différents. (DE JONG, 1967 sur le xylème de *Nicotiana* et HEPLER et Coll. 1970 et 1972, sur le xylème de *Coleus*) ont abouti à des résultats contradictoires montrant que l'activité peroxydasique est plus importante dans les tissus non lignifiés que dans ceux qui le sont et que les peroxydases sont absentes dans le xylème.

Ces résultats sont donc difficiles à concilier avec les premières idées annonçant l'intervention des peroxydases dans la lignification. Ce rôle avait pourtant été démontré par LIPETZ et GARRO (1965), puis PARISH et MILLER (1969) qui réduisaient la lignification en éliminant les peroxydases liées aux parois. Pour QUOIRIN et Coll. (1974), VAN HOOF et GASPAS (1976), GASPAS et Coll. (1975 et 1977) certaines peroxydases et notamment les anodiques seraient reliées à la lignification.

Il apparaît maintenant que la conversion des phenylpropanes en matériels insolubles "lignin like substances" peut être catalysés *in vitro* par la peroxydase en présence d'eau oxygénée. ALIBERT et Coll. (1977) proposent un schéma d'organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques présenté dans la figure V.

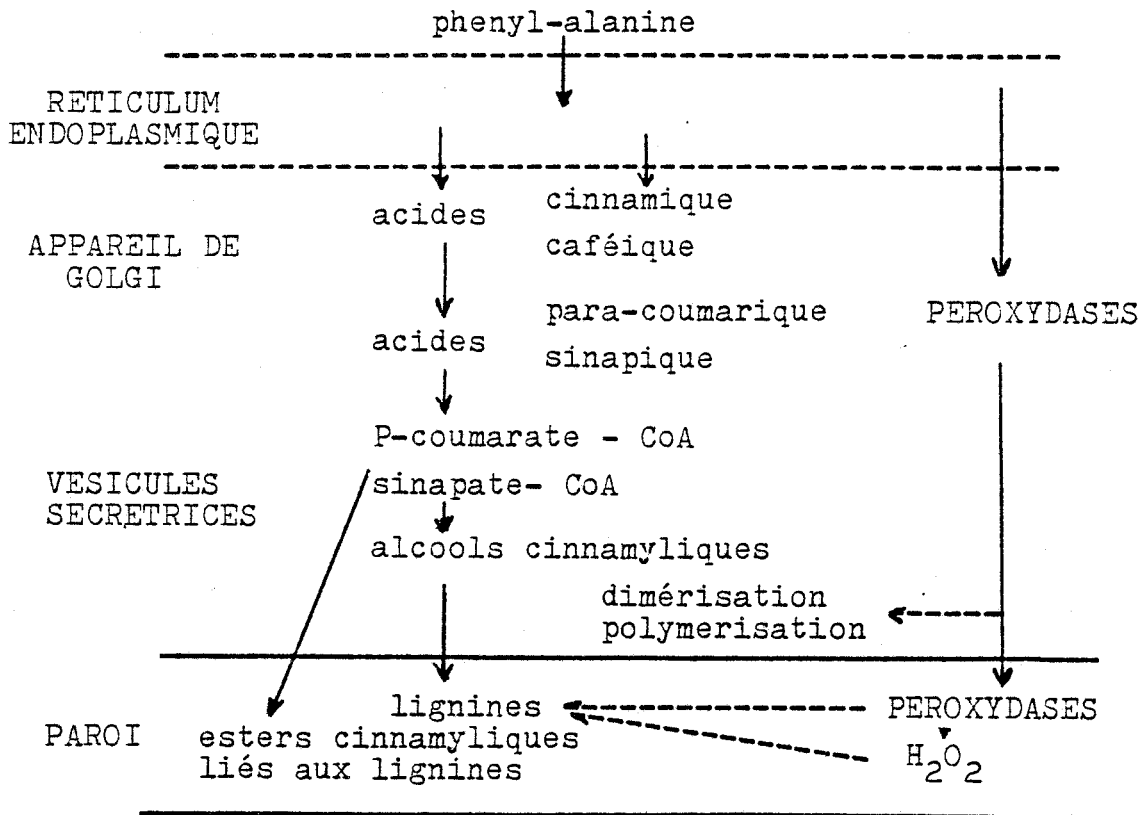


Figure V : Formation des précurseurs de la lignine et lignine dans la cellule (d'après ALIBERT et Coll., 1977).

Les peroxydases seraient responsables de la polymérisation d'unités cinnamyliques au niveau de la paroi cellulaire. Les alcools cinnamyliques se formeraient au niveau des vésicules sécrétrices. La migration des ces vésicules et leur fusion au contact de la paroi aboutiraient à l'élaboration de la lignine. Un début de polymérisation pourrait se produire au niveau même des vésicules pendant le transport par l'intermédiaire des peroxydases. Les peroxydases pariétales participeraient enfin à la polymérisation *in situ*.

HALPERIN et MINOCHA (1973) avaient déjà observé des modifications qualitatives et quantitatives de ces peroxydases dans les parois cellulaires, modifications liées à une augmentation de la synthèse de lignine. La peroxydase interviendrait donc dans les toutes dernières étapes de la biosynthèse de la lignine c'est-à-dire au cours de la polymérisation oxydative des alcools cinnamyliques et aussi dans la biogénèse de l' H_2O_2 nécessaire aux réactions de peroxydation (GROSS et Coll., 1977) (Figure VI).

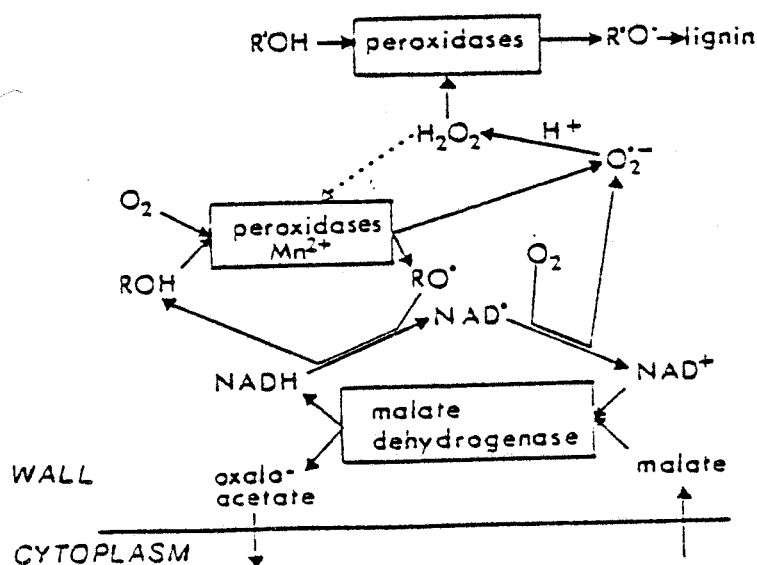


Figure VI : Formation de peroxyde d'hydrogène dans les parois des végétaux supérieurs (d'après GROSS et Coll., 1977).

L'avantage de la localisation de la formation de l'eau oxygénée dans la paroi, donc au niveau du site de production de la lignine, est d'éviter un transport dans le cytoplasme d' H_2O_2 toxique.

CATESSON et Coll. (1978), FLEURET et DELOIRE (1982) ont montré que la syringaldazine, un donneur de protons, avait une très grande affinité pour les peroxydases liées aux parois des cellules en cours de

lignification. La réactivité de la syringaldazine avec les peroxydases est très supérieure à celle du gaïacol tout au moins pour certaines isoenzymes (GRISON et PILET, 1985). Il existe donc une syringaldazine-oxydase dont l'activité n'est pas décelée dans les tissus qui ne sont pas en train de se lignifier (CATESSON et Coll., 1986)

L'intervention des peroxydases dans les processus de lignification a été de plus démontrée par les études sur la vitrification (KEVERS et Coll., 1984, 1985). Cette vitrification se caractérise, entre autre, chez les tissus cultivés *in vitro*, par une lignification défectueuse des vaisseaux et des trachéides. Mais si pour d'autres processus physiologiques impliquant la lignification, le degré de celle-ci était bien corrélé avec les activités de la plupart des peroxydases anodiques, il apparaît que les tissus "vitrifiés" présentent une activité gaïacol-péroxydase plus forte que celle des tissus normaux, mais, qu'au niveau des parois, l'activité syringaldazine-oxydase est plus faible dans ces derniers. Il ne s'agit pas d'une perte d'activité peroxydasique mais d'une régulation d'une activité spécifique dont les mécanismes restent encore à démontrer.

Tout ce qui précède montre que le rôle des peroxydases n'est pas encore exactement défini bien que de nombreux travaux leur soient consacrés. Les résultats obtenus indiquent que les réactions catalysées par ces enzymes ne sont pas uniquement des réactions de peroxydation ce qui reviendrait d'ailleurs à ne reconnaître aucune fonction physiologique des peroxydases sauf un rôle de détoxication en peroxyde des cellules qui n'en renferment généralement que de très faibles quantités, mais qu'on peut leur attribuer des réactions d'oxydation et d'oxygénation et par conséquent envisager leur participation à des processus physiologiques.

La distribution des peroxydases au niveau cellulaire a été démontrée par leur localisation dans de nombreux organismes. A l'intérieur des cellules, les peroxydases sont situées dans le cytosol (WISE et MORRISON, 1971), dans les vacuoles (HALL et SEXTON, 1972 ; PARISH, 1975 ; SCHLOSS et Coll., 1987), les lysosomes (PLENISCAR et Coll., 1967). Leur présence dans les peroxysomes (POUX, 1972), les mitochondries (PARISH, 1972), les ribosomes (PENON et Coll., 1970 ; DARIMONT et BAXTER, 1973) et les chloroplastes (IVANOVA et Coll., 1970), ainsi que leur association aux chromosomes, aux nucléoles (RAA, 1973) et aux ribonucléoprotéines (MATSUSHITA et IBUKI, 1960) ne sont pas admises de façon unanime.

En revanche, l'association des peroxydases aux parois (RIDGE et OSBORNE, 1970 ; DARIMONT et Coll., 1973 ; PARISH, 1975 ; PENEL et GREPPIN, 1979 ; CATESSON et Coll., 1986) et aux membranes (CZANINSKI et CATESSON, 1969 ; Van der MAST, 1970 ; HAARD, 1973 ; DARIMONT et Coll., 1977 ; GOLBERG et Coll., 1986) ne fait pas de doute.

Ces résultats sont en accord avec le fait que les peroxydases sont supposées être des glycoprotéines secrétées (AKAZAWA et HARANISCHIMURA, 1985 ; MADER et WALTER, 1986) qui sont synthétisées, glycosylées et transportées dans le cytoplasme, probablement par le réticulum endoplasmique rugueux (Van HUUSTEE et TURCON, 1973) et sont finalement secrétées dans l'espace extra cytoplasmique.

Généralement les peroxydases se présentent sous différentes formes moléculaires : les isoperoxydases. Celles-ci peuvent être séparées par les moyens classiques de séparation des protéines. En fait les isoenzymes peroxydasiques facilement détectables et très répandues ont été plus étudiées que les autres isoenzymes végétaux (SCANDALIOS, 1974).

Jusqu'à présent la majorité des études étaient purement descriptives et les interprétations des résultats n'ont pas contribué à une clarification du rôle des peroxydases. Si celles-ci sont présentes dans toutes les parties de la plante, elles sont souvent mieux représentées dans les racines, les épidermes et les tissus conducteurs. On sait que l'activité peroxydasique et que le nombre des isoperoxydases peuvent varier pour une même plante selon l'organe considéré et pour un même organe il peut y avoir modification de l'activité et remaniement du profil isoperoxydasique liés à différents stress.

Le nombre d'isoperoxydases trouvées dépend largement des techniques de séparation et de révélation utilisées. Aussi, actuellement, sans tenir compte du nombre d'isoperoxydases présentes, on les regroupe en deux grandes catégories liées à leur mobilité électrophorétique, on considère alors les peroxydases anodiques ou acides et les peroxydases cathodiques ou basiques. Cette distinction permet d'apporter un élément de réponse sur la nature constitutive ou adaptative des peroxydases. L'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse protéique qui ne bloquent pas l'augmentation des peroxydases basiques consécutive à une réponse physiologique et, l'incorporation rapide d'acides aminés marqués dans les isoperoxydases acides et pas dans les isoperoxydases basiques laissent

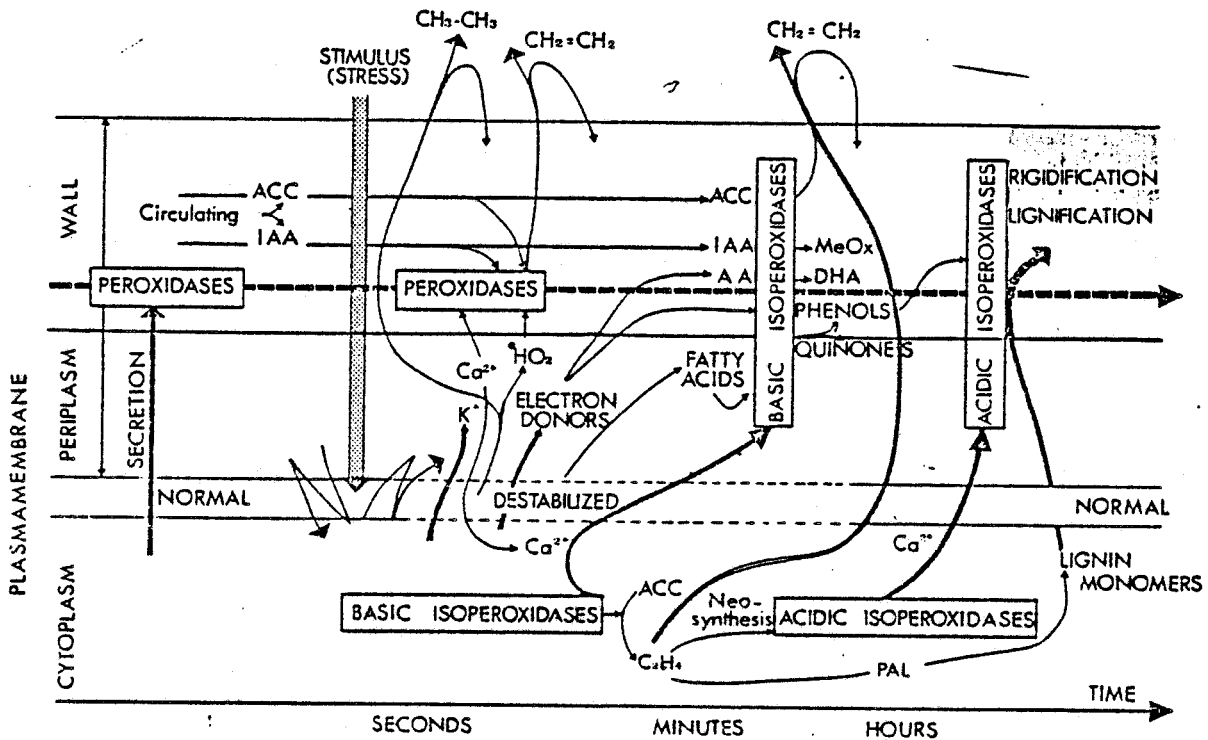


Figure VII : Suggestion des voies communes de réactions dans quelques compartiments cellulaires en réponse à différents stimuli physiques ou chimiques (Flèches verticales).



Ce schéma montre deux niveaux de contrôle des peroxydases basiques et acides et leur rôle interdépendants dans la lignification et la rigidification de la paroi par l'intermédiaire de l'éthylène.

L'échelle du temps étant représentée par la flèche au bas de la figure.

supposer que les premières, les acides donc, sont synthétisées en réponse à un stimulus alors que les secondes, c'est-à-dire les basiques sont constitutives. L'activité des ces dernières n'apparaîtrait que parce que les stimuli agiraient sur les inhibiteurs qui masquent cette activité.

Mais le démasquage des activités des isoperoxydases basiques n'est pas le seul fait de levée d'inhibitions, le transport des peroxydases vers leur site d'action peut aussi être considéré comme un contrôle de l'activité peroxydasique (PENEL et Coll., 1984). Notamment l'augmentation rapide de l'activité des peroxydases basiques dans l'espace intercellulaire serait liée à une sécrétion active des peroxydases sous contrôle du contenu intracellulaire en Ca^{2+} (GASPAR et Coll., 1985).

Ces deux grands groupes de peroxydases auraient des fonctions différentes dans la plante. Il semble donc que le catabolisme auxinique et peut être la conversion de l'ACC en éthylène seraient impartis aux isoperoxydases basiques, alors que les peroxydases acides interviendraient dans les dernières étapes de biosynthèse de la lignine du fait de leur plus grande affinité avec la syringaldazine. Mais, pour que cette affirmation soit confirmée, il faudrait démontrer qu'un monomère de la formation de la lignine soit capable de réagir avec les composés I ou II.

Le schéma ci-contre, emprunté à GASPAR et Coll. (1985) montre bien la dualité et les voies communes des réactions en fonction des différents stimuli, (Figure VII).

Le métabolisme présenté dans ce schéma peut être appliqué aux processus généraux de croissance.

MATERIEL ET TECHNIQUES

I - LE MATERIEL VEGETAL

La Chicorée de Bruxelles (*Cichorium intybus*), encore appelée WITLOOF, mot signifiant feuille blanche en néerlandais, est une astéracée bisannuelle.

C'est vers le mois de septembre que, dans notre région sont récoltées les plantes issues du développement des graines semées en mars-avril. Les feuilles sont alors sectionnées au niveau du collet et les racines sont soumises au forçage. La température de forçage voisine de 18° C provoque la reprise de l'activité végétative et se développent alors des bourgeons étiolés qui, récoltés, sont commercialisés sous le nom d'Endive, l'appellation "chicon" étant spécifique du Nord de la France et de la Belgique. Les feuilles de ces bourgeons ont un limbe peu développé et présentent une nervure centrale, large et charnue. C'est dans ces feuilles que nous avons prélevé le matériel végétal pour nos expériences.

II - LA CULTURE *IN VITRO*

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

II.1. - La mise en culture

Les feuilles étiolées, soigneusement sélectionnées, sont, sans aucun lavage préalable, immergées dans une solution aqueuse d'hydrochlorite de calcium (215° Chlorométrique) à 70 g l⁻¹. Cette opération a pour but de détruire les microorganismes, bactéries et champignons, se trouvant à la surface des feuilles. Il a été vérifié (VASSEUR, 1965), que l'antiseptique ne lésait pas les épidermes. Les feuilles sont ensuite lavées par trois bains successifs d'eau distillée stérile de 5, 10 et 15 minutes.

Des disques de 16 mm de diamètre sont alors prélevés dans la nervure centrale des feuilles à l'aide d'un emporte-pièce. Les explantats à raison d'un par tube de culture (Ø 21 mm) sont déposés horizontalement, la face ventrale ou interne au contact du milieu nutritif. Ce dernier, préalablement stérilisé par passage à l'autoclave pendant 20 minutes à 110° C (0,5 bars) comprend, dans sa composition de base (MB), les sels minéraux de la solution de KNOP (1884) diluée au demi, du glucose à 30 g l⁻¹ et de la gélose à 0,9 % pour le solidifier. Les modifications apportées dans la composition de ce milieu seront signalées chaque fois qu'il sera nécessaire.

Après la mise en culture, les tubes sont individuellement recouverts par une feuille d'étain qui évite la dessiccation des milieux.

II.2. - Conditions expérimentales

Les expériences se rapportant à l'action de la température et de la lumière polychromatique (lumière blanche) sont conduites dans des chambres climatisées. Il s'agit de pièces isothermes dont la température peut s'échelonner de 5° à 40° C + 1°. Afin d'éviter un gradient de température entre le plafond et le plancher des pièces, l'air de celles-ci est brassé par un ventilateur. Dans ces enceintes éclairées par des tubes luminescents ("OSRAM" Lumière du jour de Luxe) la photopériode est programmée par une horloge, l'intensité de l'éclairage est ajustée en rapprochant plus ou moins les tubes de culture de la source lumineuse. Lorsque les cultures sont maintenues à l'obscurité, elles sont entreposées dans des boîtes en bois dont l'étanchéité à la lumière a été soigneusement vérifiée.

Les expériences se rapportant à l'effet de la qualité de la lumière sont réalisées dans des pièces spéciales, réglées à 25° C et éclairées par des lumières relativement monochromatiques rouge (665 nm), verte (530 nm) ou bleue (460 nm), pendant toute la durée de l'expérience. Les éclairages que nous avons utilisés sont fournis par des tubes luminescents colorés (Philips) associés à des filtres "Rohm et Haas" permettant de supprimer les radiations marginales indésirables. Les caractéristiques des tubes et des filtres ainsi que les résultats des analyses de la lumière transmise, mesurée à l'aide d'un spectroradiomètre Isco modèle SR sont indiqués dans la figure 1.

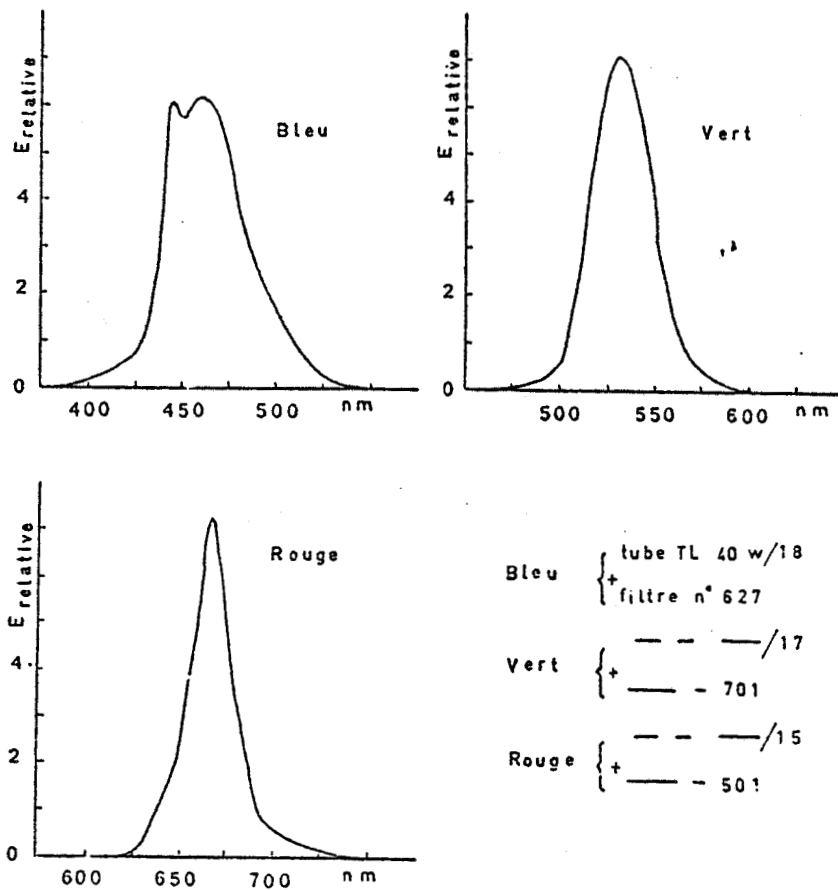


Figure 1: Spectres des lumières transmises, approximativement monochromatiques (d'après DUBOIS, 1980).

III. - CRITERES DE CROISSANCE ET EVALUATION DU BOURGEONNEMENT

La mesure de la croissance des explantats est exprimée par différents critères : le poids de matière fraîche (MF.), le poids de matière sèche (M.S.) et la teneur en protéines.

La matière sèche est obtenue après congélation des explantats dans l'azote liquide et lyophilisation pendant 48 heures.

Connaissant le poids de matière sèche on peut déterminer le pourcentage en eau des tissus de feuille d'après la formule :

$$\% \text{ EAU} = \frac{\text{MF.} - \text{M.S.}}{\text{MF.}} \times 100$$

Le développement des tissus de feuille étiolée cultivés *in vitro* se traduit par l'apparition, à la base de l'explantat, d'un cal au sein duquel naissent les nodules méristématiques à l'origine des bourgeons. Dans nos conditions expérimentales, l'apparition des ébauches gemmaires se situe aux environs du dixième jour, mais elle peut se poursuivre jusqu'au vingt cinquième jour. Nous avons alors choisi d'évaluer le bourgeonnement par dénombrement des bourgeons après 40 jours de culture et considéré comme bourgeon toute ébauche caulinaire dont la taille est supérieure ou égale à 2 mm. Parfois et assez tardivement vers le 30ème jour des racines apparaissent, elles naissent souvent à la base des bourgeons néoformés .

Sur une série expérimentale de 24 explantats, tous ne reprennent pas et parmi ceux qui donnent un cal tous ne présentent pas d'organogénèse. Nous avons calculé le nombre moyen de bourgeons formés par explantat en divisant le nombre total de bourgeons comptés dans un lot par le nombre d'explantats ayant proliféré. Parfois nous avons fait figurer dans les tableaux de résultats une deuxième valeur, le pourcentage de bourgeons apparus dans la région apicale de l'explantat, région facilement repérable puisqu'elle ne présente pas de cal. Cette deuxième valeur permet d'apprécier l'effet de certains facteurs sur l'expression de la polarité par les tissus de feuille.

Chaque lot comporte 24 explantats et chaque essai est répété au moins deux fois. Nos résultats sont souvent discutés dans le cadre de chaque série d'essais et les valeurs rapportées sont celles d'une expérience donnée pour éviter l'écueil dû à la variabilité du matériel biologique. En effet, il faut souligner que le pouvoir morphogénétique des tissus varie au cours de l'année ce qui rend difficile les moyennes. Enfin pour un essai, il est possible de réduire les variations en distribuant les explantats de façon aussi homogène que possible dans les différents lots.

IV. - TECHNIQUES D'ANALYSES

IV.1. - Analyse des protéines et dosage de l'azote

POUDRE VEGETALE + Acide trichloracétique (ATC) 5% ,(5ml/100mg.)
O U

EXTRAIT ENZYMATIQUE BRUT + ATC 10% (v/v)

Homogénéisation-Extraction 12h. 4°C

Centrifugation 10.000g, 10 min.

Surnageant (S) éliminé Culot + ATC 5%

Centrifugation 10.000g, 10 min.

S. éliminé Culot + Ethanol saturé en acétate de Na
Centrifugation 10.000g, 10 min.

S. éliminé Culot + Ethanol absolu

Centrifugation 10.000g, 10 min.

S. éliminé Culot + Ethanol (3v) + Ether (2v) +
Chloroforme (1v) .
Centrifugation 10.000g, 10 min.

S. éliminé Culot + Ether 100%
Centrifugation 10.000g, 10 min.

S. éliminé CULOT +
NaOH 1N.
12 h. 30°C Tubes bouchés.

Centrifugation 10.000g, 10 min.

Culot + Surnageant (S₁) recueilli
eau distillée
Centrifugation 10.000g, 10 min.

Culot éliminé. Surnageant (S₂) recueilli

Concentration finale en
NaOH 0,1 N.

PLANCHE I

Protocole d'extraction des protéines.



IV.1.1. - Extraction et dosage des protéines.

Les tissus lyophilisés sont pulvérisés dans un broyeur à billes et les protéines sont extraites de ces poudres. la méthode d'extraction, résumée dans la planche I comporte de nombreuses étapes qui sont toutes nécessaires pour l'obtention de protéines débarassées de tout agent contaminant pouvant interférer dans le dosage. Les protéines sont précipitées par l'acide trichloracétique, l'acidité du culot de centrifugation est neutralisée par l'éthanol saturé en acétate de Na. Ce dernier est éliminé par l'emploi d'éthanol absolu, suivi d'une dissolution des pigments dans le mélange éther-chloroforme-éthanol. Enfin le culot est lavé à l'éther ce qui permet un séchage rapide. On ajoute alors, au culot sec, de la soude 1 N pour dissoudre les protéines. Au cours des essais pour la mise au point de cette technique nous avons constaté que la concentration finale de soude dans les extraits doit être impérativement égale à 0,1 N. Si on ne tient pas compte de cette remarque les résultats ne sont pas reproductibles.

La teneur en protéines est mesurée selon la méthode de LOWRY et Coll. (1951). Cette méthode colorimétrique combine la méthode du BIURET (formation d'un composé coloré par la réaction de l'ion cuivrique et d'un polypeptide en milieu alcalin) et le réactif de FOLIN-CIOCALOTEU (réaction de l'acide naphthoquinone sulfonique avec les protéines en milieu alcalin). La coloration produite (absorption à 500 nm ou 750 nm) est proportionnelle à la teneur en protéines. Celles-ci est alors évaluée par référence à une courbe étalon (Figure 2) établie avec de la serum albumine bovine.

Suivant la concentration en protéines de l'extrait LOWRY préconise de travailler à 500 ou 750 nm. Nous pouvons constater (figure 2) que les valeurs de D.O. obtenues sont toujours supérieures pour la longueur d'onde 750 nm quelle que soit la concentration en protéines. C'est donc cette longueur d'onde que nous avons retenue pour tous nos dosages de protéines. De plus, l'examen de la figure 2 montre que la densité optique augmente proportionnellement pour des concentrations en serum albumine variant de 0 à 200 ug. Pour des quantités plus fortes la pente de la droite s'infléchit légèrement. Il est donc nécessaire, afin d'éviter les résultats par défaut, de diluer les extraits trop riches en protéines.

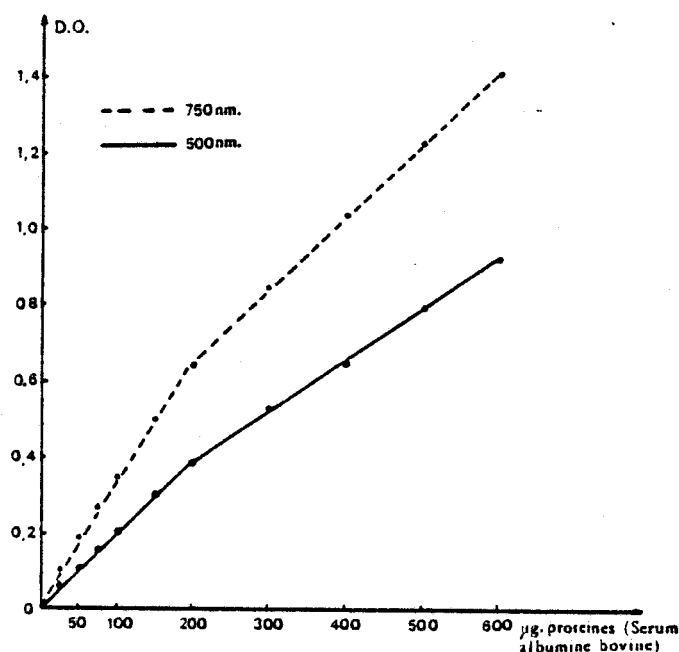


Figure 2 : Courbe d'étalonnage en fonction de la concentration en sérum albumine bovine dans le mélange réactionnel.

IV.1.2. - 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 (CuSO_4 : 1 partie ; K_2SO_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 complétée 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 minéralisation comporte un témoin (sans azote) et des matras contenant des quantités connues d'azote sous forme de sulfate d'ammonium (de 500 à 3 000 μg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). on trace alors une courbe étalon qui permet de calculer les quantités d'azote obtenues 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°-4° 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.

IV.2. - Mesure des activités enzymatiques

IV.2.1. - Extraction des enzymes

L'extraction des enzymes, peroxydase, catalase et auxine-oxydase est réalisée à partir du matériel végétal frais ou lyophilisé.

Le matériel frais est congelé brutalement par immersion dans l'azote liquide. Le broyage des tissus, toujours en présence d'azote liquide, se fait dans un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Cette technique a l'avantage d'éviter l'utilisation de sable lavé aux acides dont la pureté n'est pas toujours contrôlable et aussi, elle évite, du fait de la température extrêmement basse, toute oxydation du matériel pendant le broyage. Elle présente néanmoins un inconvénient lié à la récupération intégrale du matériel pesé avant le broyage et elle est également source d'erreurs s'il n'est pas tenu compte de l'hydricité des tissus.

Le matériel lyophilisé est pulvérisé à l'aide d'un broyeur à billes. La poudre sèche, facilement maniable, est alors prélevée en quantités précises.

Une fraction de la poudre obtenue, soit à partir de matériel frais, soit à partir de matériel lyophilisé, est alors mise en suspension dans la solution tamponnée de phosphate monopotassique et dissodique, pH 6,8, à 1/15 molaire. L'ensemble est homogénéisé pendant 30 secondes puis abandonné 20 minutes à 4° C pour extraction.

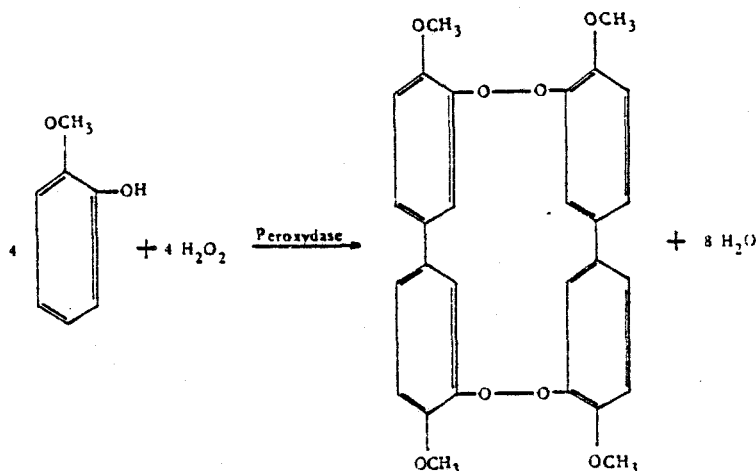
L'homogénat est alors centrifugé à 10000 g pendant 10 minutes à la température de 4° C ; le surnageant, dont le volume recueilli est soigneusement mesuré, constitue l'extrait enzymatique brut.

On sait que par cette méthode de nombreuses protéines enzymatiques (hydrosolubles) sont extraites. Mais également, puisque les peroxydases sont plus ou moins liées avec les différents constituants cellulaires, leur solubilité varie en fonction de ce degré de liaison (LEE, 1973). Nous étudierons ultérieurement cette caractéristique par modification de la force ionique du tampon d'extraction.

IV.2.2. - Mesure de l'activité peroxydasique

L'oxydation des phénols et des amines aromatiques aboutit à la formation de produits colorés qui permettent par des mesures colorimétriques d'apprécier l'activité peroxydasique.

Les donneurs d'électrons les plus utilisés sont le pyrogallol (WILLSTATER et STOLL, 1918), la benzidine (VAN DUIJN, 1955) et le gaïacol (LANCE, 1963). Il faut éviter les interférences avec d'autres enzymes et par exemple l'emploi de pyrogallol comme donneur d'électrons n'exclut pas la possibilité de l'oxydation de ce réactif par les polyphénoloxydaes lorsqu'elles sont hydrosolubles. C'est pourquoi, LANCE préconise l'utilisation du gaïacol. La réaction est la suivante :



L'activité peroxydasique est déterminée par spectrophotométrie dans un mélange d'incubation de 10 ml contenant 6,9 ml de tampon phosphate K-Na (pH 6,1) à 1/15 M, 2 ml de gaïacol (solution 1 %); 1 ml d'H₂O₂ (0,2 vol) et 0,1 ml d'extrait enzymatique.

L'activité peroxydasique est exprimée par la variation de densité optique (D.O.), lue à 420 nm, des mélanges, après 5 minutes d'incubation, rapportée à différents critères, le poids frais, le poids sec ou la teneur en protéines des extraits. Dans ce dernier cas, il s'agira d'activité spécifique. Le dosage des protéines dans les extraits s'inspirant essentiellement de la méthode décrite (Planche I).

IV.2.3. - Electrophorèse pour la séparation des isoperoxydases.

Nous avons utilisé l'electrophorèse en gel d'amidon mise au point par SMITHIES(1955). C'est une méthode de séparation des protéines à grand pouvoir de résolution, la dénaturation des protéines y est minimale et les échantillons liquides sont directement introduits dans le gel et il n'est pas nécessaire d'avoir recours à un milieu qui peut provoquer des phénomènes d'électrodécantation. La migration des protéines dans les gels peut être visualisée par différents procédés de coloration on obtient alors des électrophorégrammes.

Pour la séparation des isoenzymes peroxydasiques, nous avons utilisé la techniques de SCOPES (1968), adaptée par DARIMONT et GASPAR (1972). Avec les solutions tampons décrites ci-dessous, l'intensité du courant est de 30 mA au moment de l'application de 400 V au système, elle chute à 20 mA après 90 minutes, durée moyenne d'une electrophorèse.

Le gel externe contient 33 g d'amidon pour electrophorèse (Starch H. BDH) dans 300 ml de tampon. Le gel interne contient 25,3 g d'amidon et 9,3 g d'urée dans 200 ml de tampon. L'urée donne au gel une

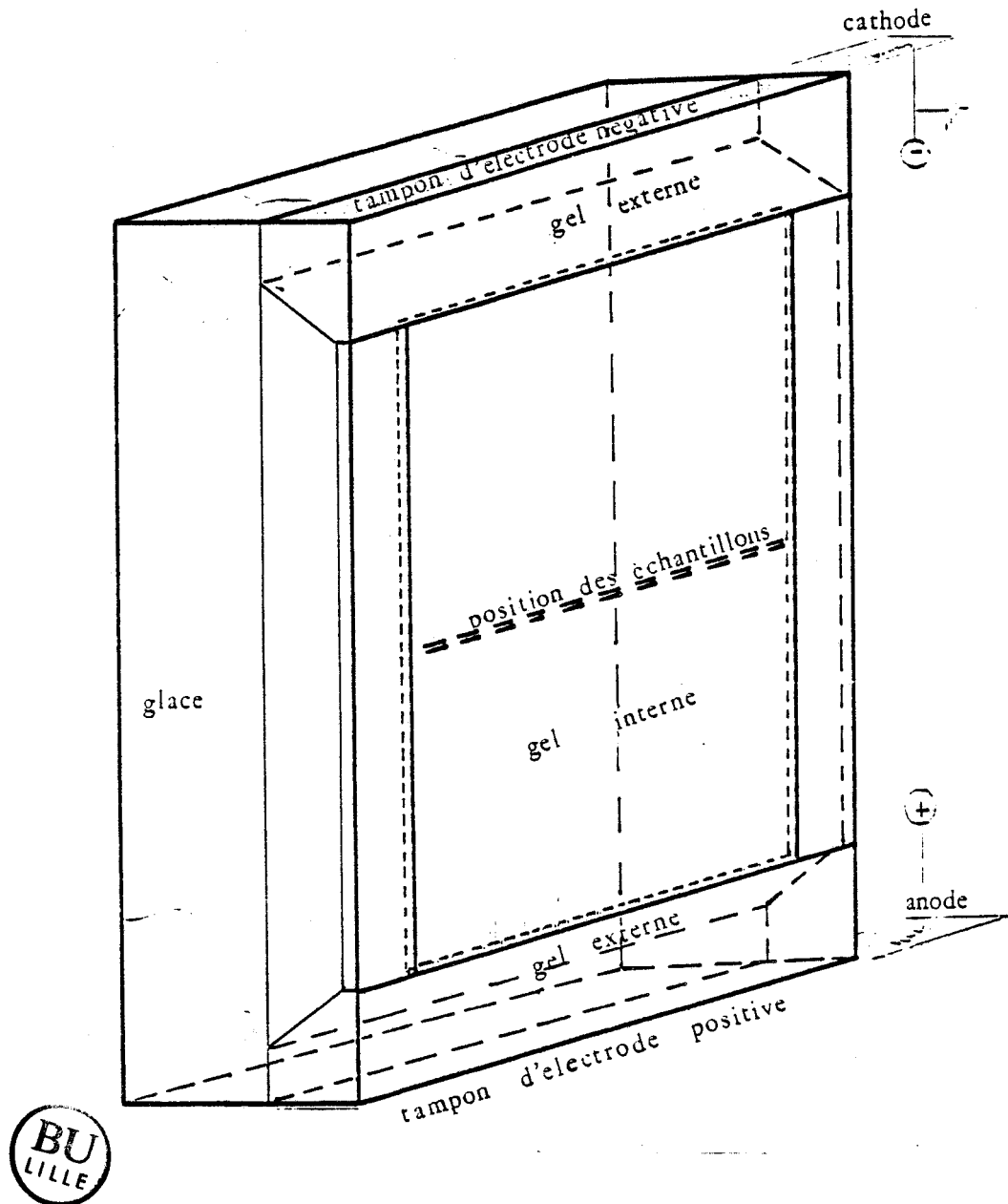


Figure 3 : Schéma du système utilisé pour l'électrophorèse verticale.

plus grande consistance, et employée à 0,8 Mol l⁻¹ elle n'altère pas la migration des protéines.

Tampon cathodique : pH 8,4 0,2 M acide borique
0,05 M NaOH
0,05 M NaCl

Tampon anodique : pH 8,4 0,1 M Tris
0,25 M H₂SO₄

Tampon gel externe : pH 8,4 0,1 M acide borique
0,6 M Tris

Tampon gel interne : pH 8,4 3 mM H₃PO₄
0,1 mM Na₂EDTA
15 mM Tris

Les gels sont préparés en mélangeant les produits à la solution tamponnée. La suspension blanchâtre est chauffée en agitant vigoureusement jusqu'à épaissement, le contenu est ensuite dégazé pendant une minute au moyen d'une pompe à vide et la solution visqueuse devenue transparente est ensuite rapidement coulée dans les compartiments respectifs de la cuve à électrophorèse (Figure 3).

Immédiatement après le coulage du gel interne, on dépose en son milieu un "peigne" comportant 10 lames métalliques qui ménageront des fentes destinées à recevoir les différents échantillons. Ces fentes peuvent recevoir jusqu'à 30 µl d'échantillon qui sont déposés à la micropipette. Une fente est réservée au vert de bromocrésol 1 % qui migre avec le front d'électrophorèse. Le vert de bromocrésol se divise en deux taches, lorsque la plus anodique a atteint l'extrémité du gel interne, l'électrophorèse est arrêtée.

Après démoulage, le gel est coupé en deux dans le sens de l'épaisseur. Les moitiés ainsi obtenues sont révélées par le mélange gaiacol-H₂O₂ ou benzidine-H₂O₂.

Sur les dessins des électrophorégrammes, l'intensité des bandes est représentée conventionnellement suivant le schéma :



Gamme arbitraire des intensités croissantes des bandes, donc des activités croissantes, des isoperoxydases.

IV.2.4. - Mesure de l'activité auxine-oxydasique

La technique utilisée s'inspire de celle décrite par PILET (1957). L'activité auxine-oxydasique est mesurée à 25° C. La réaction est démarrée par adjonction du substrat, c'est-à-dire 2 ml d'une solution aqueuse d'acide indolyl-acétique ($175 \mu\text{g ml}^{-1}$) au mélange réactionnel comprenant :

(6 - x) ml de tampon phosphate pH 6,1
 1 ml de 2,4 dichloriohenol 10^{-3} M
 1 ml de MnCl_2 10^{-3} M

Le volume final est de 10 ml et x représente le volume d'extrait employé.

Après 15, 30, 60 et/ou 90 minutes d'incubation, à l'obscurité, sous agitation, une aliquote de 2 ml est prélevée et ajoutée à 8 ml de réactif de SALKOWSKI, préparé selon PILET (1957) Ce réactif va réagir avec l'AIA non détruit pour donner une coloration rouge, qui sera alors mesurée au photolorimètre à 535 nm. La D.O. lue, défalquée de celle obtenue par addition d'une aliquote de 2 ml, prélevée 30 secondes après le démarrage de l'incubation, à 8 ml de réactif de Salkowski, permet de calculer la quantité d'AIA détruit. L'activité auxine-oxydasique est alors exprimée en μg d'AIA détruit, en une heure, par unité du critère de référence choisi : poids de matière fraîche, de matière sèche ou teneur en protéines de l'extrait.

IV.2.5. - Mesure de l'activité catalasique

La catalase utilise le peroxyde d'hydrogène à la fois comme substrat et comme donneur d'électrons. C'est elle qui empêche l'empoisonnement des tissus en détruisant l' H_2O_2 formée.

Pour le dosage de l'activité catalasique nous avons utilisé la méthode que nous avons mise au point (LEGRAND, 1969) employant le perborate de sodium comme source d'eau oxygénée (FEINSTEIN, 1949).

Dans des tubes à essais, plongeant dans un bain-marie à 37° C, on introduit 8 ml de $NaBO_3 \cdot 4H_2O$ à 1,5 % et pH 6,8, (2 - x) ml de tampon phosphate Na-K (1/15 M) et x ml d'extrait enzymatique. Après 5 minutes d'incubation la réaction est bloquée en ajoutant 5 ml d' H_2SO_4 10 %.

Le perborate restant est dosé par le MnO_4K (N/10) et l'activité catalasique est exprimée en milliéquivalents de Na détruit rapporté à l'unité du critère de référence choisi.

IV.3. - Dosage et analyse qualitative des phénols

IV.3.1. - Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques pour l'analyse quantitative se fait par épuisement des poudres lyophilisées en milieu acide. Pour cela, 100 mg de poudre sont homogénéisés dans l'appareil de Potter-Elvehgem avec 5 ml de HCl 0,1 N. L'homogénat abandonné 30 minutes pour extraction à la température de 20° C est centrifugé pendant 10 minutes à 10000 g. Le culot de centrifugation resuspendu dans un même volume de solution acide est lavé une deuxième puis une troisième fois. Nous avons vérifié qu'après le deuxième lavage la totalité des phénols était déjà extraite.

L'extraction des composés phénoliques pour l'analyse qualitative se fait par épuisement des poudres lyophilisées en présence de

méthanol dans l'appareil de Soxhlet. Les extraits obtenus sont concentrés sous vide.

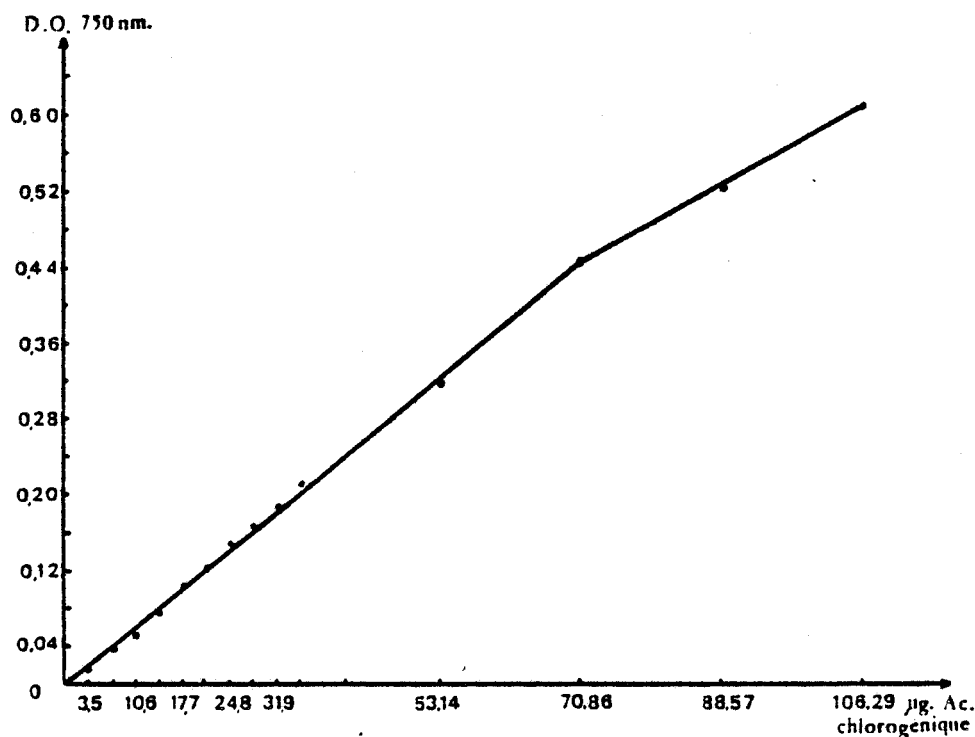


Figure 4 : Courbe d'étalonnage en fonction de la concentration en acide chlorogénique dans le mélange réactionnel.

IV.3.2. - Chromatographie et dosage

Les extraits méthanoliques sont chromatographiés sur papier Whatmann 3MM dans le mélange n-butanol, acide acétique, eau (4.1.5) et identifiés par comparaison avec des produits purs.

Les surnageants acides recueillis et leur volume ajusté à 50 ml, sont utilisés pour le dosage des phénols totaux. Une aliquote de 0,5 à 1,5 ml complétés à 7,5 ml avec de l'eau distillée est mélangée à 0,5 ml de la solution de Folin-Ciocalteu. Après exactement 3 minutes, on ajoute 2 ml d'une solution de CO_3Na_2 à 20 %. L'ensemble est porté au bain-marie à 100° C pendant une minute. Les solutions sont refroidies à l'obscurité, une

coloration bleue apparait. L'intensité de cette coloration, dont l'absorption est mesurée au spectrophotomètre à 750 nm, est proportionnelle, dans une certaine gamme de la teneur en phénols des extraits. Celle-ci est alors évaluée par référence à une courbe étalon (Figure 4) établie avec une solution d'acide chlorogénique (RIBEREAU-GAYON, 1968).

Les résultats sont exprimés en μg de composés phénoliques par explantat ou par unité de matière sèche.

Une nouvelle technique, employée depuis peu au laboratoire, s'avère particulièrement prometteuse pour l'étude qualitative et quantitative des composés phénoliques, il s'agit de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

IV.4. - Dosage des pigments chlorophylliens

Nous avons mesuré la teneur en chlorophylles des feuilles des bourgeons néoformés.

Immédiatement après leur récolte, les tissus frais sont pesés, broyés dans un mortier, préalablement refroidi, en présence de 5 ml d'acétone à 80 % ; on ajoute une pincée de carbonate de sodium pour neutraliser l'acidité du broyat. Celui-ci est filtré sur verre fritté, porosité 4, sous vide, le volume est alors ajusté à 20 ml. L'extrait est centrifugé dix minutes à 3000 g. L'ensemble des opérations se déroule à 4° C sous lumière atténuée.

Les chlorophylles sont dosées au spectrophotomètre par lecture des densités optiques des extraits à trois longueurs d'onde : 664, 652 et 645 nm. Les teneurs en chlorophylles sont alors calculées à l'aide des équations de BRUINSMA (1963) et rapportées à l'unité de poids de matière fraîche.

RESULTATS

**ANALYSE PREALABLE DU MATERIEL VEGETAL ET
ADAPTATION DES TECHNIQUES**

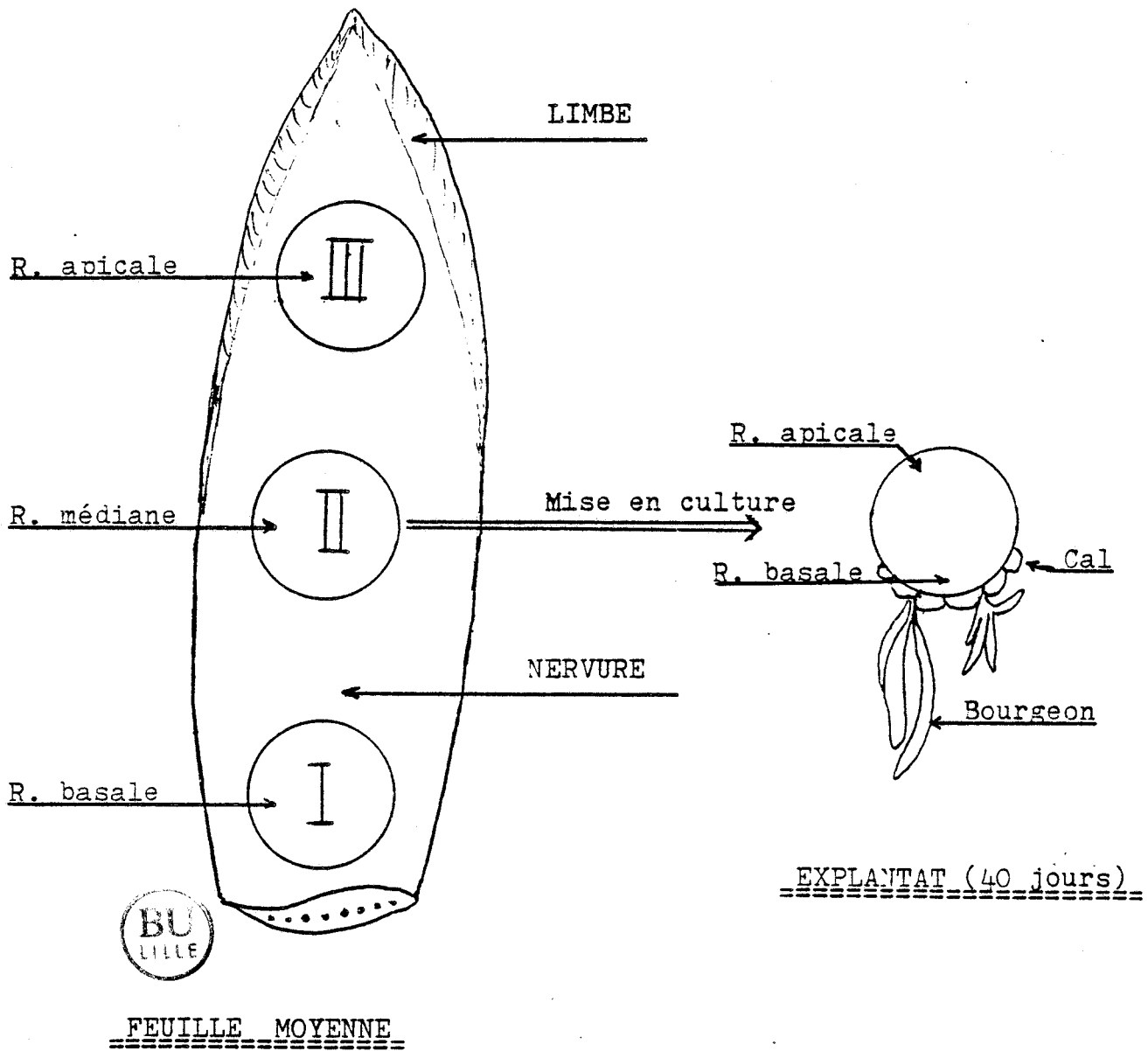


PLANCHE I I

Lieu de prélèvement des disques
de feuille .

I. - CRITERES BIOCHIMIQUES EN FONCTION DU LIEU DE PRELEVEMENT DES TISSUS.

L'état de la plante mère, son mode de conservation, l'époque de la récolte, les traitements chimiques et les conditions climatiques au champ, la teneur en composés endogènes des tissus, sont autant de paramètres qui peuvent influencer sur le développement ultérieur des explantats en culture *in vitro*. C'est pourquoi, avant d'aborder les expérimentations propres au bourgeonnement, nous avons entrepris l'analyse de quelques critères biochimiques dans les tissus que nous nous proposons de cultiver *in vitro*. De plus, nous avons très vite réalisé que les techniques décrites dans la littérature pour un tissu ou pour une espèce, ne convenaient pas forcément à la plante que nous utilisons, nous avons alors dû les adapter à notre matériel.

I.1. - Le lieu de prélèvement des tissus

Les feuilles de l'endive sont régulièrement imbriquées par verticilles de trois. Elles se recouvrent partiellement. 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 (E), moyennes (M) et centrales (C).

Ces feuilles étiolées présentent une nervure centrale très large. C'est dans cette nervure centrale que nous avons prélevé à l'aide d'un emporte-pièce des disques de 16 mm de diamètre d'une part dans la région basale (I), médiane (II) ou apicale (III) de la feuille moyenne (M) et d'autre part dans la région médiane des feuilles externe et centrale (Planche II).

I.2. - Matière fraîche (M.F.), Matière sèche (M.S.) et Azote protéique (N.P.)

Les poids de substances fraîche et sèche ainsi que la teneur en azote protéique des disques de feuilles prélevés à différents endroits du bourgeon d'endive sont rassemblés dans le tableau 1.

- Le poids de matière fraîche est plus élevé dans les fragments prélevés au milieu des feuilles que dans ceux des extrémités, de même il est plus important dans les feuilles moyennes que dans les feuilles externes ou centrales.

		M.F. mg/Expl	M.S. mg/Expl	M.S. % M.F.	N.P. ug/Expl
E		591,36	32,33	5,46	120,44
M	I	568,2	35,82	6,30	166,15
	II	688,2	44,94	6,52	178,18
	III	646,4	44,23	6,84	191,76
C		640,2	49,16	7,67	255,66



Tableau I : Poids frais (M.F.), poids secs (M.S.) et teneurs en azote protéique (N.P.) de fragments de feuille étiolée selon leur lieu de prélèvement.

(Le poids de substance sèche et la teneur en composés azotés augmentent parallèlement de la base (I) à l'apex (III) et des feuilles externes (E) aux feuilles centrales (C) du bourgeon d'endive.)

- Le poids de matière sèche des disques augmente de la base à l'apex de la feuille d'une part et des feuilles externe aux feuilles centrales d'autre part. Cette augmentation est encore plus nette lorsque les poids secs sont exprimés en pourcentage de matière fraîche.

- Les teneurs en azote protéique sont réparties de façon parallèle au poids de matière sèche, c'est-à-dire que la quantité d'azote protéique diminue des feuilles centrales aux feuilles externes et de l'apex à la base des feuilles.

I.3. - Activités enzymatiques

Pour extraire les peroxydases nous utilisons le tampon de SORENSEN, celui-ci ne permet pas une extraction spécifique et dans les extraits sont dissoutes d'autres enzymes telle que catalase, phenol-oxydase, etc...

L'oxydation de l'acide indolyl-acétique est catalysée par la peroxydase. D'après (HOYLE, 1972) l'auxine-oxydase serait une peroxydase C'est pourquoi nous avons mesuré l'activité auxine-oxydasique des extraits bruts que nous utilisons. Nous avons également dosé l'activité catalasique dans ces extraits car, la catalase, qui comme la peroxydase est une oxydo-réductase, pouvait interférer dans le dosage de l'activité peroxydasique. En effet, la catalase utilise le peroxyde d'hydrogène à la fois comme substrat et comme donneur d'électrons, elle pouvait donc détruire le peroxyde d'hydrogène nécessaire à la peroxydation du gaïacol.

1.3.1. - Mise au point technique

Les essais réalisés sur les tissus de feuille indiquent que, suivant le volume du tampon d'extraction, les activités peroxydasiques varient (Figure 5).

- Pour des volumes trop faibles de tampon la solubilité des protéines est incomplète.

- Pour des volumes plus importants (7 à 8 ml) la vitesse de d'oxydation du gaïacol est très ralentie.

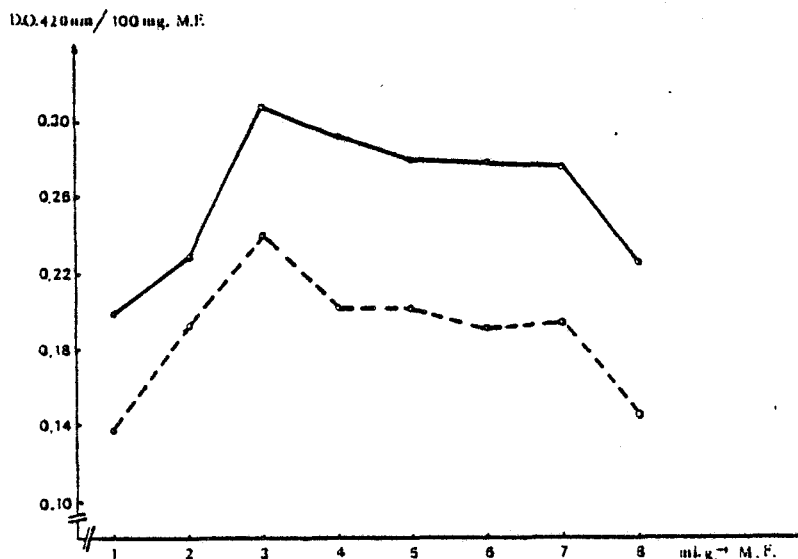


Figure 5 : Activité peroxydasique d'extraits de feuilles externes (-----) et de feuilles centrales (—) du bourgeon d'endive. Influence du volume du tampon d'extraction, pour une même quantité de poids frais.

Il est toutefois intéressant de noter que les différences d'activité trouvées dans des extraits d'origine distincte reste proportionnelles quel que soit le volume de tampon d'extraction et qu'un tissu qui a l'activité la plus forte la conserve.

Il est donc important de réaliser l'extraction en prenant toujours le même volume de tampon par unité de poids afin de pouvoir comparer les résultats obtenus. De plus, il faut tenir compte du volume d'eau apporté par les tissus frais et pour cela mesurer le volume final de l'extrait après centrifugation.

Les critères choisis pour exprimer l'activité enzymatique ont fait l'objet de nombreuses controverses. Nous avons donc dosé les activités

peroxydasiques dans des extraits réalisés à partir de matériel frais, congelé ou lyophilisé et constaté que celles-ci varient de façon similaire. Il en est de même lorsque les résultats d'activité sont exprimés par rapport aux protéines de l'extrait (activité spécifique), figure 6.

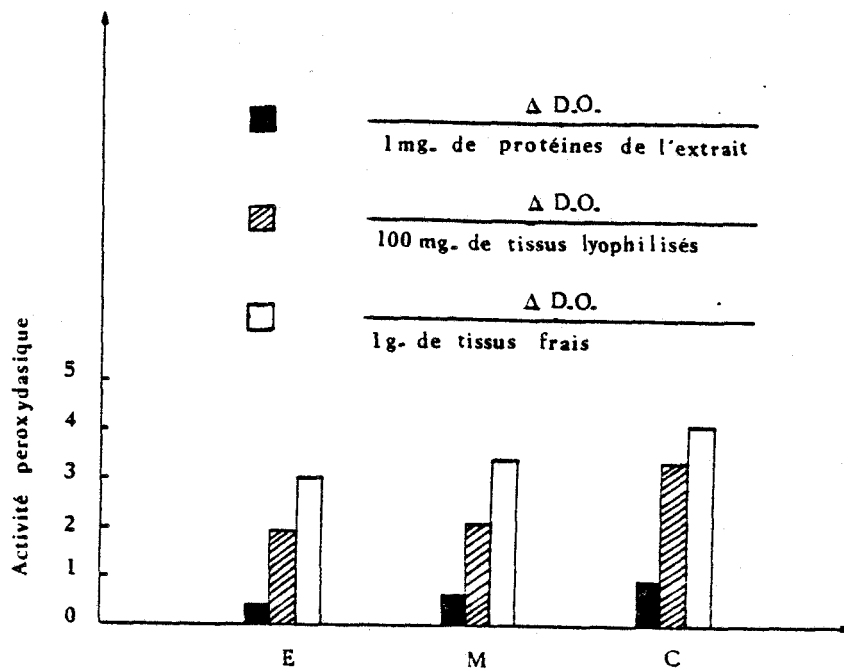


Figure 6 : Activité peroxydasique de fragments prélevés sur des feuilles externes (E), moyennes (M) et centrales (C), exprimée en fonction de différents critères.

Les cinétiques de dégradation de l'acide indolyl-acétique par différents volumes d'extrait sont reportés dans la figure 7. Après soixante minutes d'incubation, les quantités d'AIA dégradé sont proportionnelles pour les volumes d'extraits compris entre 0,25 et 1,5 ml, ce qui correspond à un apport plus important d'enzyme quand le volume d'extrait augmente.

Pour les volumes supérieurs à 1,5 ml et pour la même durée d'incubation, l'activité auxine-oxydasique est ralentie (2 ml) et paraît même inhibée (2,5 et 3 ml). Il existe alors un temps de latence d'autant plus important que le volume d'extrait est plus grand et pour 3 ml d'extrait cette phase de latence se prolonge sans être supprimée après deux heures d'incubation. Il n'y a donc plus de rapport entre volume d'extrait et activité auxine-oxydasique.

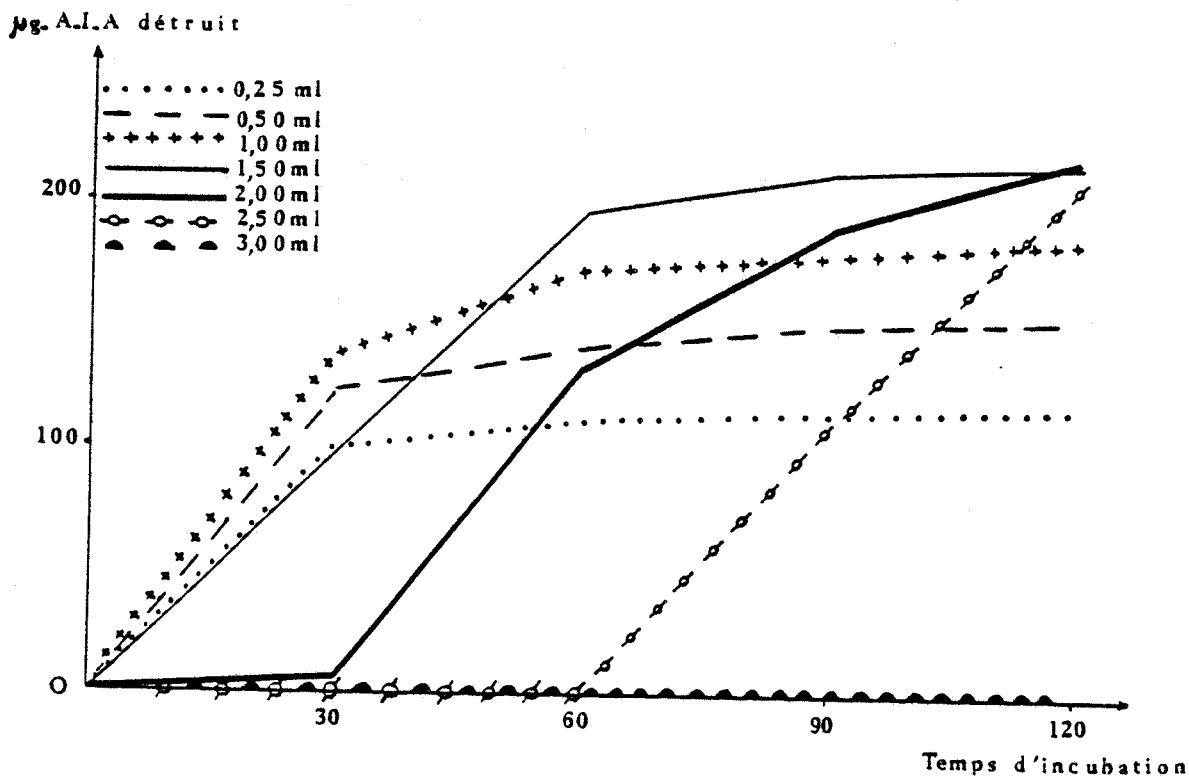


Figure 7 : Activité auxine-oxidasique (exprimée en µg d'AIA détruit) de différents volumes d'un extrait de feuille étiolée. le temps d'incubation varie de 0 à 120 minutes. Le volume global du mélange d'incubation est de 10 ml.

I.3.2. - Activités enzymatiques selon le lieu de prélèvement des tissus.

Les extraits bruts ont été réalisés en tenant compte des résultats exposés ci-dessus, c'est-à-dire que l'extraction est faite par broyage des tissus frais dans un tampon phosphate pH 6,8 à raison de 5 ml de tampon par gramme de substance fraîche et que pour le dosage des auxine-oxydases nous avons utilisé 1,5 ml d'extrait.

Pour plus de commodité nous ne retiendrons, dans ce paragraphe, que les résultats exprimés par rapport au poids de matière fraîche (Tableau 2).

		A.A.O.	A.P.	A.C.
E		17,85	3,02	0,64
M	I	155,04	2,80	0,60
	II	208,95	3,40	0,64
	III	223,65	4,60	0,67
C		245,34	4,02	0,67

Tableau 2 : Activités auxine-oxidasique (A.A.O. : μg d'AIA détruit/300 mg PF/90 mn), peroxydasique (A.P. .D.O./1 g PF/5 mn) et catalasique (A.C. : Meq Na détruit/1g PF/5 mn) de disques de feuille du bourgeon d'endive.

Les activités peroxydasique et auxine-oxidasique sont réparties de façon parallèle, en un gradient longitudinal (I, II et III) et un gradient transversal (E, M et C), ce qui se traduit par des activités enzymatiques croissantes de la base à l'apex des feuilles et des feuilles externes aux feuilles centrales.

Les activités catalasiques sont relativement très faibles, et sensiblement égales quel que soit le lieu de prélèvement des tissus. L'interférence, si elle existe, se fait donc de façon identique et est sans conséquence sur le dosage des peroxydases.

II. - LA COMPARTIMENTATION DES PEROXYDASES

La distribution subcellulaire des peroxydases implique que leur solubilité varie selon le degré de liaison avec les différents constituants cellulaires (LEE, 1973). Des résultats préliminaires ont montré que par l'utilisation d'un seul type de tampon, l'extraction n'est pas exhaustive. C'est

pourquoi, nous avons mis au point une méthode permettant d'extraire le plus complètement possible les peroxydases dans les tissus d'endive.

II.1. - Les peroxydases solubles et liées ioniquement

Les enzymes solubles sont extraites par le tampon de SORENSEN (pH 6,8) qui est une solution de phosphate disodique et de phosphate monopotassique à la concentration 0,066 M. Sa force ionique est de 0,264 calculée selon la formule :

$$I = 1/2 C_i \times V_i^2$$

où C représente la concentration molaire et V la valence de l'ion considéré.

En ajoutant du chlorure de sodium à la solution tampon précédente on augmente sa force ionique. On peut réaliser ainsi une gamme de solutions de forces ioniques croissantes allant de 0,264 à 1,464 par exemple. Le pH de chaque solution est ajusté à 6,8 unités à l'aide de soude normale.

On prélève alors des fragments de feuille, choisis dans la région médiane de la feuille moyenne, afin d'obtenir 8 lots très homogènes. Les peroxydases solubles sont extraites par broyage des tissus dans le tampon de SORENSEN. Ces enzymes sont recueillies dans le surnageant après centrifugation. Les culots sont alors remis en suspension dans le même tampon, homogénéisés et l'homogénat centrifugé. On recommence deux fois cette opération de lavage afin d'éliminer le peu de peroxydases solubles restant. L'activité résiduelle est d'environ 5 % après le premier lavage, elle est pratiquement nulle après le deuxième.

Nous disposons ainsi de huit lots identiques auxquels nous ajoutons, à chacun, le même volume de tampon de force ionique différente. Après 20 minutes de contact pour extraction, chaque lot est centrifugé et les surnageants contiennent les peroxydases liées ioniquement.

Plus la force ionique du tampon augmente, plus on décroche de peroxydases (Figure 8). Pour les solutions tamponnées de force ionique

égale ou supérieure à 1,064 l'activité peroxydasique des extraits est sensiblement la même ce qui signifie que passée cette limite toutes les peroxydases liées ioniquement sont extraites. Mais toutefois l'activité peroxydasique des extraits à très grande force ionique diminue faiblement. Nous avons alors examiné l'influence du temps de contact, autrement dit de la durée de l'extraction, sur le décrochement des peroxydases ioniques.

D.O. 420 nm / 100 mg. M.F.

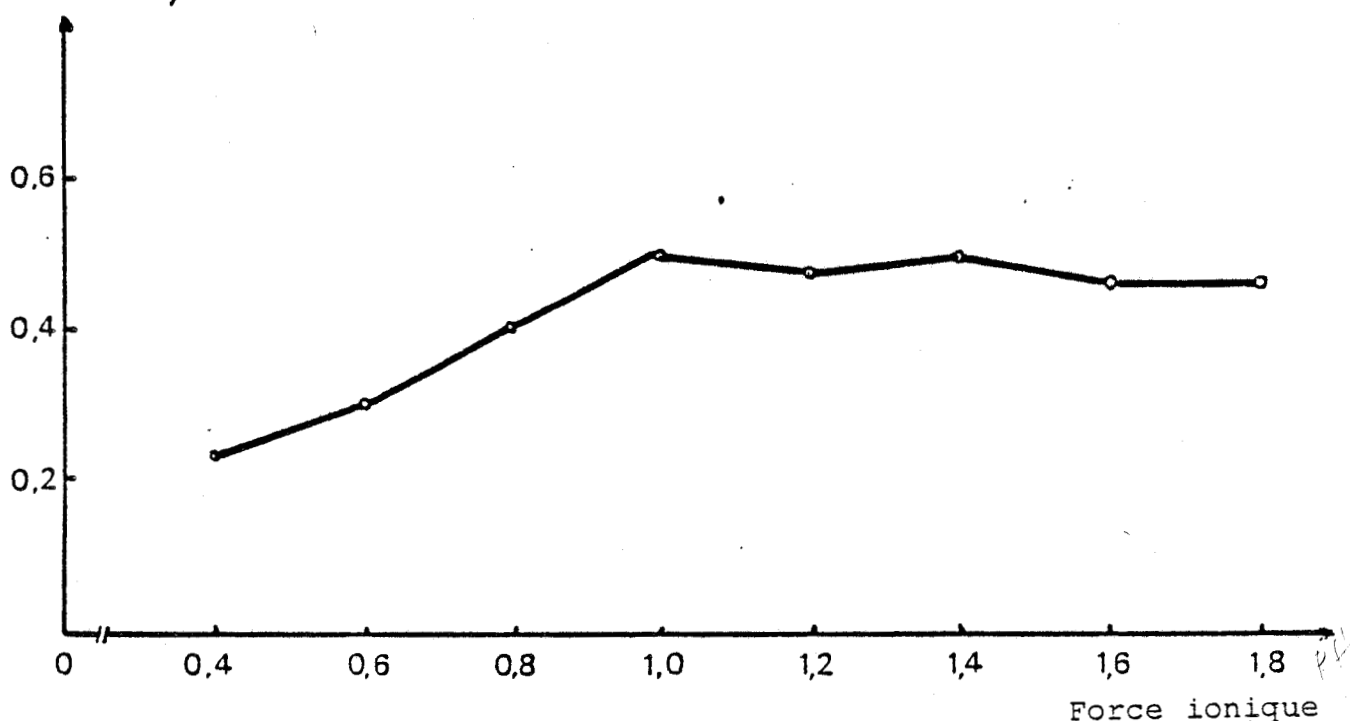


Figure 8 : Influence de la force ionique de la solution tamponnée sur l'extraction des peroxydases de tissus de feuille étiolée d'endive.



Des lots, libres de peroxydases solubles, sont homogénéisés dans une solution tamponnée de force ionique 1,064 pendant des durées variables. l'activité peroxydasique des extraits est fonction du temps de contact (Figure 9).

D.O. 420nm / 100 mg. M.F.

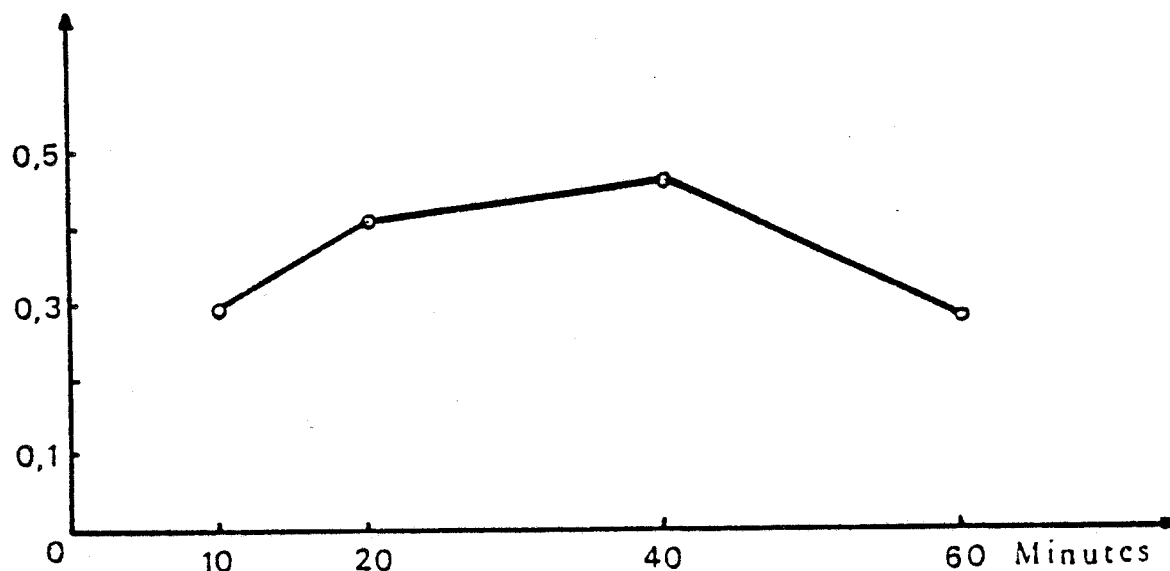


Figure 9 : Influence du temps d'extraction sur la libération des peroxydases liées ioniquement dans les tissus de feuille étiolée d'endive.

Faible après 10 minutes, elle augmente légèrement entre 20 et 40 minutes. Si la durée d'extraction est de 60 minutes l'activité peroxydasique mesurée est relativement faible, elle est égale à celle trouvée pour un temps d'extraction de 10 minutes comme si certaines peroxydases étaient à nouveau liées.

II.2. - Les peroxydases liées de façon covalente

Après extraction des peroxydases solubles et ioniques, les lavages à l'eau distillée permettent d'éliminer le NaCl. Les surnageants ne présentent plus d'activité peroxydasique. Mais, si le culot de centrifugation est mis en présence de peroxyde d'hydrogène et de gaiacol, on voit apparaître une coloration brune caractéristique de la formation de tetragaiacol, c'est donc qu'il existe encore, dans le culot, des peroxydases. Celles-ci ne seront extraites que par macération du culot de centrifugation dans une solution contenant 0,5 % de cellulases et 2,5 % de pectinases diluées dans une solution tamponnée d'acétate pH 4,5. Ces cellulases et pectinases vont donc digérer les parois et libérer les peroxydases liées de façon covalente. Celles-ci sont recueillies dans le surnageant après centrifugation.

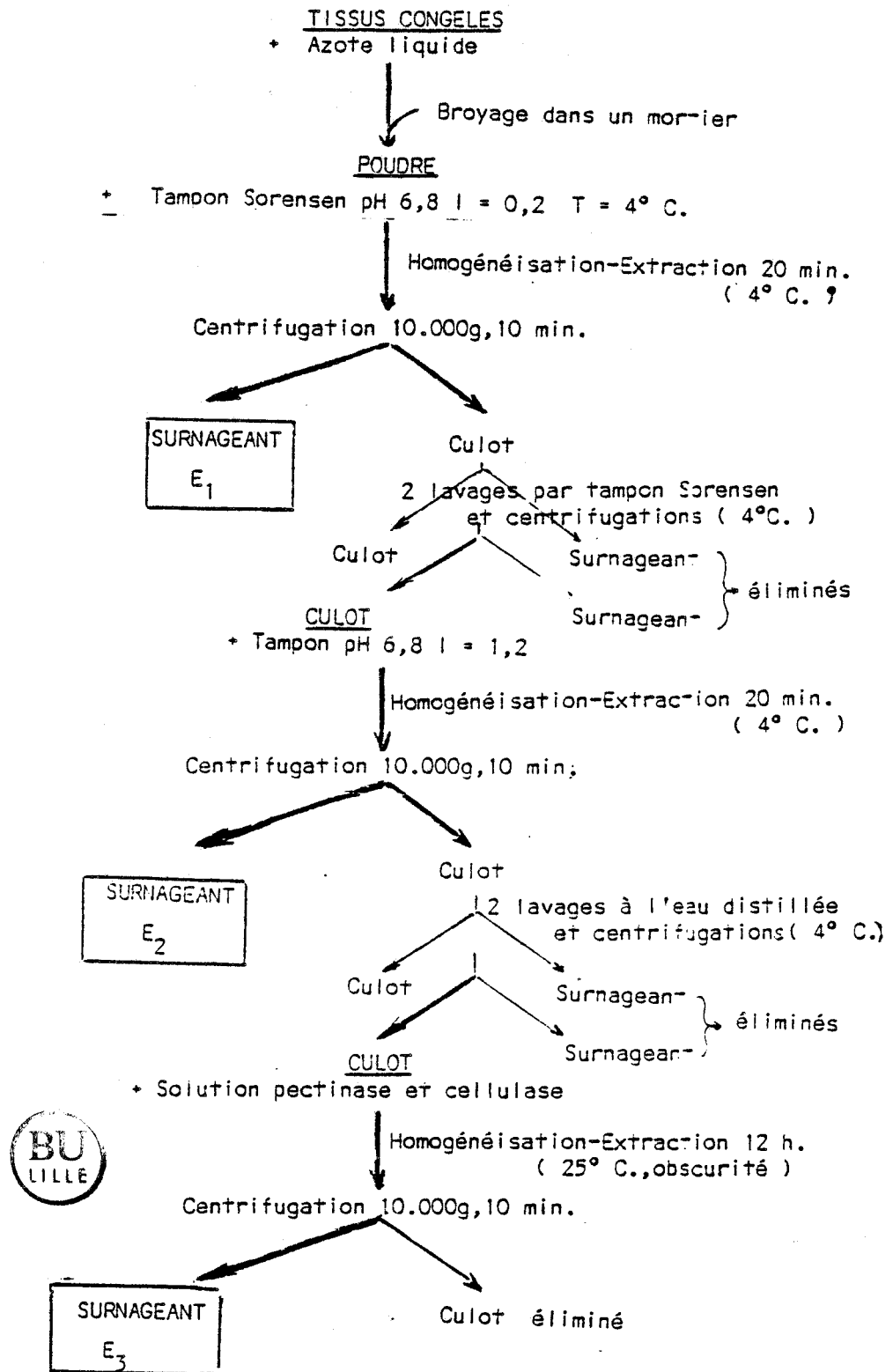


Planche III : Protocole d'extraction des peroxydases solubles (E₁) liées de façon ionique (E₂) et de façon covalente (E₃).

A la suite de ces résultats, la technique utilisée par l'extraction des différentes peroxydases des tissus de feuille étiolée d'endive est résumée dans la planche III.

II.3. - Proportions relatives des peroxydases des différentes fractions

Les cinétiques d'activité des peroxydases solubles, ioniques et covalentes sont reportées dans la figure 10.

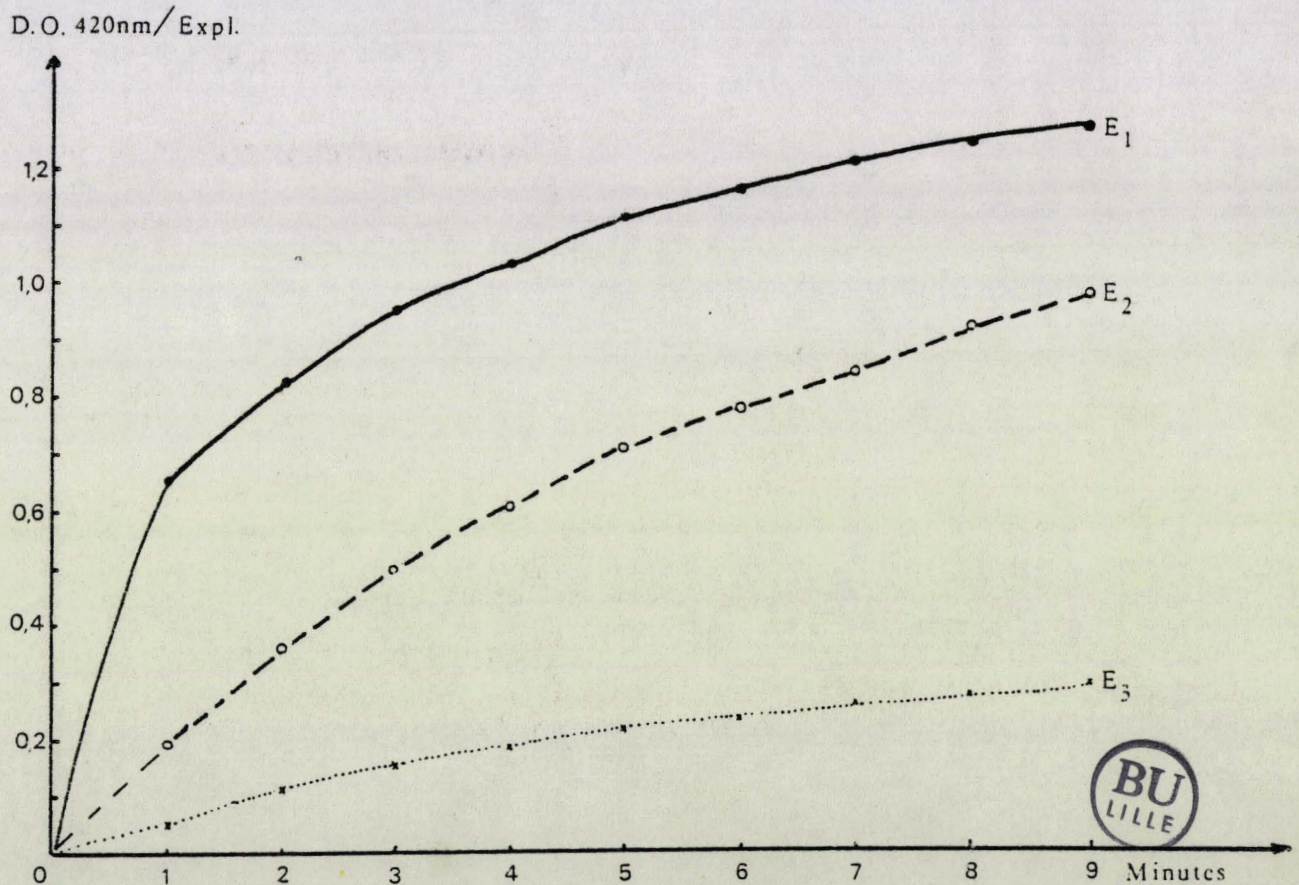


Figure 10 : Cinétique d'oxydation du galacol par des extraits contenant les peroxydase solubles (E₁), liées ioniquement (E₂) ou de façon covalente (E₃).

- Pour les peroxydases solubles, la pente de la droite est très forte pendant la première minute, puis elle s'infléchit brutalement, la vitesse d'oxydation du gaïacol est très fortement ralentie.

- La formation de tetragaïacol par les peroxydases de la fraction ionique démarre lentement, mais elle se poursuit de façon progressive ce qui se traduit sur le graphique par une droite témoignant d'une vitesse constante.

- L'activité peroxydasique de la fraction covalente se matérialise également par une droite dont la pente est faible ce qui signifie que la vitesse est constante mais de peu d'intensité.

Les proportions relatives des différentes peroxydases en fonction de leur degré de solubilité sont liées aux cinétiques. En effet si la réaction d'oxydation est poursuivie, par projection, la droite E2 coupera la droite E1, la quantité de peroxydase ionique sera théoriquement plus importante que celle des peroxydases solubles. Compte tenu de l'allure des courbes d'activité, il faut donc arbitrairement fixer le temps de la réaction.

Si en fonction du temps de la réaction on calcule, par rapport à l'activité mesurée, les proportions relatives des peroxydases de chacune des fractions (Tableau 3), il apparait qu'après une minute, l'activité des

Durée de la réaction en minutes.		1	3	5	10
E X T R A I T S	E ₁	71,9	59,3	54,5	49,7
	E ₂	21,3	30,9	34,8	38,5
	E ₃	6,7	9,6	10,6	11,6

Tableau 3 : Activités relatives des peroxydases solubles (E1) liées ioniquement (E2) ou de façon covalente (E3) en fonction de la durée de la réaction.

peroxydases solubles est trois fois plus forte que celle des peroxydases ioniques et douze fois plus que celle des covalentes. Après 5 minutes, les proportions varient, l'activité des peroxydases solubles représente 50 %, celle des ioniques 35 % et celle des covalentes 10 % de l'activité peroxydasique totale. En fait, ces variations observées au cours du temps, traduisent des cinétiques différentes dues à la présence probable de composés interférant sur la réaction.

A la suite de ces résultats nous avons fixé à cinq minutes la durée de la réaction pour la mesure des activités peroxydasiques des extraits de feuille étiolée d'endive.

III. LES ISOPEROXYDASES

III.1. - Les isoperoxydases des différentes fractions

L'électrophorèse sur gel d'amidon des extraits a permis d'établir l'équipement isoenzymatique des peroxydases solubles, ioniques et covalentes (Figure 11). Nous avons numéroté les différentes isoperoxydases en fonction de leur vitesse de migration, c'est-à-dire que plus le numéro est élevé plus la migration est rapide soit vers l'anode (A) soit vers la cathode (C).

- Trois isoperoxydases constituent le groupe des peroxydases solubles : deux anodiques : A₁ qui migre très peu et A₆ à migration rapide. Cette dernière n'est d'ailleurs révélée que par le gaïacol et pas par la benzidine.

: une cathodique C₃

- Les peroxydases liées ioniquement présentent deux isoenzymes cathodiques C₁ et C₂, l'intensité, donc l'activité, de la première, étant plus forte que celle de la deuxième et une anodique A₄.

- Aucune isoperoxydase cathodique n'est trouvée dans la fraction covalente, celle-ci est représentée par trois isoperoxydases anodiques A₂, A₃ et A₅.

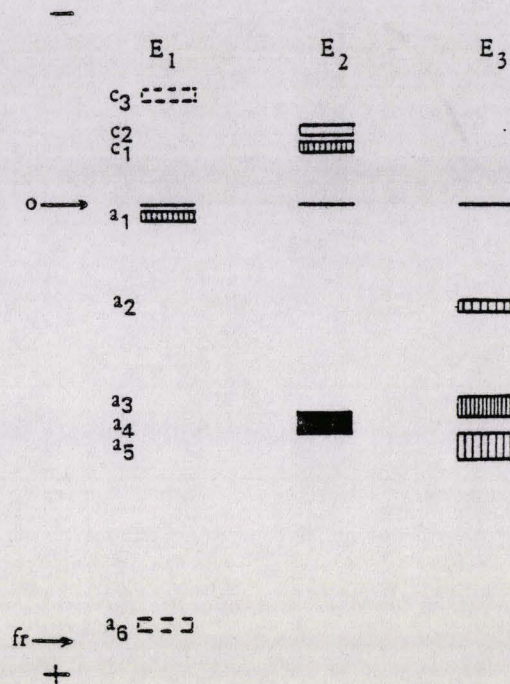


Figure 11 : Diagramme d'électrophorèse sur gel d'amidon d'extraits de feuille étiolée de *Cichorium intybus*
 E₁ = peroxydases solubles ; E₂ = peroxydases liées ioniquement ; E₃ = peroxydases liées de façon covalente ; O--- = origine du dépôt, fr = limite du front de migration ; C = cathode, A = anode.

La numérotation différente de toutes les isoperoxydases signifie qu'aucune ne présente une vitesse de migration semblable à une autre donc 9 isoperoxydases constitueraient l'équipement peroxydasique des tissus de feuille étiolée d'endive avant leur culture *in vitro*.

III.2. Rôle du NaCl dans la migration des isoperoxydases

Nous venons de voir qu'aucune isoenzyme ne trouve son homologue dans les différents extraits.

Les changements des propriétés ou du nombre des peroxydases ont été rapportés soit après des traitements par la chaleur (DELINCEE et Coll., 1973) soit par chromatographie à température ambiante (JANSSEN, 1970) soit par incubation à des pH croissants (LIU et LAMPORT, 1973). Par ailleurs DECEDUE et BORCHERT (1980) ont converti, en une seule bande électrophorétique, les différentes isoperoxydases de la pomme de terre après chromatographie d'un extrait sur colonne de Séphadex en présence de chlorure de calcium à la concentration deux fois molaires. Par conséquent la présence de chlorure de sodium une fois molaire dans nos extraits pouvait intervenir sur la mobilité électrophorétique des isoperoxydases. Pour cette étude, nous avons utilisé des cals issus de tissus de feuille cultivés pendant douze jours. Le choix de ce matériel se justifie par la présence de nombreuses isoenzymes qui permettent de mieux visualiser les effets du NaCl sur leur migration. Nous avons alors ajouté des quantités croissantes de NaCl à un extrait de la fraction soluble avant de le soumettre à l'électrophorèse.

Plus la concentration en NaCl est grande moins la migration de certaines isoperoxydases est importante (Figure 12). Les isoenzymes C₃, C₄ et C₆ migrent moins vite et l'isoperoxydase C₆ se déforme et prend progressivement la forme de "moustaches". L'augmentation de concentration en NaCl de 0,2 à 0,8 M provoque l'apparition d'une isoperoxydase C₅ à 0,2 M puis d'une autre C₂ à 0,4 M en supplément de celles observées dans l'extrait brut sans NaCl. La présence de ce sel pourrait renforcer l'activité de l'isoenzyme C₅ qui serait alors révélée.

Par conséquent la vitesse de migration des isoperoxydases peut être influencée par le NaCl. Cette seule manipulation des peroxydases ne permet donc pas de conclure que les peroxydases des fractions soluble et ionique dans la feuille (Figure 11) sont des unités fonctionnelles différentes.

Nous avons alors comparé les zymogrammes d'un extrait, de la fraction soluble, de cal, additionné de NaCl 1M et d'un extrait obtenu par extraction des peroxydases ioniques avec la même concentration en sel (Figure 13). Les isoenzymes C₆ et C₁ de la fraction soluble sans supplément de NaCl et de la fraction ionique sont communes, mais dans la fraction ionique, C₁ paraît composée de deux unités. Après manipulation de l'extrait

soluble (E_1) l'isoenzyme C_6 ne migre plus aussi loin et n'est donc plus équivalente à l'isoperoxydase C_6 de la fraction ionique dont l'isoenzyme C_5 , n'a aucun homologue. On pourrait également considérer que les isoperoxydases C_2 et C_2' sont mieux séparées dans l'extrait soluble traité au NaCl que dans l'extrait des peroxydases liées ioniquement.

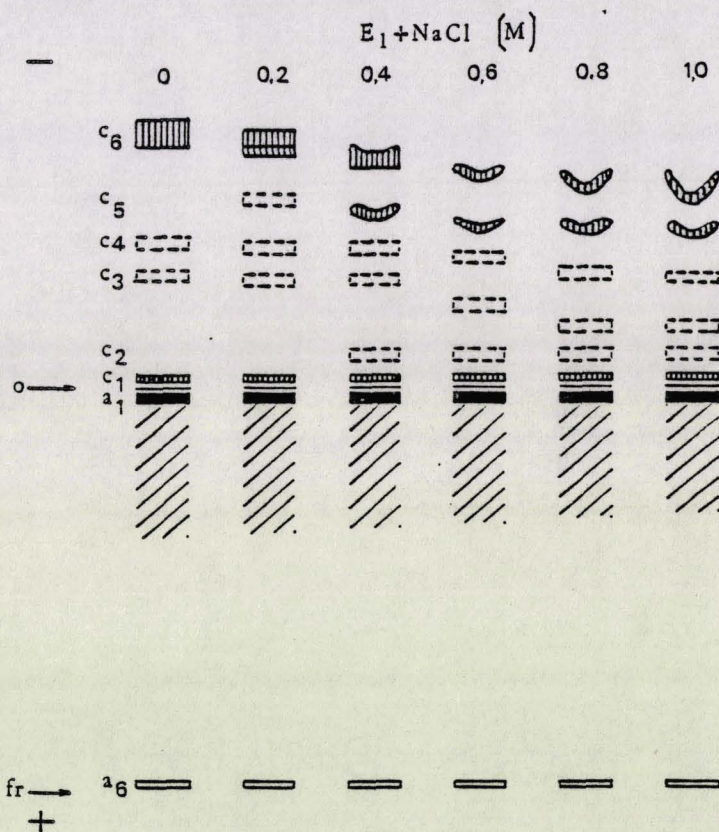


Figure 12 : Effets du NaCl sur la mobilité électrophorétique des isoperoxydases d'un extrait de cals issus de feuille étiolée de *Cichorium intybus*. E_1 = Extrait de peroxydases solubles ; (M) = concentration molaire ; o = origine du dépôt ; fr = limite du front de migration C = cathode ; A = anode.

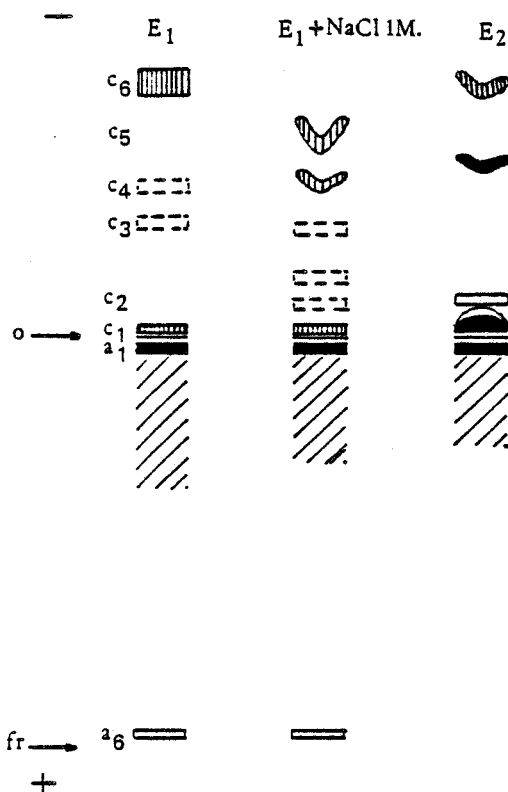


Figure 13 : Diagramme d'électrophorèse sur gel d'amidon d'extraits de cals issus de feuille étiolées de *Cichorium intybus*

E₁ = Extrait de peroxydases solubles additionné ou non de NaCl une fois molaire ; E₂ = extrait de peroxydases liées ioniquement ; o = origine du dépôt ; fr = limite du front de migration ; C = cathode ; A = anode;

Le traitement subi par un extrait modifie donc considérablement les propriétés physico-chimiques des peroxydases qui s'y trouvent.

Après dialyse, il apparaît toutefois que l'effet du NaCl sur la vitesse de migration des isoperoxydases est réversible. Néanmoins cette méthode entraîne, ou une baisse d'activité, ou la perte de certaines isoperoxydases dont l'intensité de révélation était déjà moins forte à l'origine.

Toutes ces précautions étant prises, nous pensons que dans les tissus de feuilles, où les isoenzymes sont peu nombreuses, les isoperoxydases cathodiques sont différentes dans les différentes fractions considérées, de même que le sont les isoperoxydases anodiques dont, curieusement, la vitesse de migration n'est pas affectée par la présence du sel dans l'extrait.

IV. - LES COMPOSES PHENOLIQUES

On sait que les composés phénoliques, doués d'un remarquable potentiel d'activités physiologiques, interviennent dans la plupart des phénomènes de croissance et de morphogenèse chez diverses espèces végétales. Par exemple le rapport de la teneur en monophénols à celle en orthodiphénols (NITSCH, 1970) peut apparaître comme un élément régulateur de la croissance d'un organe, en contrôlant partiellement le taux d'auxine intracellulaire par une action activatrice (monophénols) ou inhibitrice (orthodiphénols) sur l'activité auxine-oxydasique.

C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'analyser l'équipement phénolique des tissus de feuille étiolées, dont l'activité auxine-oxydasique est influencée par de trop fortes quantités d'extrait.

Sur les chromatogrammes sont visibles en lumière de WOOD (365 nm) deux tâches mineures (Rf 0,25 et 0,29) que nous n'avons pu identifier et deux tâches plus importantes (Rf 0,68 et 0,80). Ces deux dernières présentent une fluorescence en lumière ultra-violette et deviennent jaune-vert en présence de vapeur ammoniacale, il s'agit donc de dérivés de l'acide caféique. L'emploi de produits de référence purs a permis d'identifier ces deux tâches à l'acide caféique. (Rf 0,68) et à l'acide chlorogénique (Rf 0,80).

- Par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) nous avons confirmé en partie cette identification. Les composés isolés des feuilles d'endive présentant des temps de rétention strictement identiques à celui de l'acide chlorogénique et légèrement décalé pour l'acide caféique.

V. - DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Pendant longtemps, les physiologistes intéressés par la culture *in vitro* des tissus végétaux accordèrent peu d'attention quant au lieu de prélèvement des explantats.

C'est en 1968 que LAVÉE et GALSTON ont montré que la variabilité des résultats obtenus pouvait être considérablement réduite à condition de prélever les fragments de moëlle de tabac à un même niveau dans les tiges. Ils suggèrent que des gradients métaboliques peuvent exister dans les plantes et être à l'origine des variabilités biologiques et biochimiques constatées. Peu de temps après (LEGRAND, 1969), nous avons démontré dans la racine de Carotte que les catalases et les peroxydases étaient réparties selon un gradient longitudinal d'une part et transversal d'autre part ; ce dernier est apparemment lié à la nature des tissus (DE JONG, 1972).

Depuis, d'autres gradients : peroxydasiques (CHAPPET et DUBOUCHET, 1970 ; THORPE et Coll., 1978) ; nucléiques et protéiques (VASSEUR et LEGRAND, 1972) ; florigène (JOSEPH et PAULET, 1975) ont été mis en évidence. L'étude des isoperoxydases le long de l'hypocotyle de *Vigna radiata* a permis à GOLBERG et Coll., (1986) de révéler des modifications importantes en fonction du gradient de croissance, notamment dans l'équipement des peroxydases pariétales.

Le lieu de prélèvement d'un explantat sur un même organe a donc une importance considérable sur ses caractéristiques biochimiques. Pour nos expériences nous avons donc retenu la zone médiane de la feuille moyenne du bourgeon étiolée de *Cichorium intybus* comme origine des explantats.

Les activités enzymatiques, peroxydasique, auxine-oxydasique et catalasique, dosées dans les feuilles du bourgeon étiolé d'endive, sont en ce qui concerne les peroxydases et auxine-oxydases plus fortes d'une part dans les jeunes feuilles centrales et d'autre part dans la région apicale de la feuille médiane dont la croissance n'est pas achevée. Ceci confirme les résultats de KAMINSKI (1971), BIRECKA et Coll. (1972), DE JONG (1972), SIRJU et WILSON (1974), GRISON et PILET (1985) et de GOLBERG et Coll. (1986) montrant que généralement les tissus très jeunes

ou en voie d'élongation ont une activité assez forte, qui diminue au cours de la différenciation pour augmenter à nouveau lors du vieillissement.

La répartition parallèle des activités auxine-oxydasique et peroxydasique dans les feuilles étiolées de *Cichorium intybus* souligne les relations étroites qui existent entre ces deux enzymes. Mais aujourd'hui encore, il est difficile de considérer les auxines-oxydases comme des entités moléculaires (GASPAR et Coll., 1982) plutôt que comme une fonction catalytique particulière des peroxydases.

Les gradients peroxydasique et auxine-oxydasique démontrés dans les feuilles d'endive, sont de plus en concordance avec la teneur en matière sèche et en protéines des fragments suivant le lieu de prélèvement. La répartition de ces composés azotés est donc susceptible d'expliquer les variations observées par VASSEUR (1965) sur la callogénèse et l'organogénèse *in vitro* de tissus de feuille étiolée prélevés à différents niveaux du bourgeon d'endive.

Comme le confirment les résultats que nous avons obtenus sur les feuilles de *Cichorium intybus* il est évident que l'extraction réalisée à partir d'une seule solution tamponnée n'est représentative ni de l'activité peroxydasique globale ni de la composition isoperoxydasique des tissus. Les résultats d'autres chercheurs, ADATTHODY et RACUSEN, (1967), GASPAR et Coll. (1966), MACNICOL (1973), LEE (1974), GRISON et PILET (1985) aboutissent aux mêmes conclusions.

Un autre aspect de l'importance de la technique utilisée pour l'extraction des enzymes a été mis en évidence par VAN DER MAST (1970). Il montre qu'il est possible de découpler ou de recoupler les enzymes liées aux structures cellulaires. Mais, suivant l'agent chimique utilisé le recouplage n'est pas toujours possible. Les liaisons des enzymes aux membranes seraient alors dues à la présence de composé(s) intermédiaire(s). Au cours de l'extraction, l'élimination de ce(s) composé(s) empêcherait toute refixation de l'enzyme. Il existerait donc des liaisons enzymes-protéines de la membrane.

Des travaux, forts comparables, sur la fixation ou la solubilisation de peroxydases liées aux membranes ont été présentés par DARIMONT et Coll. (1977) et par PENEL et Coll. (1979).

Par conséquent, les différents travaux relatifs à la compartimentation des peroxydases ne permettent pas, à cause des techniques différentes utilisées, d'aboutir à une règle générale précise. La compilation de nombreux résultats permet malgré tout de répartir les peroxydases en trois grands groupes.

GROUPE I : Les peroxydases pariétale libres (Free cell wall peroxidases) obtenues par la méthode du vide de ABELES et LEATHER (1971) ou de RATHMELL et SEQUEIRA (1974) ou encore celle de CASTILLO et Coll. (1984). Ces peroxydases sont extraites par infiltration, sous vide, d'eau ou de solutions tamponnées dans les tissus puis centrifugation des tissus sans broyage préalable.

Les peroxydases protoplasmiques (Protoplast peroxidases) extraites par broyage des tissus dans une solution tamponnée de faible force ionique.

Ces deux sous-groupes, peroxydases libres pariétales et peroxydases protoplasmiques sont souvent assimilés au grand groupe des peroxydases solubles. En effet, peu de chercheurs s'intéressent, à l'heure actuelle, à ces peroxydases localisées dans les espaces intracellulaires, mais les travaux de GASPARD et Coll. (1986), de PENEL et Coll. (1984) montrant une sécrétion possible de ces enzymes dans l'espace pariétal relancent l'intérêt qui leur est accordé.

GROUPE II : Les peroxydases accrochées ioniquement aux membranes et aux parois (Ionically bound wall peroxidases). Elles nécessitent pour leur extraction un tampon de force ionique relativement importante, variant de 0,4 à 1,4 selon le matériel considéré. Pour l'endive la force ionique retenue est de 1,2.

GROUPE III : Les peroxydases liées de façon covalente à la paroi (Covalently bound wall peroxidases). La digestion enzymatique des parois pectocellulosiques est nécessaire pour leur extraction. Il est alors difficile de séparer les cellulases et pectinases ajoutées, des peroxydases extraites, et par conséquent impossible d'exprimer l'activité spécifique, rapportée à l'unité protéique, de la fraction covalente.

Parmi ces trois groupes, il est difficile d'en définir un mieux représenté que les autres tant les résultats varient d'un tissu à l'autre.

Si chez la Patate douce (BIRECKA et MILLER, 1974) les activités peroxydasiques sont réparties de la même façon que dans les tissus de feuille d'endive, c'est-à-dire que l'activité des peroxydases solubles est plus forte que celle des peroxydases liées ioniquement, qui est elle-même supérieure à celle des peroxydases de la fraction covalente, il n'en est plus de même dans la moëlle de Tabac (BIRECKA et MILLER, 1974) ou dans les cellules de *Silene alba* (LEGRAND et DUBOIS, 1977) où le groupe le mieux représenté est celui des peroxydases liées ioniquement.

Il apparait de plus que les isoperoxydases de ces différents groupes ne peuvent être réparties en classes bien définies.

Pour certains tissus (WHITMORE, 1971 ; MEUDT et STECHER, 1972) quel que soit le mode d'extraction, les mêmes isoenzymes sont retrouvées dans les différentes fractions. Dans d'autres cas (HAARD, 1973 ; MENNES et Coll., 1973 ; MACNICOL, 1973 ; GARDINER et CLELAND, 1974 a, 1974 b ; LEE, 1974 ; BIRECKA et Coll., 1976 ; HAARD et MARSHALL, 1976 ; MADER, 1976 ; VANCE et Coll., 1976 ; LEGRAND et DUBOIS, 1977) les isoperoxydases des fractions solubles ou ioniques sont différentes. Il semble néanmoins, comme dans le cas de l'Endive, que la fraction des peroxydases liées de façon covalente contient le plus souvent des peroxydases anodiques (RIDGE et OSBORNE, 1970 ; GASPARD et Coll., 1975).

Cette grande hétérogénéité moléculaire crée un doute dans l'esprit des chercheurs, car elle peut également être liée aux différents traitements subis par les tissus lors de l'extraction (PENEL et Coll., 1977). On peut également ajouter que la visualisation des isoperoxydases sur les gels est fortement influencée par la concentration du substrat (NOVACKY et HAMPTON, 1968), par le pH d'incubation et le donneur d'électrons utilisé pour la révélation (EVANS, 1970 ; KAMEL et GHAZY, 1973 ; LALORAYA et Coll., 1980).

En conclusion, la technique d'extraction joue un rôle important.

Nous en avons défini les limites pour les tissus de feuille étiolée de *Cichorium intybus* et nous verrons combien ces premiers résultats sont importants, ou seront exploités, dans l'étude des modifications d'activité peroxydasique ou d'équipement isoperoxydasique de tissus ayant subi des traitements physiques ou chimiques. Ils nous permettront de voir si les peroxydases interviennent ou non dans le phénomène de bourgeonnement des tissus de *Cichorium intybus*

**RELATIONS ENTRE LE BOURGEONNEMENT ET LES
PEROXYDASES**

**A - ETAPES HISTOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DU
DEVELOPPEMENT "IN VITRO" DES TISSUS DE FEUILLE
ETIOLEE**

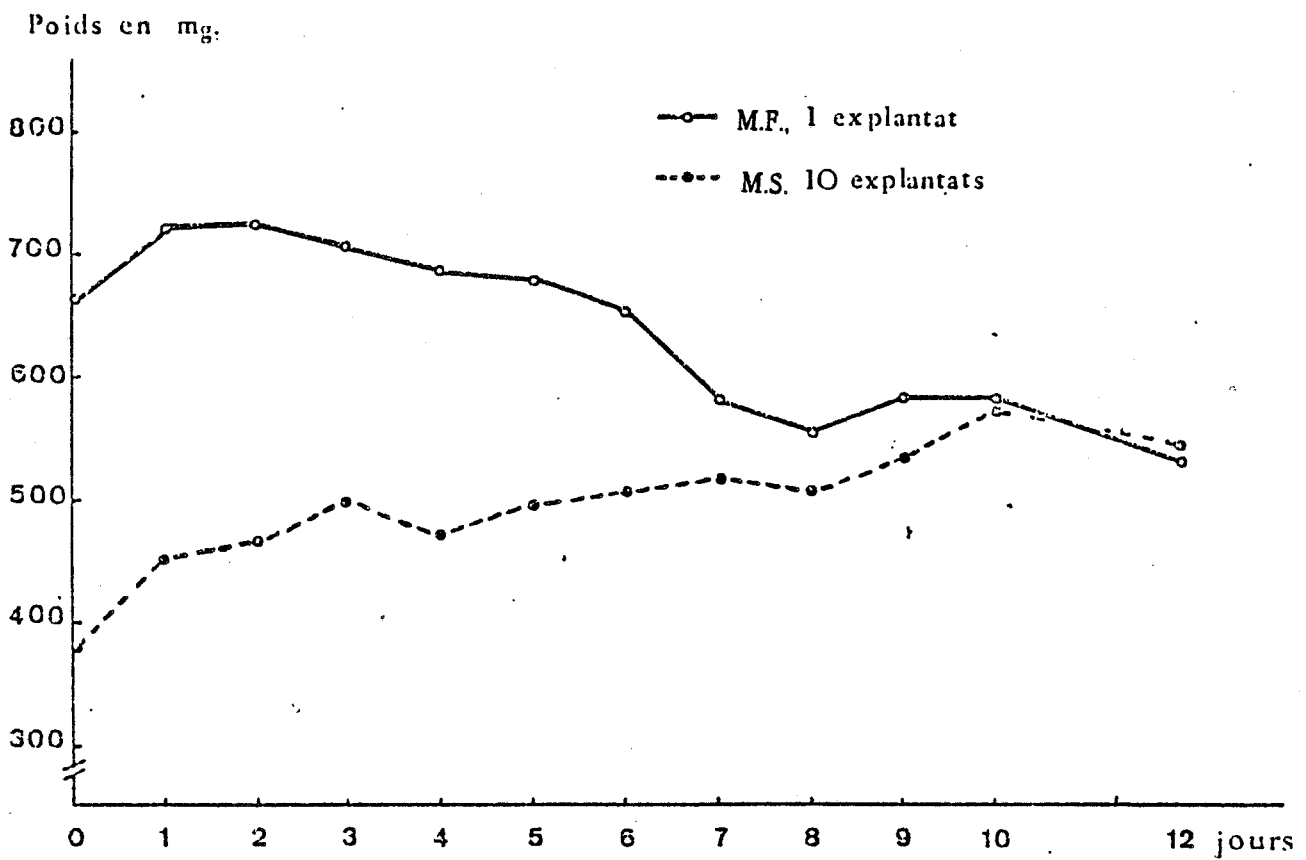


Figure 14 : Evolution du poids de matière fraîche (M.F.) et du poids de matière sèche (M.S.) au cours de la culture de fragments de feuille d'Endive.

Avant d'aborder l'action de différents facteurs sur le bourgeonnement et l'activité peroxydasique, il convient de décrire, ici, les étapes du développement d'un fragment de feuille étiolée cultivé *in vitro*.

Au cours de la culture différents événements d'ordre histologique, morphologique et biochimique interviennent et conduisent à la néoformation de bourgeons.

COUILLEROT et Coll. (1978) ont étudié systématiquement le devenir des différents tissus de feuilles étiolées d'Endive cultivés *in vitro* sur le milieu de Knop à 21° C et éclairés 12 heures par jour. 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 deuxième 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 troisième jour. Vers le quatrième et le cinquième jour de culture les cellules périvasculaires commencent à proliférer et les cellules du mésophylle se cloisonnent activement. L'apparition des premiers nodules méristématiques a lieu à partir du sixième jour de culture, au niveau du parenchyme néoformé, d'origine vasculaire.

Ces modifications histologiques se traduisent morphologiquement par l'apparition, vers le quatrième ou cinquième jour, de petites pustules blanchâtres au niveau des nervures, puis par suite de la prolifération cellulaire, les pustules grossissent pour former un cal. Celui-ci est toujours situé à la partie basale de l'explantat, la polarité de prolifération cellulaire est très nette (BOURIQUET et VASSEUR, 1966). Vers le douzième jour de culture on peut voir les ébauches gemmaires sur les cals mais aussi parfois dans la région apicale de l'explantat. L'expression de la polarité pour la caulogénèse étant moins absolue que pour la callogénèse. Les bourgeons se développent alors sans qu'il y ait, semble-t-il, un effet de dominance apicale bien marqué. En effet, la taille des bourgeons apparus sur un même explantat est sensiblement identique.

Nous avons aussi cherché à mettre en évidence les modifications biochimiques qui caractérisent les étapes de la transformation aboutissant à la formation des bourgeons. Nous nous sommes limités à l'étude de quelques critères comme l'évolution des poids de matière fraîche et sèche, puisque la croissance est généralement définie comme une augmentation irréversible de taille et de poids. Il nous a paru aussi utile de préciser l'évolution des constituants tels que l'azote ribonucléique (LEGRAND et VASSEUR, 1972) puisque nous envisageons l'étude d'une enzyme : la peroxydase.

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. La quantité totale d'azote augmente jusqu'au dixième jour de culture puis baisse ensuite légèrement (Figure 15). Cette augmentation est due tantôt à l'azote soluble, tantôt à l'azote protéique. L'azote soluble évolue de façon similaire à l'azote total, sauf entre les quatrième et cinquième jours où sa diminution correspond à une très forte augmentation de l'azote protéique. La quantité d'azote protéique baisse en début de culture, augmente puis se stabilise entre le cinquième et le septième jour, elle diminue au huitième jour et s'accroît ensuite progressivement.

La teneur en ARN (Figure 16), relativement stable au début de culture, augmente du quatrième au sixième jour puis diminue ensuite jusqu'au dixième jour. L'activité spécifique augmente brutalement durant les quatre premiers jours de culture, ce qui traduit une incorporation importante d'acide orotique- ^{14}C . Cette incorporation se stabilise du quatrième au sixième jour puis décroît jusqu'au onzième jour. On assiste donc à une synthèse d'ARN très active qui correspond à une phase allant du déclenchement des mitoses à la formation d'un cal. Entre le sixième et le onzième jour, période durant laquelle la prolifération s'oriente normalement vers la formation de méristèmes caulinaires, la synthèse diminue mais demeure néanmoins plus forte que celle constatée dans les explantats au début de l'expérience. Cette synthèse ne reprend très lentement qu'au onzième jour, date à laquelle les premières ébauches des bourgeons apparaissent à la surface du cal. La comparaison des courbes (Figures 15 et 16) représentant les variations d'azote protéique et d'ARN montre que la synthèse de ce dernier précède celle d'azote protéique, il contrôle donc bien la synthèse des protéines.

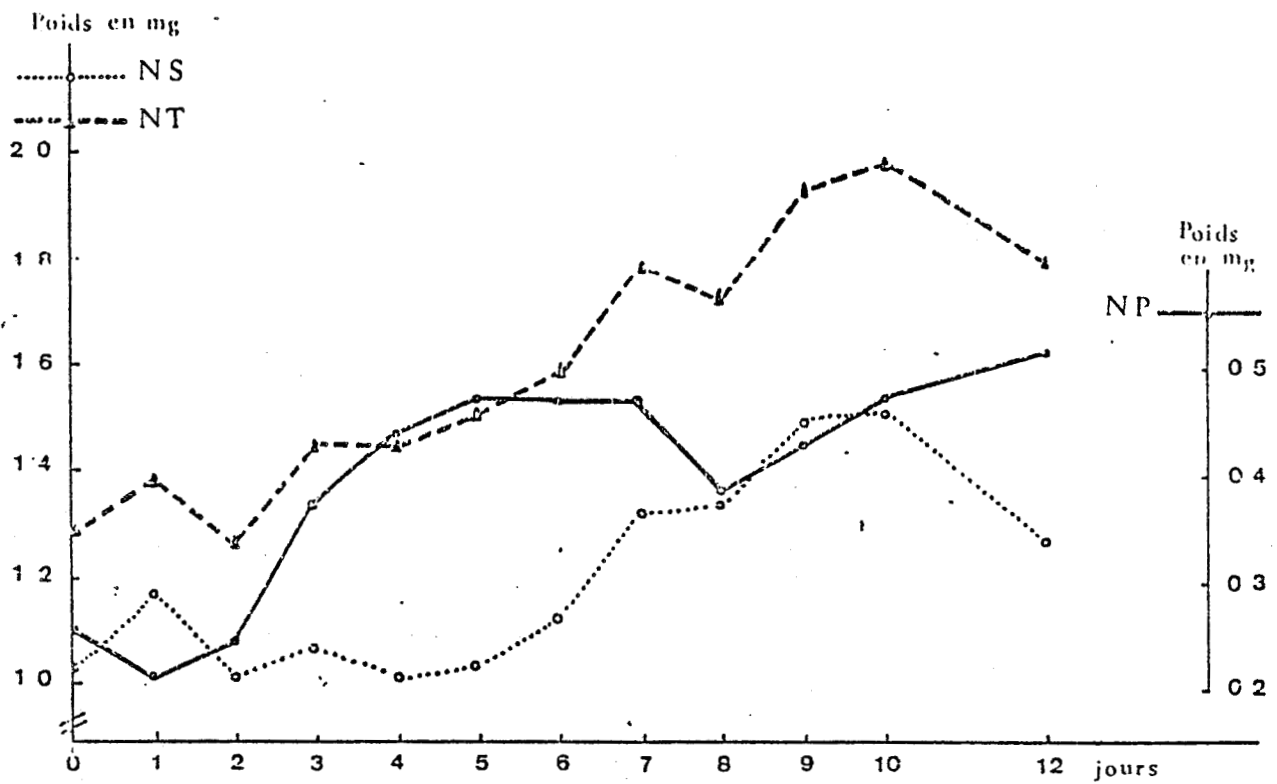


Figure 15 : Evolution des teneurs en azote total (N.T.) soluble (N.S.) et protéique (N.P.) au cours de la culture de fragments de feuille d'Endive.

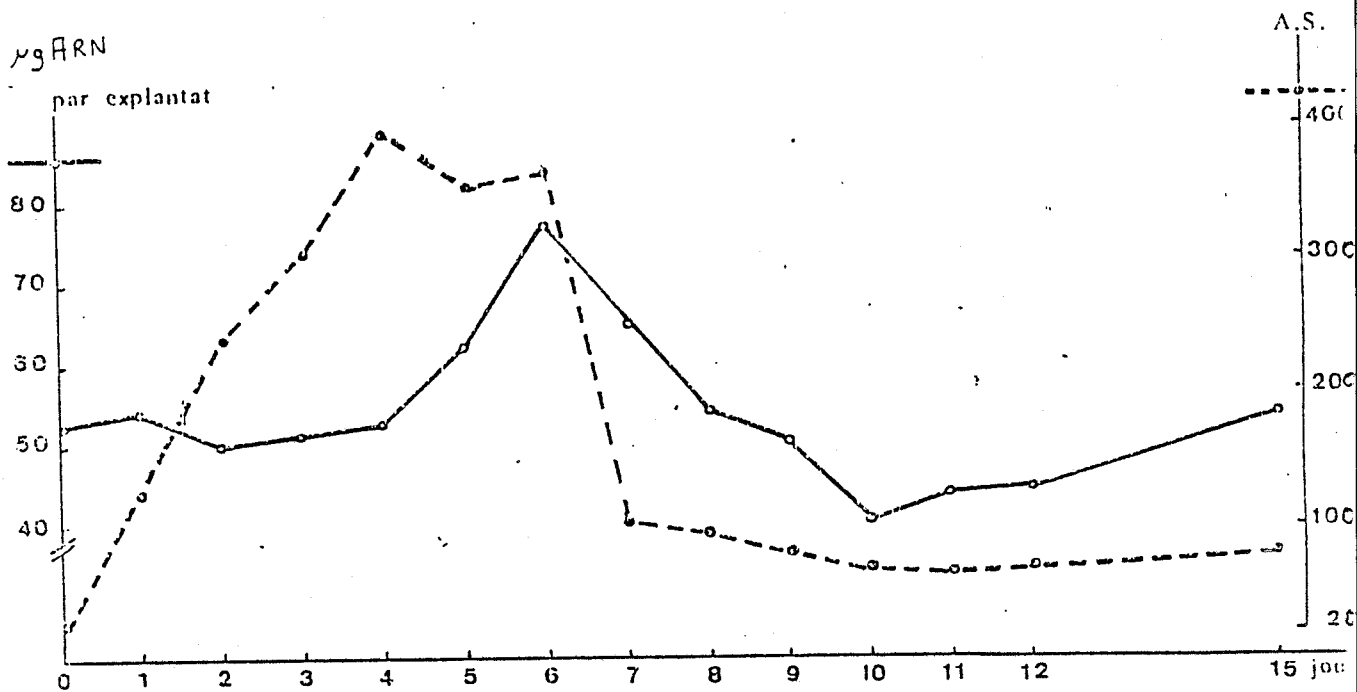


Figure 16 : Evolution des teneurs et de l'activité spécifique (A.S.) de l'ARN au cours de la culture de fragments de feuille d'Endive (L'activité spécifique est exprimée en d.p.m./µgARN).



**B - ACTION DES FACTEURS PHYSIQUES SUR LE BOURGEON-
NEMENT ET SUR L'ACTIVITE PEROXYDASIQUE**

Jours	4	5	6	8	10	11	12	13	27	30	35
10° C										EXSUDAT	CAL
15° C				EXSUDAT				CAL	BOURGEON		
20° C		EXSUDAT		PUSTULE	CAL		BOURGEON				
25° C	EXSUDAT		PUSTULE	CAL	BOURGEON						
30° C	EXSUDAT	PUSTULE	CAL		BOURGEON						
35° C	PUSTULE	Brunissement des explantats		Nécrose		BOURGEON					

Planche IV : Cinétiques d'apparition des cals et des bourgeons ; les tissus de feuille étiolée sont éclairés 12 heures par jour.



I. - ACTION DE LA TEMPERATURE

I.1. Cinétique d'apparition du cal et des bourgeons

Nous avons étudié l'action de températures s'échelonnant de 10 à 35° C. sur la callogénèse et le bourgeonnement d'explantats éclairés 12 heures par jour.

L'apparition du cal est toujours précédée d'un exsudat au niveau des nervures sectionnées par l'emporte-pièce. Les gouttelettes sourdent du côté où le cal va se former. Le temps s'écoulant entre l'apparition de l'exsudat et celle du cal varie (Planche IV). A 35° C l'exsudat est peu important et les jeunes cals (pustules) sont visibles dès le quatrième jour de culture, mais ils ne croissent que difficilement, car les tissusensemencés brunissent et se nécrosent rapidement. Aux températures plus basses les tissus de feuille se développent mieux, le nombre d'explantats présentant un cal est plus important, mais la callogénèse se manifeste d'autant plus tard que la température est moins élevée. A 10° C par exemple il faut attendre trente cinq jours avant toute manifestation de développement du cal et ceci sur très peu d'explantats, mais l'aspect des tissus primaires varie peu par rapport à l'état initial et ils ne se nécrosent pas.

Dès le dixième jour de culture les bourgeons apparaissent aux températures de 25 et 30° C. Pour les quelques explantats callogènes à 35° C, les bourgeons ne naissent que tardivement. Enfin les températures basses retardent ou inhibent le bourgeonnement, un seul bourgeon étant apparu après 27 jours de culture à 15° C et aucun après 35 jours à 10° C.

T° C.	T E M P S E N J O U R S						
	1	5	7	9	14	34	
10°	MF	783	774	771	744	732	682
	MS	46,9	48,1	54,6	54,7	67,9	87,2
	%	94	93,7	92,9	92,6	90,7	87,2
15°	MF	787	761	709	708	630	
	MS	42,4	50,9	55,1	60,3	68,1	
	%	94,3	93,3	92,2	91,4	89,1	
20°	MF	784	755	662	681		
	MS	45,1	55,1	56,3	63		
	%	94,2	92,6	91,4	90,7		
25°	MF	771	695	647			
	MS	46,4	53,1	60,5			
	%	93,9	92,3	90,6			
30°	MF	798	698				
	MS	48,1	57,4				
	%	93,9	91,7				



Tableau 4 : Variations des poids moyens de matière fraîche (M.F.), de matière sèche (M.S.) et pourcentage en eau (%) d'explantats cultivés à différentes températures et éclairés 12 heures par jour. Les poids sont exprimés en mg.

La température intervient également sur le développement des bourgeons dont les feuilles atteignent 10 mm après 12 jours de culture à 30° C alors qu'elles ne mesurent que 4 mm à 25° C et sont tout juste visibles à 20° C pour ce même laps de temps.

I.2. - Variations des poids de M.F., M.S. et du % en eau

Quelle que soit la température considérée, le poids de matière fraîche (M.F.) des explantats diminue constamment au cours de la culture (Tableau 4). Par contre, le poids de matière sèche (M.S.) augmente, cette augmentation peut être reliée, certes à la diminution du pourcentage en eau (% eau), mais aussi à une prolifération cellulaire active juste avant l'apparition du cal. Ce qui n'est pas le cas à 10° C où l'augmentation très sensible du poids de M.S. n'est pas suivie de l'apparition d'un cal et serait par conséquent liée à l'accumulation de composés indéterminés.

I.3. - Influence sur la formation des bourgeons

Température	Lumière 12h/j.	Obscurité
10°	0	0
15°	0,03	0,09
20°	0,97	0,48
25°	1,48	0,78
30°	1,23	0,50
35°	0,32	0,05



Tableau 5 : Action de la température sur le nombre de bourgeons produits par explantat de feuille étiolée après 40 jours de culture, en lumière 12/12 ou à l'obscurité.

Les résultats de l'influence de la température sur la néoformation de bourgeons par des explants de feuille étiolée cultivés pendant 40 jours soit à l'obscurité complète, soit éclairés 12 heures par jour sont consignés dans le tableau 5. Quelles que soient les conditions d'éclairage c'est à 25° C que le nombre de bourgeons produits est le plus important.

I.4. - Influence sur l'activité peroxydasique

Pour chaque température, comprises entre 10 et 30° C, nous avons suivi l'évolution de l'activité peroxydasique dès la mise en culture et jusqu'au jour d'apparition des cals (Figure 17).

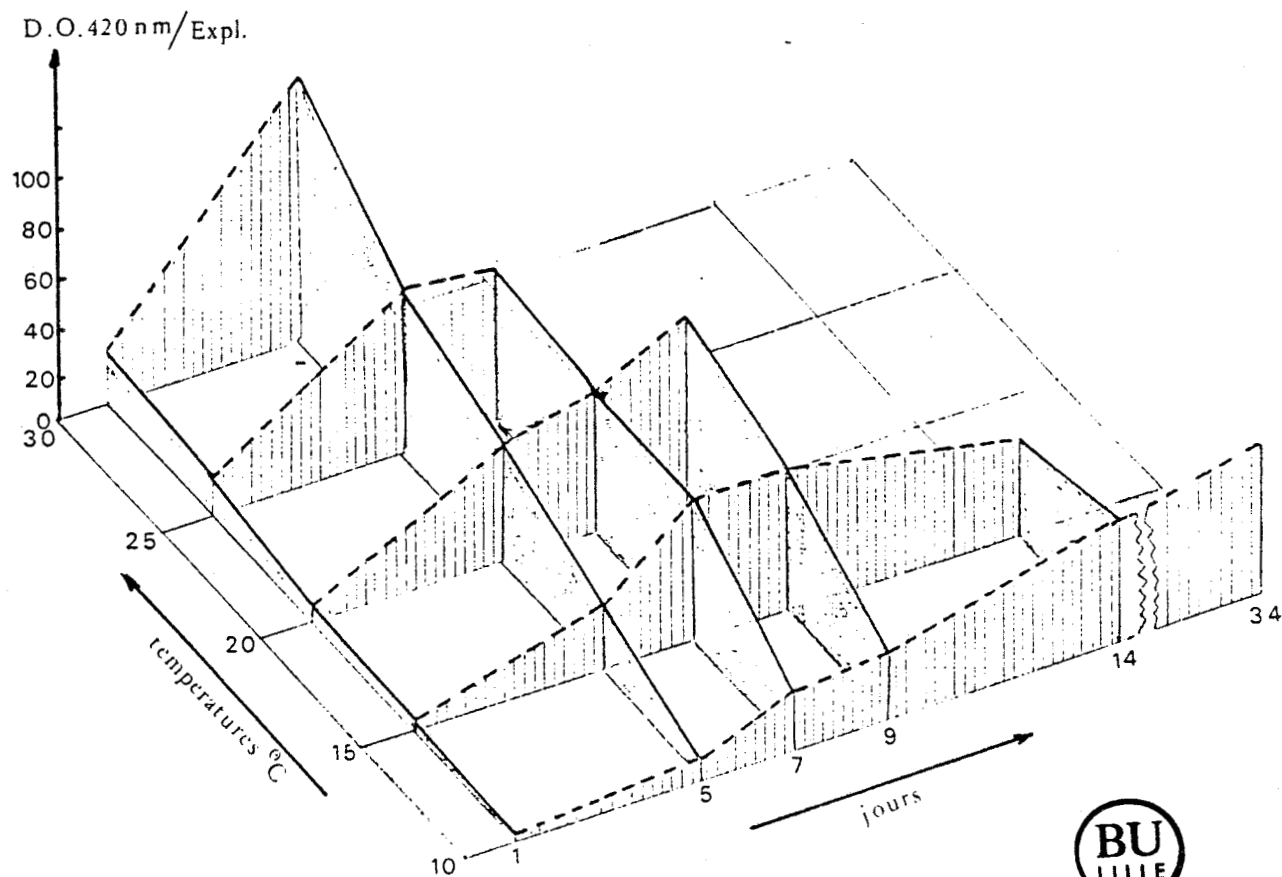


Figure 17 : Action de la température sur l'activité peroxydasique de tissus de feuilles d'Endive cultivés *in vitro*.

A 10° C, l'activité peroxydasique augmente progressivement et lentement jusqu'au trente quatrième jour;

Elle augmente faiblement du premier au cinquième jour, puis croît sensiblement du cinquième au septième, se stabilise alors jusqu'au neuvième jour pour diminuer ensuite quand les explantats sont cultivés à 15°C.

A 20 et 25° C les courbes d'activité ont un profil identique à celui de la courbe obtenue à la température de 15° C mais les valeurs sont plus élevées.

A 30° C, l'activité peroxydasique croît fortement pendant les cinq premiers jours de culture.

Si on compare les activités peroxydasiques après 5 jours de culture on constate que plus la température est élevée plus l'activité peroxydasique est importante.

II - ACTION DE LA LUMIERE

II.1. - Influence de l'intensité de l'éclairement

En rapprochant plus ou moins les tubes de culture des sources de lumière, l'intensité de l'éclairement perçu au niveau des tubes varie de 500 à 6000 Lux. Pour ces essais nous avons choisi une photopériode de 12/12 et placé un lot à l'obscurité (Tableau 6).

Les explantats maintenus à l'obscurité présentent toujours moins de bourgeons que ceux éclairés, quelle que soit l'intensité de l'éclairement.

Après 40 jours de culture, sous un éclairement de 6000 Lux le nombre de bourgeons néoformés est légèrement inférieur à celui observé lorsque l'intensité de l'éclairement est de 3000 ou 1500 Lux.

Intensité de l'éclairage	6000	3000	1500	450	Obscurité
Nombre moyen de bourgeons	1,45	1,60	1,65	1,40	0,65

Tableau 6 : Nombre moyen de bourgeons produits par des explantats de feuille étiolée en fonction de l'intensité de l'éclairage (lux).

L'éclairage intervient également sur le développement des bourgeons.

A l'obscurité, les feuilles restent petites, à l'état d'écailles blanchâtres, appliquées contre la tige qui se développe de façon anormale, caractéristique des tissus étiolés.

A la lumière, au contraire, la tige reste courte et les feuilles verdissent et se développent vigoureusement.

II.2. - Influence de photopériodes variées

II.2.1. - Sur la néoformation des bourgeons.

Les tissus de feuille ont été cultivés sur milieu de base pendant 40 jours et soumis à un éclairage journalier de 6,12 ou 18 heures. Les lots de référence ont été maintenus à l'obscurité complète ou à la lumière continue, à la température de 25° C.

Les résultats consignés dans le tableau 7 indiquent qu'un éclairage journalier, même de faible durée (6 heures) favorise la néoformation des bourgeons par rapport à celle obtenue en nyctipériode. L'allongement de l'héméroperiode n'influence que très peu le rendement du bourgeonnement.

Durée de l'éclair- ement journalier/ H.	0	6	12	18	24
Nombre moyen de bourgeons/expl.	0,69	1,29	1,48	1,31	1,41
% de bourgeons appa- rus dans la région apicale de l'expl.	8,8	22,5	29,2	25,6	28,6

Tableau 7 : Action de la photopériode sur le nombre moyen de bourgeons produits par des explantats de feuille après 40 jours de culture.

Nous constatons également que lorsque le nombre de bourgeons augmente, le pourcentage de ceux qui apparaissent à l'apex s'accroît (Tableau 7), pour les tissus cultivés à l'obscurité il est de 8 % alors que pour les tissus éclairés continuellement il est de 30 %. Il est donc possible que le développement de méristèmes caulinaires initiés dans la région apicale de l'explantat soit inhibé à l'obscurité.

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons éclairés pendant 20 jours des tissus cultivés préalablement pendant 40 jours à l'obscurité (Tableau 8).

	Nombre moyen de bourgeons par expl.	% de bourgeons dans la région apicale
40 j. obscurité	0,78	8,2
40 j. obscurité + 20 j. lumière	0,92	12,6
60 j. lumière	1,60	28,3

Tableau 8 : Influence de 20 jours de lumière continue sur la néoformation de bourgeons par des tissus de feuille étiolée, cultivés au préalable pendant 40 jours à l'obscurité.



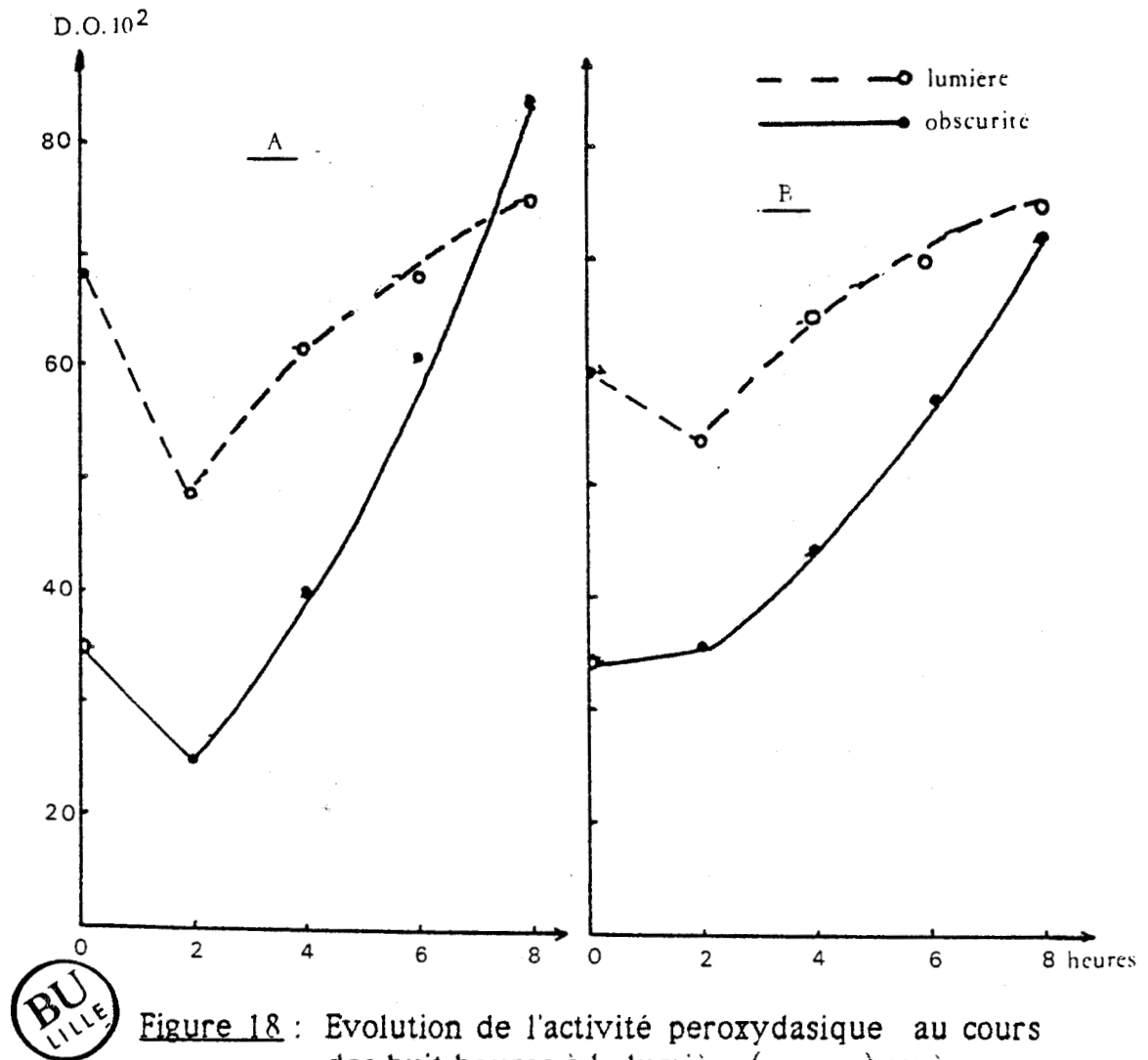


Figure 18 : Evolution de l'activité peroxydasique au cours des huit heures à la lumière (-----) ou à l'obscurité (—) suivant le passage nuit-jour ou jour-nuit de tissus de feuille étiolée, éclairés 12h/jour pendant 4 jours.

Au cours de ces vingt jours supplémentaires, le pourcentage de bourgeons apparus dans la région apicale augmente faiblement, mais cette augmentation est insuffisante pour confirmer l'hypothèse d'une inhibition au développement des ébauches gemmaires par l'obscurité.

II.2.2. - Sur l'activité peroxydasique

II.2.2.1. - Mise au point technique

Bien que nos essais aient porté sur un grand nombre d'explantats, nous constatons dans nos échantillons de grandes différences d'activité peroxydasique, selon le moment du prélèvement.

Lors de la mise en culture, nous avons alors réparti les explantats, en deux lots, éclairés l'un et l'autre 12 heures par jour, mais de telle sorte que lorsqu'un lot est éclairé, l'autre est à l'obscurité. Après quatre jours de culture, nous avons dosé l'activité peroxydasique des explantats toutes les deux heures, pendant les huit heures qui suivent soit le passage à la lumière, soit le passage à l'obscurité (Figure 18).

Après 4 jours de culture, les tissus ont donc tous été soumis à une alternance de 12 heures de lumière par jour, mais au moment du prélèvement les uns viennent de subir 12 heures de lumière et les autres 12 heures d'obscurité, ces derniers qui ne diffèrent que par le moment d'application de la période lumineuse ont cependant une activité peroxydasique plus importante.

Deux heures de lumière, précédées par douze heures d'obscurité provoquent une baisse de l'activité peroxydasique (Figure 18 A et B). Alors que deux heures d'obscurité appliquées après douze heures de lumière diminuent (Figure 18 A) ou ne modifient pas (Figure 18 B) l'activité peroxydasique des tissus.

Pendant la période d'obscurité, l'activité peroxydasique augmente beaucoup plus nettement que pendant l'héméropériode.

D'après ces résultats, il apparaît que le moment de prélèvement des tissus jouent un rôle important. C'est pourquoi quand nous employons la condition photopériodique 12/12, nous mesurons l'activité peroxydasique 4 heures après la passage nuit-jour.

II.2.2.2. - Evolution des activités peroxydasiques de tissus maintenus à l'obscurité, éclairés continuellement ou douze heures par jour.

Si les tissus sont cultivés en héméroperiode de 12 heures pour des cycles photopériodiques de 24 heures et prélevés 4 heures après le passage nuit-jour, l'activité peroxydasique augmente dès la mise en culture, présente un optimum vers le sixième jour puis diminue ensuite progressivement (Figure 19)

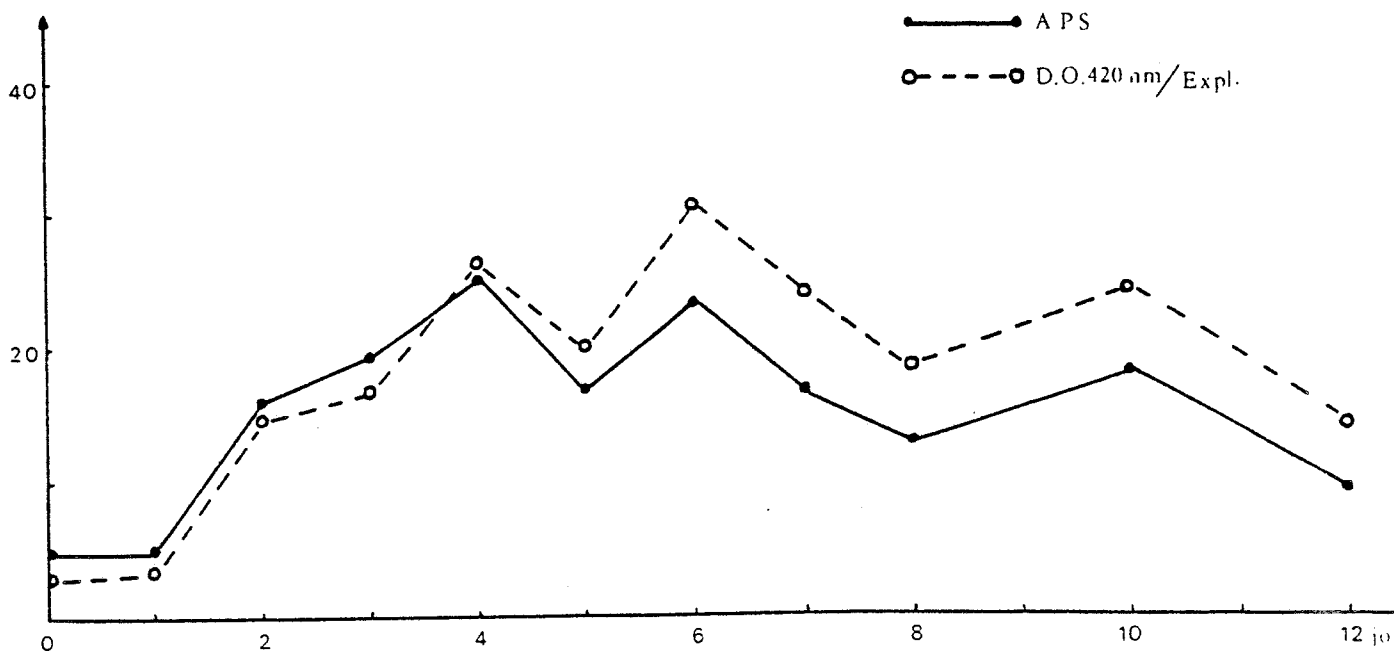


Figure 19 : Evolution de l'activité peroxydasique au cours de la culture de fragments de feuille étiolée éclairés 12 heures par jour. Les tissus ont été prélevés 4 heures après le passage nuit-jour.

En lumière continue (Figure 20) l'activité peroxydasique augmente également pendant six jours, diminue jusqu'au huitième jour puis augmente à nouveau mais beaucoup moins rapidement que pendant les six premiers jours. L'activité peroxydasique spécifique au contraire diminue à partir du sixième jour.

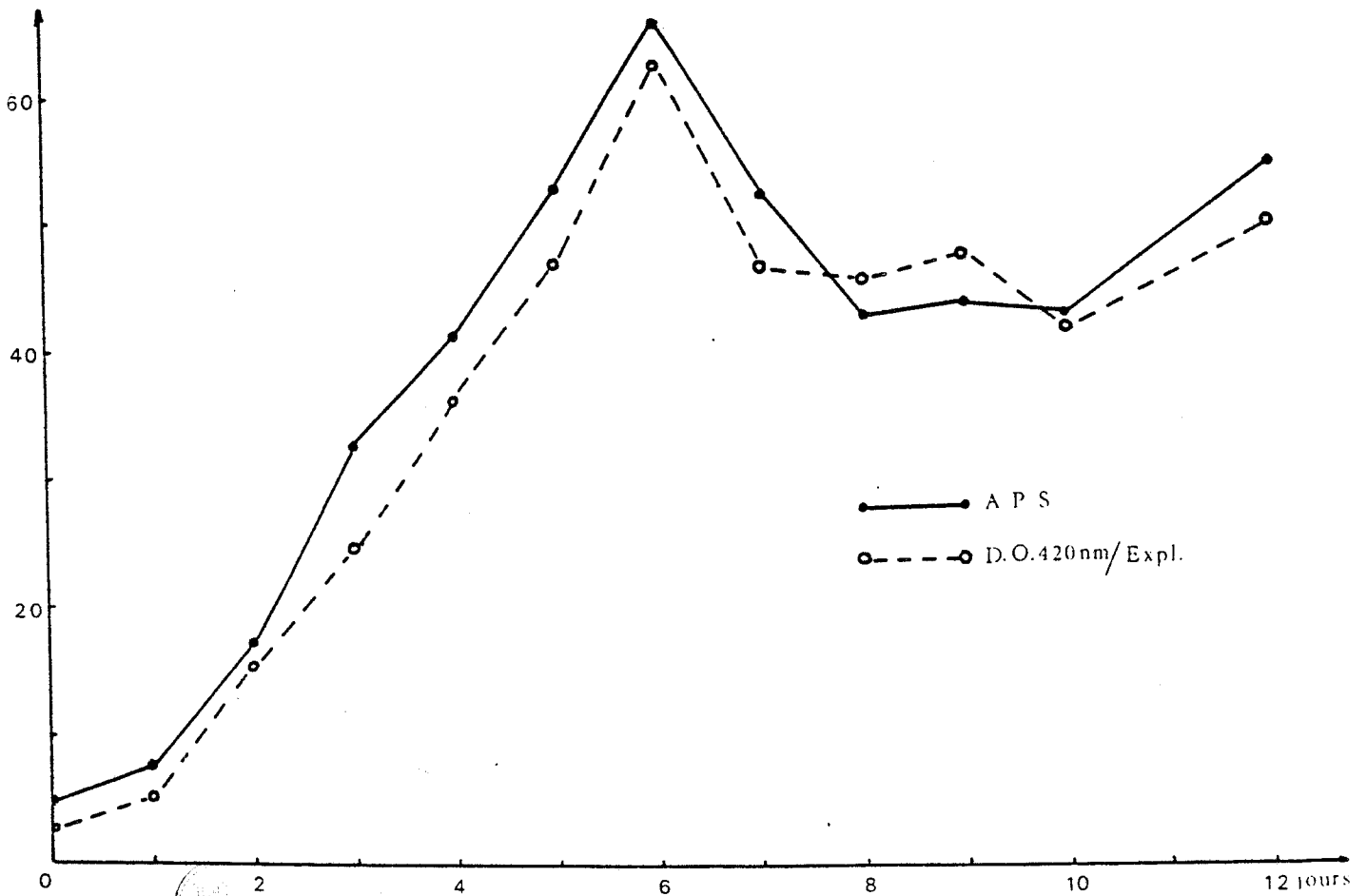


Figure 21 : Evolution de l'activité peroxydasique au cours de la culture de fragments de feuille étiolée maintenus continuellement à l'obscurité.

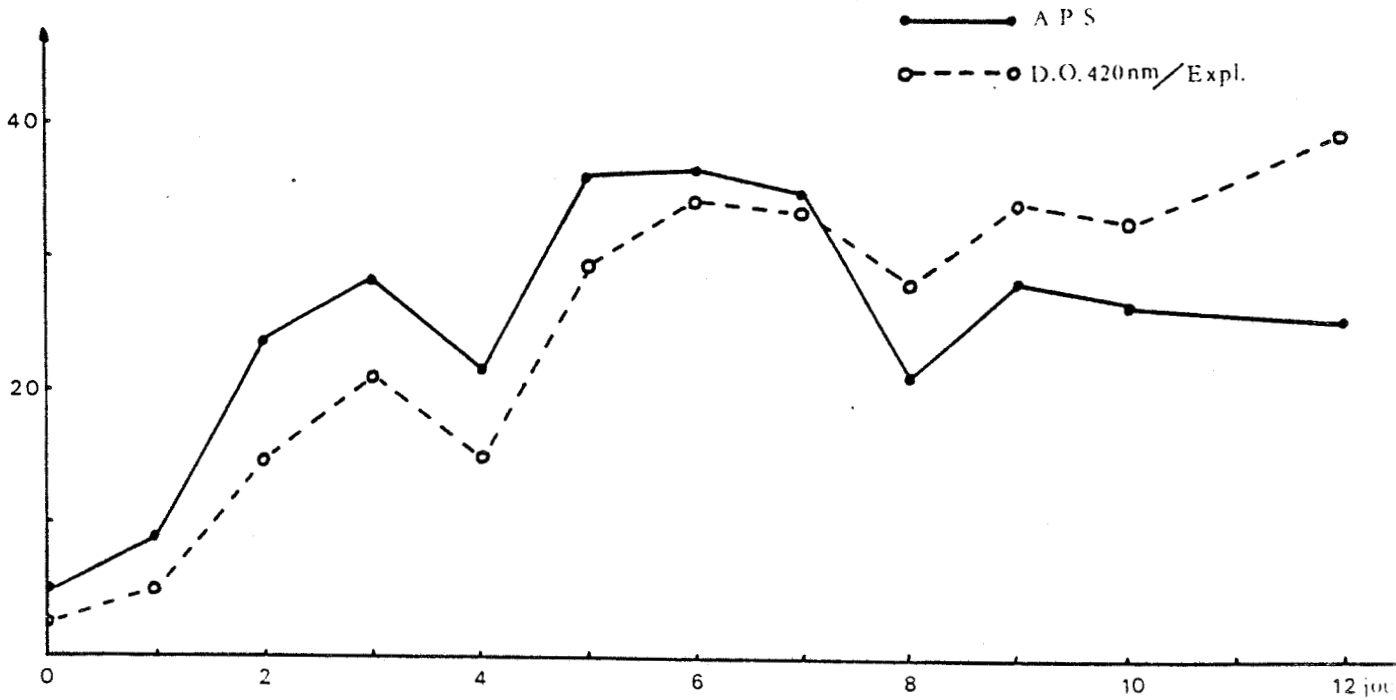


Figure 20 : Evolution de l'activité peroxydasique au cours de la culture de fragments de feuille étiolée éclairés continuellement.



A l'obscurité on assiste à une augmentation considérable de l'activité peroxydasique pendant six jours puis celle-ci diminue, se stabilise pendant trois jours et augmente légèrement (Figure 21).

Les valeurs absolues des activités peroxydasiques sont sensiblement les mêmes dans les tissus éclairés continuellement ou douze heures par jour, alors qu'elles sont nettement plus importantes quand les explantats sont maintenus à l'obscurité.

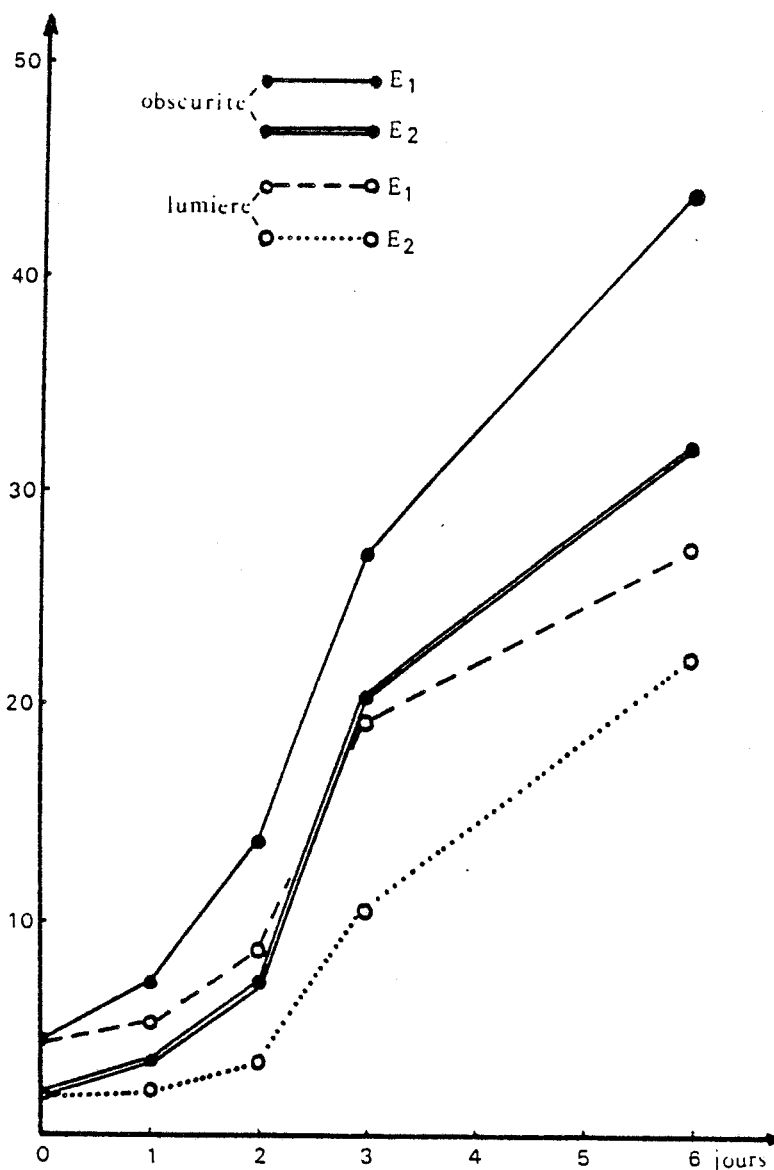


Figure 22 : Evolution des activités des peroxydases solubles (E_1) et des peroxydases liées ioniquement (E_2) au cours de la culture de fragments de feuille étiolée.

II.2.2.3. - Activités peroxydasiques et isoperoxydases des fractions E_1 , E_2 , E_3 .

L'examen de la figure 22 montre qu'il existe un parallélisme constant entre les variations des activités peroxydasiques des fractions soluble (E_1) et ionique (E_2) d'explantats cultivés à la lumière ou à l'obscurité.

L'activité peroxydasique de la fraction covalente (E_3) qui était déjà très faible (à peine 10 % de l'activité globale) avant la mise en culture (Figure 10), n'est plus décelable après 24 heures de culture.

Les zymogrammes des peroxydases solubles sont les mêmes quelles que soient les conditions d'éclairage (Figure 23). Après un jour de culture, deux nouvelles isoperoxydases C_5 et C_6 sont révélées du côté cathodique, ensuite le profil isoperoxydasique ne varie plus. Dans la fraction soluble il existe donc 3 isoperoxydases cathodiques (basiques) et deux isoperoxydases anodiques (acides).

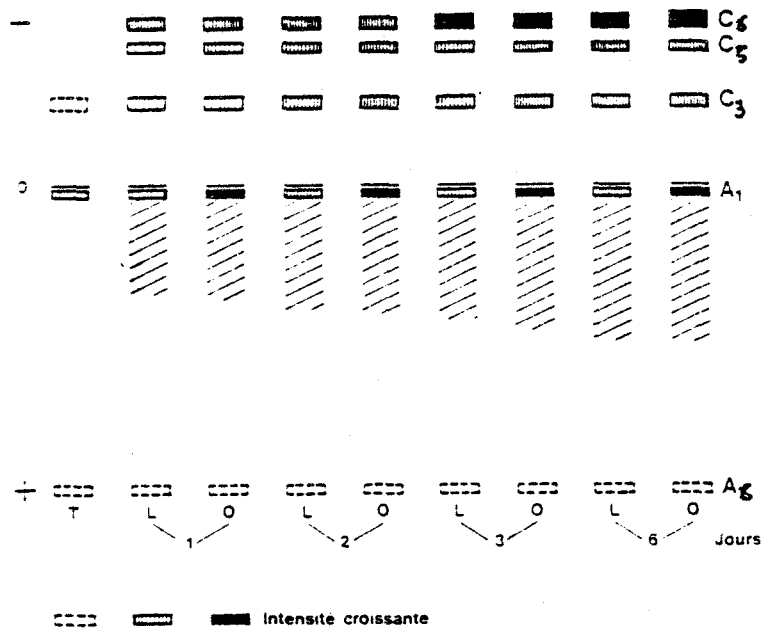


Figure 23 : Zymogramme des peroxydases solubles au cours de la culture à la lumière (L) ou à l'obscurité (O) de fragments de feuille étiolée.

T représente la composition isoperoxydasique de feuilles fraîchement récoltées.

Les conditions d'éclairement ne provoquent pas de différences dans la composition en isoperoxydases de la fraction ionique (Figure 24). On trouve, après 24 heures de culture trois nouvelles isoperoxydases cathodiques (C₁, C₄ et C₅) et une anodique (A₁), mais l'anodique A₄ révélée dans les tissus avant l'ensemencement n'est plus décelable. Après 6 jours de culture aucune autre modification du profil isoperoxydasique n'est constatée, on notera néanmoins que l'activité de l'isoenzyme C₁ est plus forte à l'obscurité qu'à la lumière.

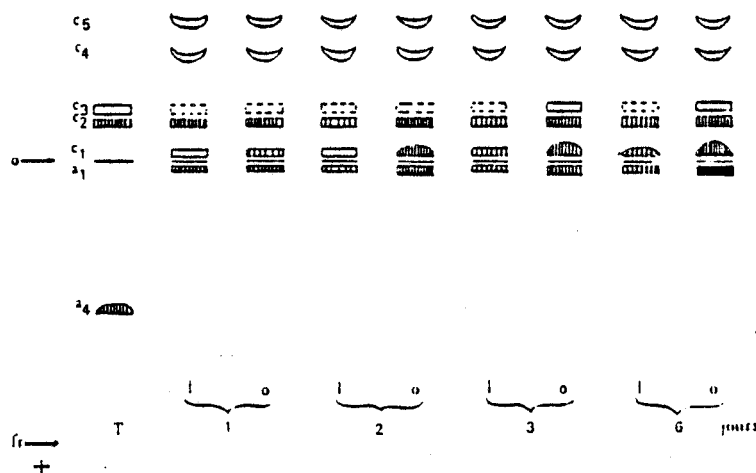


Figure 24 : Zymogramme des peroxydases ioniques au cours de la culture, à la lumière (L) ou à l'obscurité (O) de fragments de feuille étiolée. T représente la composition isoperoxydasique de feuilles fraîchement récoltées.

Après 24 heures de culture aucune isoperoxydase de la fraction covalente n'a pu être mise en évidence.

II.2.2.4. - Activités peroxydasiques et isoperoxydases dans les néoformations et dans les tissus primaires après 40 jours de culture.

Nous avons mesuré l'activité peroxydasique et analysé, après 40 jours de culture, la composition en isoperoxydases des néoformations (cal, bourgeon, racine) et des tissus primaires qui génèrent ces dernières.

	L U M I E R E			O B S C U R I T E		
	APF	P	APS	APF	P	APS
Tissus primaires	1,50	50,6	29,64	3,10	81,1	38,22
Cals	5,37	160,1	33,57	6,0	137,3	43,69
Bourgeons	6,52	353	18,47	3,57	147	24,31
Racines	7,40	336	22,02	10,30	157	65,60

Tableau 9 : Activité des peroxydases solubles dans les néoformations (cal, bourgeon et racine) et dans les tissus primaires après 40 jours de culture.

En fin de culture et dans nos conditions expérimentales il apparait parfois des racines qui naissent à la base des bourgeons néoformés

APF = activité peroxydasique pour 100 mg de PF

P = teneur en protéines ug pour 100 mg de PF

APS = activité peroxydasique spécifique.



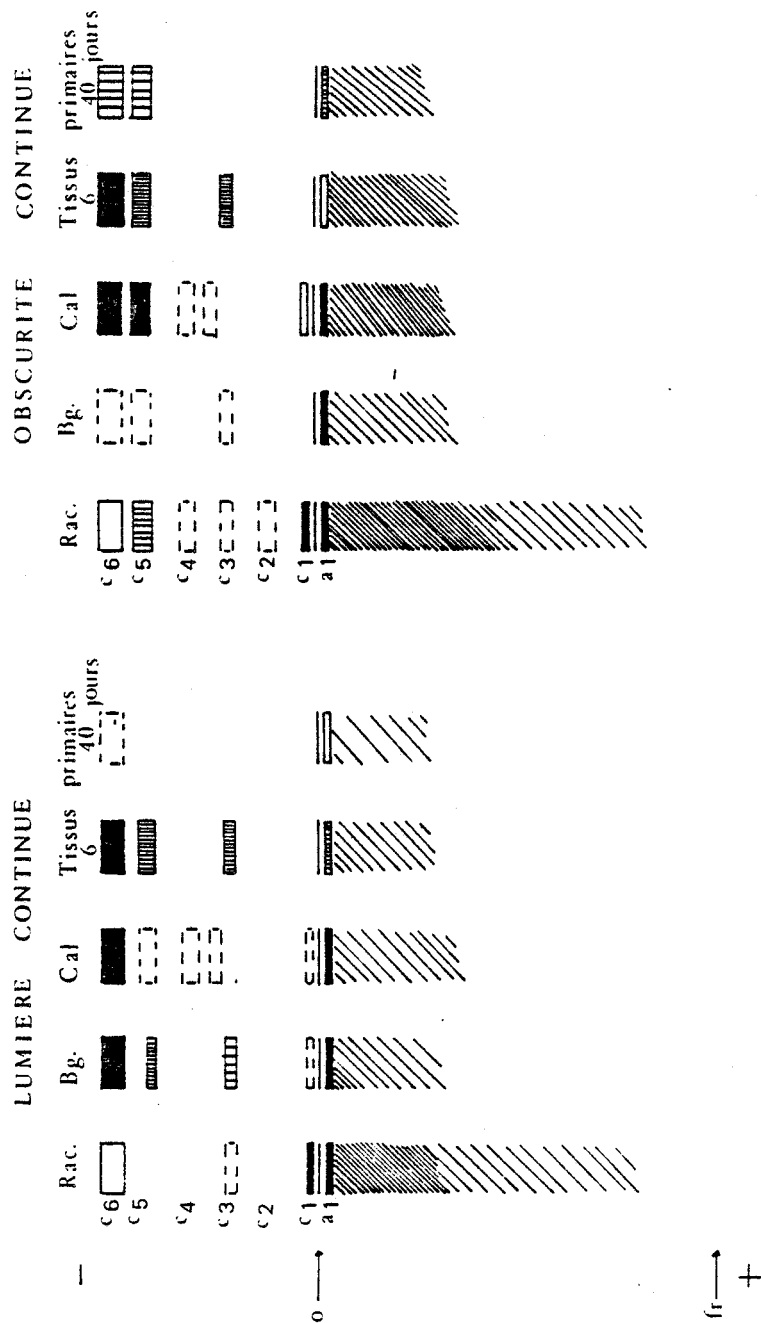


Figure 25 : Zymogramme des peroxydases solubles dans les néoformations (racine, bourgeon et cal) et dans les tissus primaires après 40 jours de culture avec référence aux tissus primaires âgés de 6 jours.

L'activité peroxydasique des tissus primaires est très faible après 40 jours de culture. Elle est inférieure à celle trouvée dans les cals (Tableau 9). Lorsque les tissus sont cultivés à la lumière, il existe très peu de différences entre les activités peroxydasiques des cals, des bourgeons ou des racines quand elles sont rapportées à 100 mg de matière fraîche ; par contre si nous comparons les activités spécifiques, celle du cal est la plus forte.

A l'obscurité, l'activité peroxydasique des bourgeons néoformés est environ deux fois plus faible que celle du cal et quatre fois inférieure à celle des racines qu'il s'agisse d'activité spécifique ou d'activité rapportée à 100 mg de matière fraîche.

Ces différences d'activités se traduisent par des différences dans la composition isoperoxydasique des différents organes ou tissus (Figure 25);

Nous ne nous intéresserons qu'aux isoperoxydases cathodiques, l'anodique A₁ étant présente dans les différentes parties de l'explantat.

Les isoenzymes C₃ et C₅ et, l'isoenzyme C₅ des tissus primaires cultivés à la lumière ou à l'obscurité ont disparu alors qu'elles existaient dans les tissus âgés de 6 jours.

Les cals ont des compositions isoperoxydasiques identiques qu'ils proviennent d'explantats éclairés ou non. En plus des isoenzymes existantes dans les tissus primaires on note la présence des isoperoxydases C₁ et C₄. Les intensités de coloration, donc des activités, de C₁ et C₅ sont plus fortes dans les cals néoformés à l'obscurité.

Si les bourgeons sont apparus à l'obscurité, leur composition isoperoxydasique est identique à celle trouvée dans les tissus primaires après 6 jours de culture. Si les bourgeons se sont développés à la lumière on note, en plus, la présence de l'isoenzyme C₁.

De nombreuses isoperoxydases sont décelées dans les racines néoformées à l'obscurité, en plus de toutes celles déjà citées apparaît l'isoenzyme C₂, tandis que dans les racines qui naissent à la lumière seules les isoperoxydases C₁, C₃ et C₆ sont présentes.

II.3. - Influence de la durée d'éclairnement

D'après les expériences précédentes, la lumière n'est pas indispensable à la formation des bourgeons, mais à l'obscurité leur nombre est considérablement réduit. Nous avons des lors vérifié l'influence de différentes périodes d'éclairnement ou d'obscurité sur la néoformation des bourgeons.

II.3.1. - Action d'héméroperiodes ou de nyctipériodes de durée variable.

Les tissus sont placés à l'obscurité puis après 3, 6, 9 ou 12 jours de culture, transportés à la lumière continue. Les essais inverses ont aussi été réalisés, c'est-à-dire que les tissus exposés à la lumière continue sont transférés à l'obscurité après 3, 6, 9 ou 12 jours. Les lots de référence sont constitués par des explantats maintenus continuellement à l'obscurité ou éclairés pendant toute la durée de l'expérience.

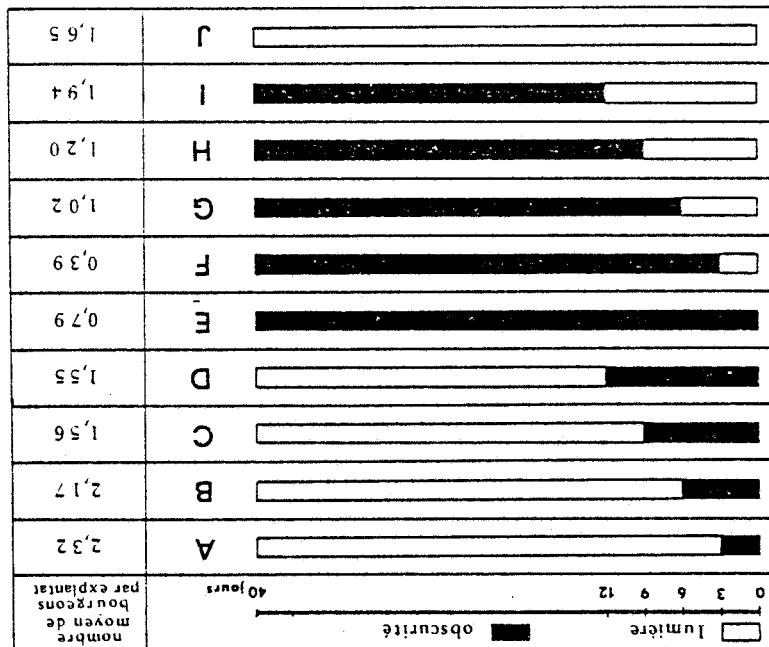


Figure 26 : Influence des conditions initiales d'éclairnement sur la néoformation des bourgeons par les tissus de feuille étiolée.

Les résultats résumés dans la figure 26 confirment que le nombre de bourgeons est plus important à la lumière continue qu'à l'obscurité. Ils montrent aussi que plus la nyctipériode initiale est longue, plus le bourgeonnement est réduit. Inversement si les tissus sont éclairés au début de la culture et qu'ils sont ensuite placés à l'obscurité la néoformation des bourgeons est d'autant plus importante que la durée de la période d'éclairement est longue.

Notons toutefois que 12 jours de lumière en début de culture sont aussi efficaces qu'un traitement continu de 40 jours, ce qui n'est pas étonnant puisqu'à 25° C les bourgeons apparaissent après 10 jours de culture;

Ici encore et comme dans l'expérience mettant en jeu la photopériode, nous pouvons constater (Tableau 10) que la lumière et l'obscurité n'agissent pas seulement sur le nombre de bourgeons néoformés mais aussi sur leur lieu d'apparition, c'est-à-dire sur l'expression de la polarité des explantats.

A.....	20,2	F.....	8,3
B.....	10,3	G.....	18,6
C.....	12,0	H.....	20,0
D.....	8,0	I.....	34,1
E.....	5,0	J.....	31,8

Tableau 10 : Influence des conditions d'éclairement sur la répartition des bourgeons produits par des fragments de feuille étiolée.
(Les conditions représentées par des lettres sont définies dans la figure 25. Les résultats sont exprimés en pourcentage de bourgeons apparus dans la région apicale des explantats).

Plus la période d'obscurité est longue, plus la polarité est marquée.

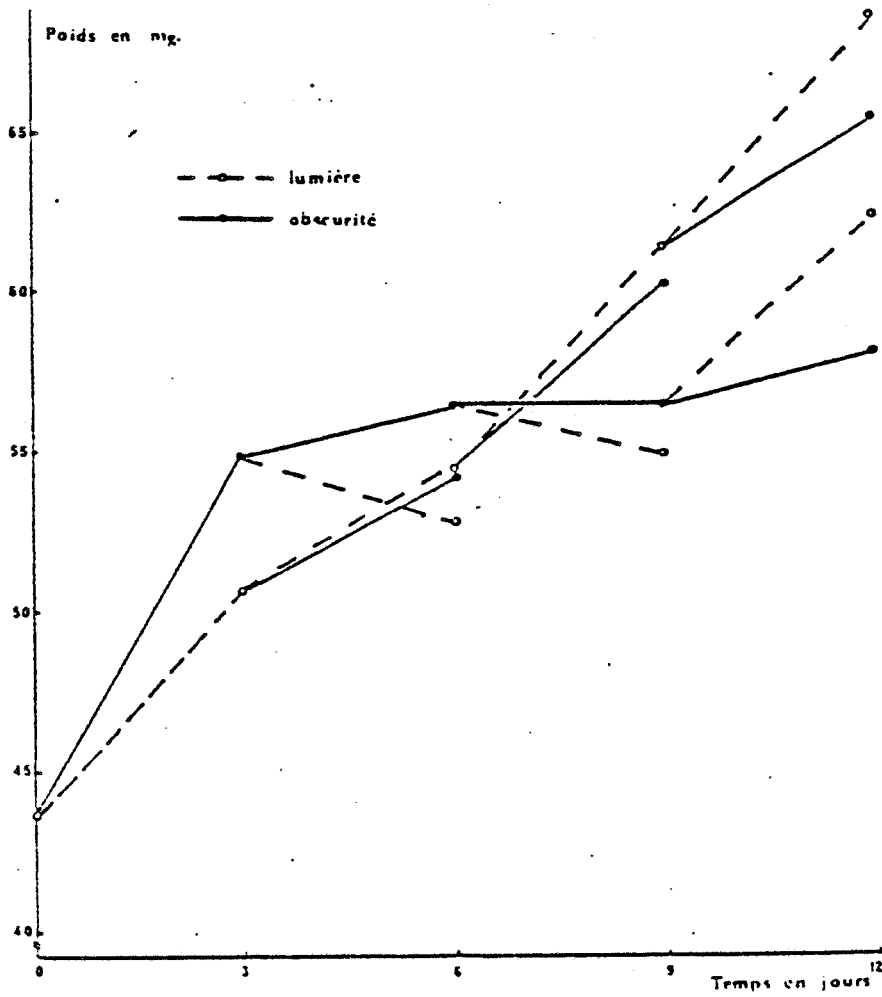


Figure 27 : Variations du poids moyen de matière sèche d'explantats de feuille en fonction de l'éclaircment.



II.3.2. - Influence du moment d'application de périodes lumineuses ou obscures d'égale durée.

Dans l'expérience précédente nous pouvons remarquer qu'il y a moins de bourgeons en lumière continue que lorsque les tissus sont soumis initialement à 3 jours d'obscurité. Inversement il y a moins de bourgeons quand on éclaire pendant les trois premiers jours de culture que lorsque les explantats sont soumis à l'obscurité totale pendant quarante jours.

Nous nous sommes demandé quel serait l'effet de traitements identiques mais décalés dans le temps au cours de la culture, sur la prolifération cellulaire, le nombre de bourgeons néoformés et l'activité peroxydasique.

Pour les tissus placés à la lumière, l'éclairement continu est interrompu par une période de trois jours d'obscurité, intervenant soit dès la mise en culture, soit à différents moments au cours des douze premiers jours de culture. De la même façon pour les lots cultivés à l'obscurité, celle-ci est interrompue par trois jours de lumière fournis pendant les douze premiers jours de culture.

II.3.2.1. - Influence sur la croissance

Dans tous les cas, la quantité de matière sèche augmente au cours de la culture (Figure 27).

Cette augmentation est plus importante et plus graduelle à la lumière, alors qu'à l'obscurité elle est rapide en début de culture et s'affaiblit après le sixième jour.

L'exposition à la lumière de tissus cultivés à l'obscurité provoque une diminution de la M.S., si elle intervient au cours des six premiers jours de culture, mais l'augmente à partir du neuvième jour. Quand les explantats cultivés à la lumière sont placés à l'obscurité l'effet est peu sensible au début de la culture, mais à partir du neuvième jour l'obscurité ralentit la prolifération.

II.3.2.2. - Influence sur la néoformation des bourgeons

Les résultats résumés dans la figure 28 montrent que les explantats éclairés pendant les trois premiers jours portent moins de bourgeons que ceux cultivés constamment à l'obscurité. Si l'éclairage intervient du troisième au sixième jour de culture, l'inhibition est encore plus forte. Au contraire si les trois jours de lumière sont fournis après six jours d'obscurité on enregistre un effet stimulant.

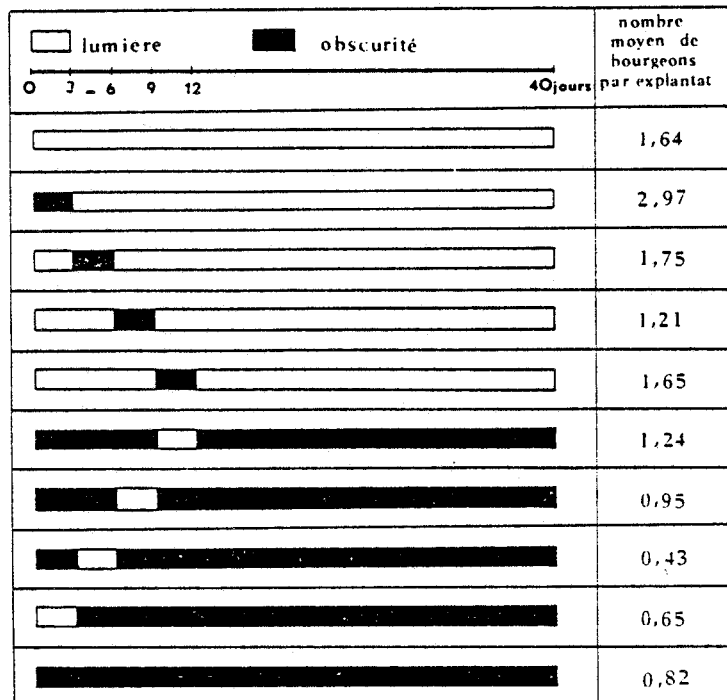


Figure 28 : Influence des conditions d'éclairage sur la néoformation des bourgeons par les tissus de feuille étiolée.

Si les explantats sont soumis à trois jours d'obscurité avant d'être placés à la lumière continue, il y a plus de bourgeons que lorsque les tissus sont maintenus constamment à la lumière. Si la période obscure se situe entre le troisième et le sixième jour de culture le nombre de bourgeons est légèrement supérieur à celui obtenu en lumière continue mais ceci est moins sensible que dans le cas précédent.

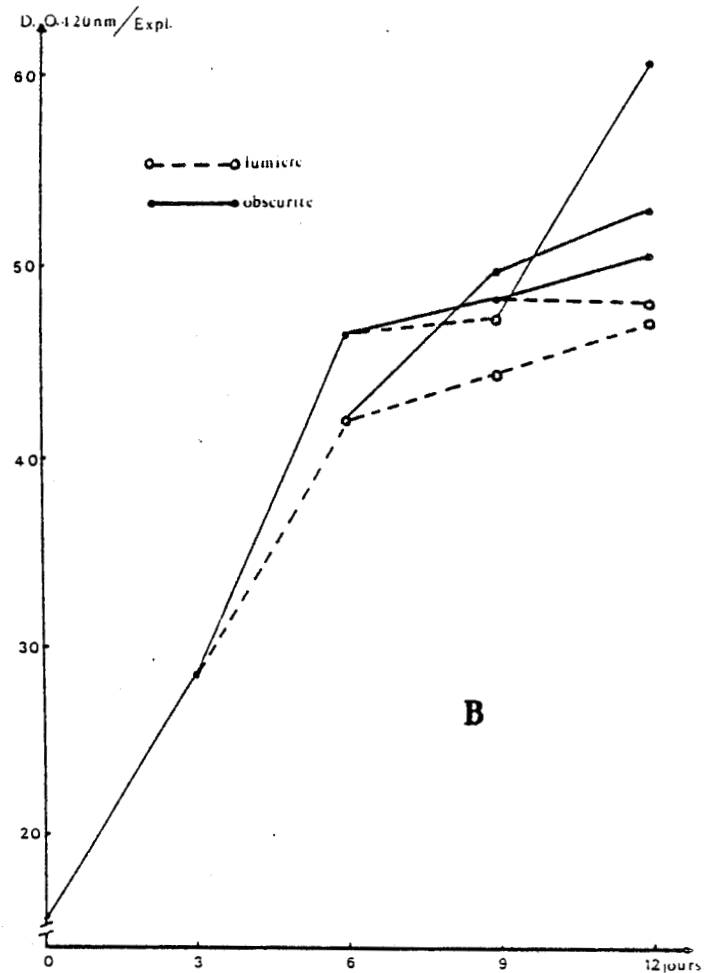
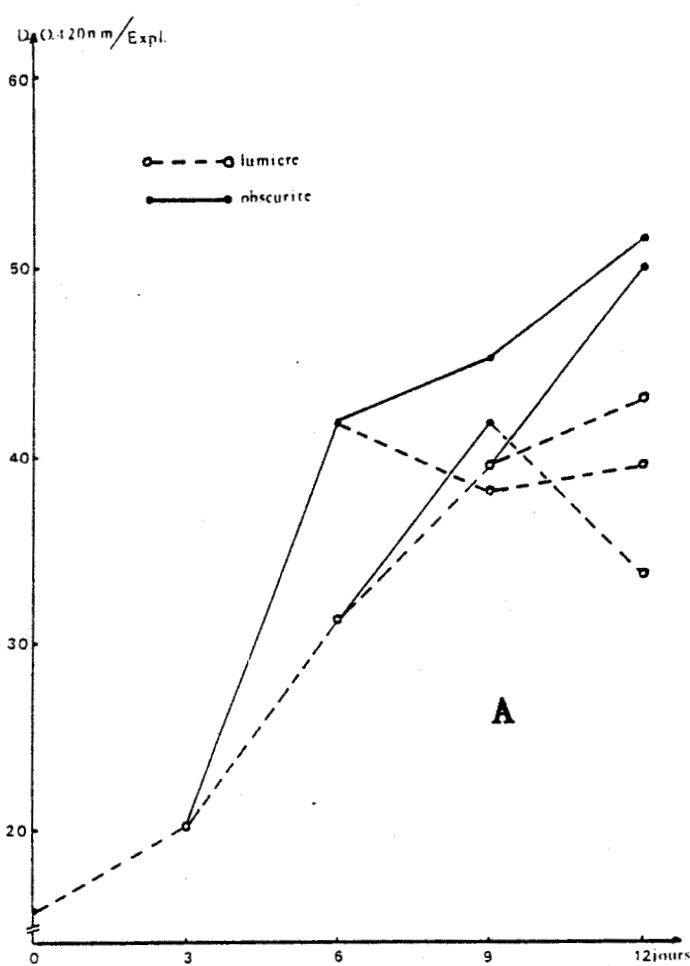


Figure 29 : Influence des modifications des conditions d'éclairage sur l'activité peroxydasique de fragments de feuille étiolée d'Endive soumis :

- A : initialement à 3 jours de lumière continue.
- B : initialement à 3 jours d'obscurité.

Si la nyctipériode intervient entre le sixième et le neuvième jour, c'est-à-dire après six jours de lumière au début de la culture, l'effet inhibiteur de la lumière est encore plus manifeste, alors que la même période obscure fournie plus tardivement ne modifie pratiquement pas le bourgeonnement.

La lumière exerce donc, au début de la culture, un effet inhibiteur sur le nombre de bourgeons néoformés. Après le sixième jour au contraire elle stimule le bourgeonnement.

II.3.2.3. - Influence sur l'activité peroxydasique

L'activité peroxydasique est mesurée sur des explantats prélevés tous les trois jours au moment des changements d'éclairement (Figure 29).

L'activité peroxydasique d'explantats d'abord éclairés augmente pendant leur séjour à l'obscurité. Quand ils sont, après trois jours, de nouveau éclairés, leur activité peroxydasique diminue. Par contre, s'ils sont maintenus à l'obscurité leur activité peroxydasique évolue comme celle des tissus continuellement privés de lumière mais avec des valeurs légèrement plus faibles (Figure 29 A).

Inversement, l'activité peroxydasique d'explantats placés à l'obscurité dès l'ensemencement diminue au cours de leur passage à la lumière et augmente à nouveau s'ils en sont privés ; la perte d'activité n'est pas compensée si les tissus sont maintenus à la lumière, mais les valeurs d'activité sont supérieures à celles trouvées pour un tissu continuellement éclairés (Figure 29 B).

L'intervention de la lumière ou de l'obscurité sur l'activité peroxydasique pendant les premiers jours de culture peut être reliée aux effets sur le bourgeonnement (Figure 30).

- L'activité peroxydasique d'explantats cultivés trois jours à l'obscurité est plus forte que celle d'explantats éclairés. Si ces derniers, après trois jours sont privés de lumière, leur activité peroxydasique évolue



○-----○ lumière
 ●————● obscurité

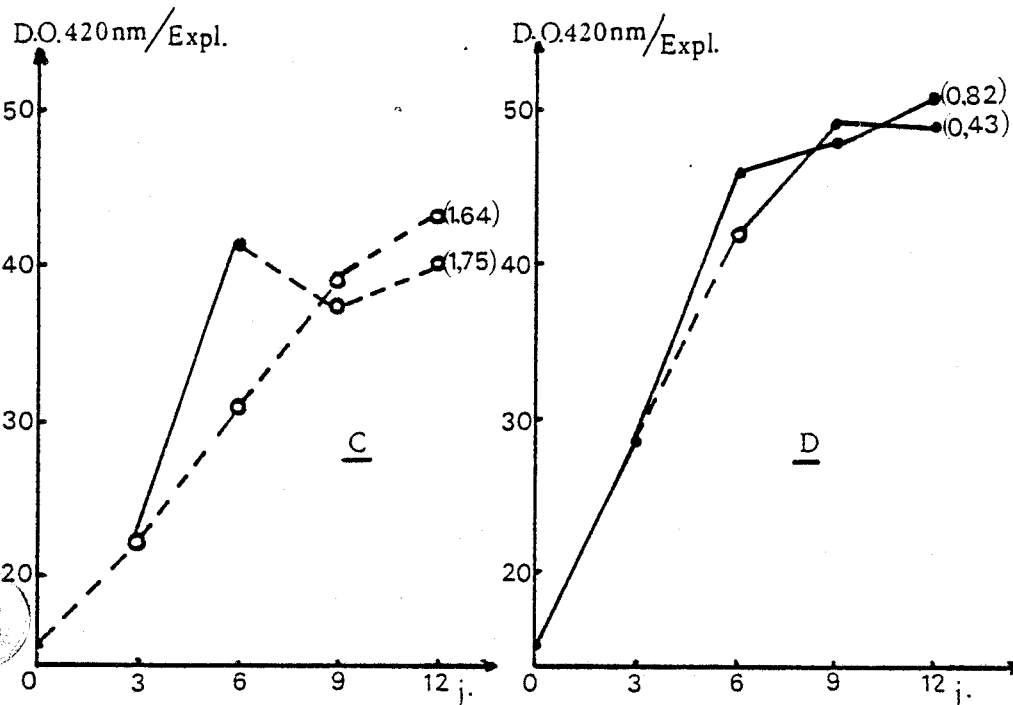
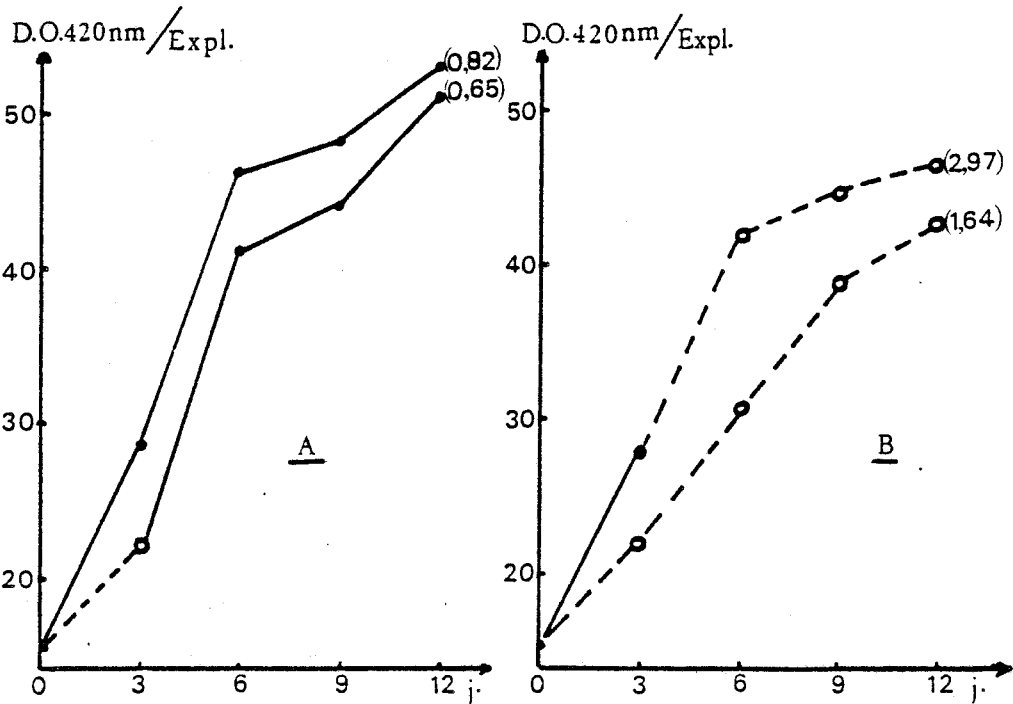


Figure 30 : Modifications de l'activité peroxydasique par des périodes lumineuse (-----) ou obscure (——) de 3 jours et influence de ces modifications sur la production ultérieure de bourgeons. Les bourgeons (entre parenthèses) sont dénombrés après 40 jours de culture.

parallèlement à celle des tissus maintenus constamment à l'obscurité, mais à un niveau moins élevé et leur capacité néoformatrice de bourgeons est plus faible (Figure 30 A).

- Inversement, il y a plus de bourgeons néoformés sur des explantats qui, d'abord maintenus 3 jours à l'obscurité, sont ensuite éclairés et, corrélativement l'activité peroxydasique, plus élevée après trois jours de

- Inversement, il y a plus de bourgeons néoformés sur des explantats qui, d'abord maintenus 3 jours à l'obscurité, sont ensuite éclairés et, corrélativement l'activité peroxydasique, plus élevée après trois jours de culture à l'obscurité, conserve sa supériorité au cours de la culture (Figure 30 B).

- Les tissus d'abord éclairés pendant trois jours puis privés de lumière du troisième au sixième jour et enfin éclairés à nouveau présentent plus de bourgeons que ceux continuellement éclairés. Le passage à l'obscurité a provoqué une augmentation de l'activité peroxydasique, avant la néoformation des bourgeons (Figure 30 C).

- De même, trois jours de lumière, entre le troisième et le sixième jour, d'explantats cultivés par ailleurs à l'obscurité, provoquent une diminution de l'activité peroxydasique par rapport à celle des tissus maintenus à l'obscurité et cette diminution se traduit par un bourgeonnement moins important des tissus (Figure 30 D).

II.4. - Influence de la qualité de la lumière

L'éclairage des tissus dans les expériences précédentes est réalisé au moyen de tubes luminescents type "Lumière du jour" dont le spectre est large. Nous avons voulu savoir si certaines longueurs d'onde jouaient un rôle sur le bourgeonnement et sur l'activité peroxydasique. Pour cela, les tissus sont éclairés par des lumières relativement monochromatiques pendant toute la durée de l'expérience.

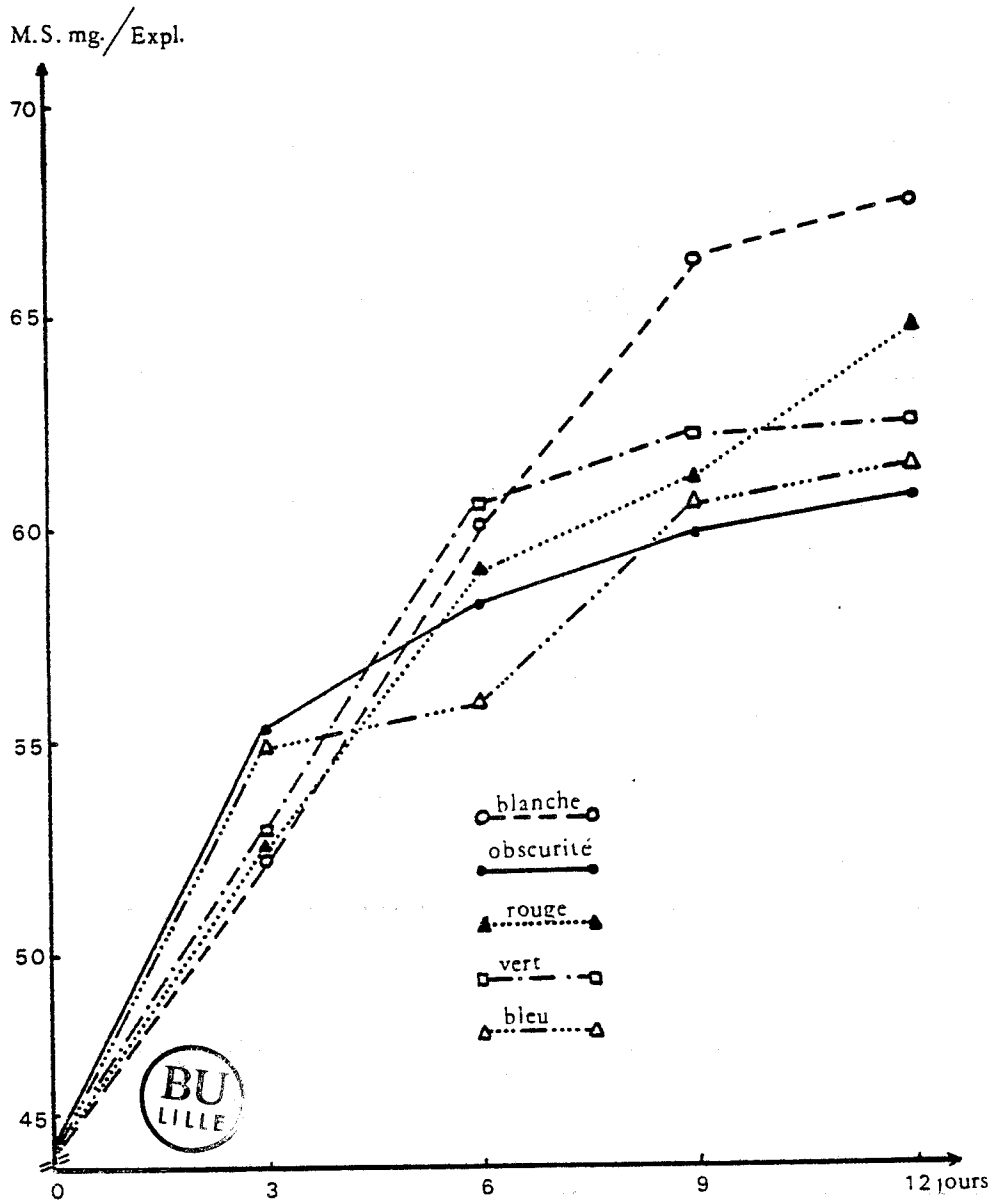


Figure 31 : Action de la qualité de la lumière sur le poids de matière sèche d'explantats de feuille d'Endive.

II.4.1. Variations du poids de matière sèche.

Après trois jours de culture le poids de substance sèche est plus important en lumière bleue, il est équivalent à celui des tissus cultivés à l'obscurité (Figure 31).

Pour les autres conditions, les résultats sont identiques à ceux obtenus en lumière blanche et cette similitude de croissance se maintient jusqu'au sixième jour. Ensuite, alors que l'augmentation du poids de matière sèche des tissus cultivés en lumière blanche se poursuit graduellement; celle des tissus exposés aux lumière verte et rouge se ralentit.

Après douze jours de culture la croissance est sensiblement la même à l'obscurité ou en lumière bleue ; celle des tissus placés en lumière verte est fortement diminuée par rapport à celle obtenue en lumière blanche.

II.4.2. - Influence sur la néoformation des bourgeons

C'est en lumière verte que le nombre de bourgeons est le plus important. La lumière rouge stimule légèrement la néoformation d'organes alors que la lumière bleue la diminue. Quelle que soit la longueur d'onde utilisée, le nombre de bourgeons obtenus est toujours supérieur à celui trouvé à l'obscurité. Le pourcentage de bourgeons apparus dans la région apicale est le plus grand en lumière verte mais c'est pour cette condition également que les bourgeons néoformés sont le plus nombreux (Tableau 11).

	Lumières émises				obscurité
	blanche	rouge	verte	bleue	
Nombre moyen de bourgeons/explantat	1,46	1,73	2,18	1,24	0,65
% de bourgeons dans la région apicale	32,7	22,6	39,4	18,5	7,4

Tableau 11 : Influence de la qualité de la lumière sur la néoformation de bourgeons de tissus de feuille d'Endive.

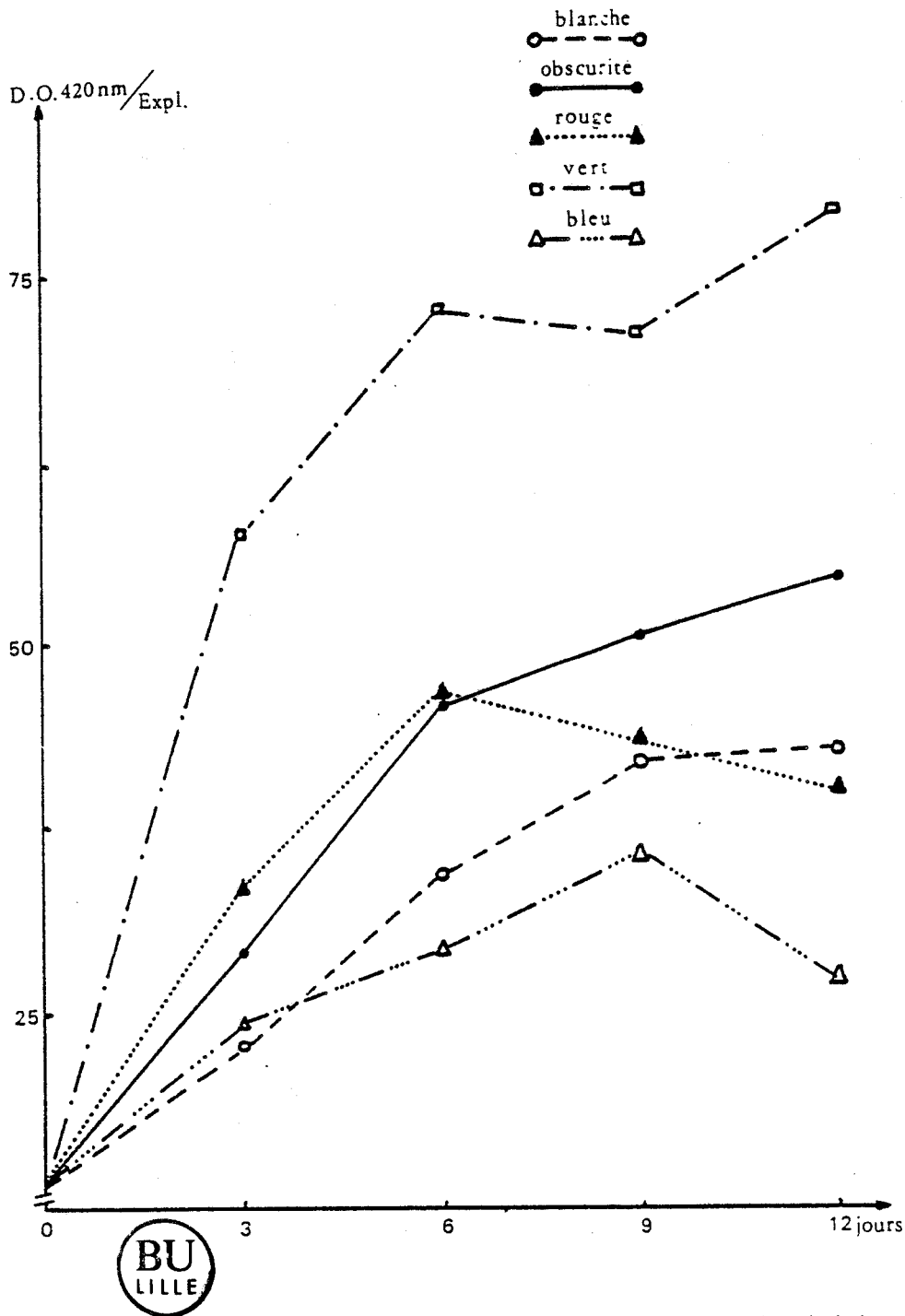


Figure 32 : Action de la qualité de la lumière sur l'activité peroxydasique d'explantats de feuille d'endive

II.4.3. - Influence sur l'activité peroxydasique.

Les résultats obtenus (Figure 32) sont comparés à ceux des tissus maintenus à l'obscurité totale ou éclairés continuellement en lumière polychromatique (blanche).

Les effets des radiations rouges sont identiques à ceux de l'obscurité durant six jours seulement, ensuite l'activité peroxydasique décroît pour atteindre des valeurs voisines de celles trouvées en lumière blanche.

Les activités dosées, après exposition des tissus en lumière bleue sont les plus faibles, elles sont inférieures à celles existantes en lumière polychromatique.

C'est en lumière verte que l'activité peroxydasique est la plus forte et ceci pendant les douze jours de culture.

III - CONCLUSIONS

Les températures extrêmes 10 et 35° C empêchent la callogénèse et sont par conséquent néfastes à la néoformation des bourgeons, celle-ci est maximale à 25° C.

Aux tous premiers jours de culture, on constate que l'activité peroxydasique est d'autant plus grande que la température est plus forte. Ceci traduit une activation du métabolisme général liée à l'augmentation de la température, mais n'est pas spécifique du bourgeonnement. Par contre les étapes de l'évolution de l'activité peroxydasique pour une température donnée, c'est-à-dire une augmentation d'activité suivie d'un palier précédant l'apparition des ébauches gemmaires, semblent caractéristiques.

Les feuilles étiolées maintenues continuellement à l'obscurité sont capables de bourgeonner, par conséquent la lumière n'est pas indispensable à la néoformation des bourgeons.

La longueur du jour n'affecte pas essentiellement la formation des bourgeons et l'alternance jour-nuit n'est pas nécessaire

puisque un éclairage continu est plus favorable qu'un éclairage discontinu.

En ce qui concerne les peroxydases, il est net que lumière et obscurité n'ont pas les mêmes effets. L'étude cinétique des activités peroxydasiques d'explantats de feuille cultivés sous différentes conditions d'éclairage montre une évolution différente à la lumière à la lumière et à l'obscurité, mais peu de différences entre éclairage photopériodique et éclairage continu.

Ces conditions n'interviennent pas sur la compartimentation des peroxydases ni sur la composition isoperoxydasique des tissus. On notera toutefois que des isoperoxydases non décelables dans les tissus avant la mise en culture apparaissent, que les tissus néoformés sont plus riches en isoperoxydases que les tissus primaires.

L'activité peroxydasique des tissus maintenus continuellement à l'obscurité est plus forte que celle des tissus éclairés pendant toute la durée de la culture et ces derniers forment plus de bourgeons que les premiers. Un tel résultat laisserait supposer qu'à une activité peroxydasique importante serait lié un bourgeonnement faible.

Or l'influence de la lumière ou de l'obscurité par des traitements de courte durée, sur le bourgeonnement et sur l'activité peroxydasique a révélé des résultats différents. Si par un passage à l'obscurité de tissus par ailleurs éclairés, l'activité peroxydasique est augmentée, le nombre de bourgeons néoformés est plus grand. Et, inversement, un séjour à la lumière de tissus cultivés à l'obscurité diminue l'activité peroxydasique et il y a moins de bourgeons néoformés.

Les résultats sur l'influence des lumières relativement monochromatiques nous conduisent à des conclusions qui confirment l'idée précédente. Le nombre de bourgeons néoformés est, par ordre décroissant, plus important en lumière verte, puis rouge, blanche et enfin bleue ; parallèlement l'activité peroxydasique est, après six jours, de culture plus forte en lumière verte, rouge, blanche et bleue.

Il existe donc bien une relation entre niveau d'activité peroxydasique, au tout début de la culture, et intensité du bourgeonnement.

Tous ces résultats nous ont amené à éliminer, pour la suite de nos expériences, la condition photopériode 12/12 et à ne considérer les effets des facteurs chimiques que dans des conditions de lumière polychromatique et/ou d'obscurité continues.

**C - ACTION DES FACTEURS CHIMIQUES SUR LE BOURGEON-
NEMENT ET SUR L'ACTIVITE PEROXYDASIQUE**

Il existe une longue voie commune de synthèse des chlorophylle et des peroxydases (Figure 33), le premier intermédiaire biosynthétique étant l'acide delta-aminolévulinique qui est le facteur limitant dans la formation de la protoporphyrine IX elle même précurseur immédiat de l'hème et des chlorophylles.

Dans le chapitre précédent nous avons vu que l'organogénèse des tissus était différente selon les conditions d'éclairément. Celles-ci interviennent également sur l'activité peroxydasique mais aussi sur la teneur en chlorophylle des feuilles de bourgeons néoformés.

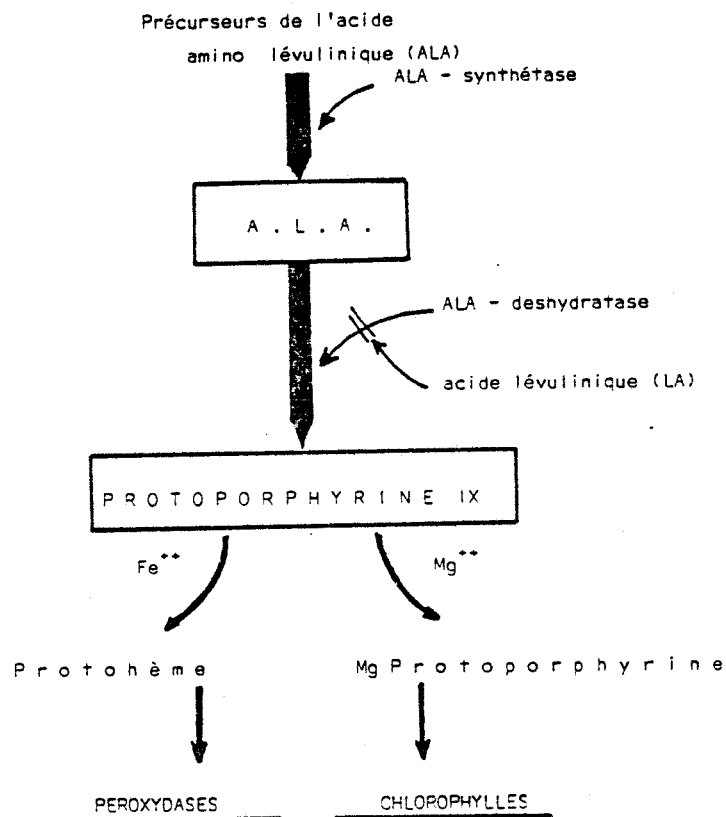


Figure 33 : Schéma de la synthèse des peroxydases et des chlorophylles.

C'est pourquoi, parmi les nombreuses voies métaboliques qui conduisent au bourgeonnement nous nous sommes plus particulièrement intéressé à celle des porphyrines.

Dans ce chapitre, nous allons donc étudier l'influence de facteurs chimiques, susceptibles de modifier la voie métabolique des porphyrines, sur le bourgeonnement, l'activité peroxydasique des explantats et la teneur en chlorophylle des bourgeons.

I. - ROLE DU FER

I.1. - Action de l'acide éthylène diamine tétraacétique disodique (EDTA).

La solution nutritive de MURASHIGE et SKOOG (1962), réduite à ses seuls éléments minéraux est capable, par rapport aux solutions de KNOP ou de HELLER, de favoriser le bourgeonnement des feuilles étiolées de *Cichorium intybus* (VASSEUR, 1979). Cette solution comprend notamment du fer chélaté par une dose d'EDTA de 37,30 g l⁻¹.

L'EDTA empêche la précipitation des sels de fer dans le milieu de culture, il faut toutefois éviter de l'utiliser à trop fortes doses. Sa toxicité à l'égard de la prolifération de certains tissus a déjà été signalée (HELLER, 1959 ; HELLER et RICHEL, 1960).

C'est pourquoi, pour préciser si l'EDTA avait ou non, à lui seul, un effet sur les phénomènes d'organogénèse, nous l'avons ajouté à des concentrations qui sont des sous-multiples ou des multiples de la dose préconisée par MURASHIGE et SKOOG (1962).

I.1.1. - Influence sur la néoformation des bourgeons

La néoformation des bourgeons est stimulée par les doses de 7,46 et 14,92 mg l⁻¹ d'EDTA lorsque les tissus sont cultivés à l'obscurité (Tableau 12).

Pour les explantats éclairés ces doses n'influent pas sur le nombre de bourgeons néoformés.

Les concentrations plus fortes d'EDTA (37,30 mg l⁻¹ et au delà) inhibent le bourgeonnement et ceci de façon plus marquée à l'obscurité. Cette inhibition se traduit par l'absence de bourgeons dans la région apicale des explantats. Ces derniers se nécrosent rapidement témoignant d'un effet toxique de l'EDTA aux doses élevées.

EDTA	0	7,46	14,92	37,30	52,22	74,60 mg/litre	
A	20,93	22,61	46,32	24,83	0	0	} Lumière
B	1,72	1,99	1,77	1,49	0,62	0,21	
A	13,54	22,79	16,28	0	0	0	} Obscurité
B	0,96	1,36	1,29	0,45	0,17	0,13	

A : % de bourgeons dans la région apicale des explantats ; B : nombre moyen de bourgeons par explantat.

Tableau 12 : Action de l'EDTA sur la néoformation de bourgeons par des fragments de feuille étiolée.

I.1.2. - Influence sur l'activité peroxydasique

Après six jours de culture, en lumière continue, l'activité peroxydasique et la teneur en protéines, rapportées au poids de substance fraîche, sont d'autant plus faibles que la dose d'EDTA est plus élevée (Tableau 13).

Par conséquent les proportions relatives des protéines diminuant plus rapidement que celles de l'activité peroxydasique, quand la concentration en EDTA des milieux de culture augmente, l'activité spécifique peroxydasique ne paraît influencée que par la plus forte dose d'EDTA soit 74,6 mg l⁻¹.

EDTA mg l ⁻¹	0	7,46	14,92	37,30	52,22	74,60
AP/Expl	27,80	24,89	24,05	23,34	21,69	16,23
µg prot 100mg PF	234,3	216,8	214,7	178,0	159,8	135,0
APS	19,49	18,62	17,92	20,27	22,52	14,58

Tableau 13 : Action de l'EDTA sur l'activité peroxydasique d'explantats de feuille étiolée, cultivés pendant 6 jours en lumière continue.
(AP - activité peroxydasique par explantat ;
prot - protéines des extraits pour 100 mg de substance fraîche MF ; APS - activité peroxydasique spécifique).

I.2. - Action des sels de fer

Les sels de fer sont ajoutés, chélatés ou non, à des doses variant de 0,02 à 0,2 milliatomegrammes par litre de milieu de culture.

La chélation est réalisée de deux manières. Dans un cas, pour les doses croissantes de fer, 0,02, 0,04, 0,1, 0,14 et 0,2 milliatomegrammes, les quantités respectives d'EDTA sont de 7,46, 14,92, 37,30, 52,50 et 74,6 mg l⁻¹. Dans l'autre cas, quelle que soit la dose fer, la quantité d'EDTA est fixée à 7,46 mg l⁻¹.

Les effets des sels de fer sur le bourgeonnement ont été analysés sur des tissus de feuilles étiolée cultivés à l'obscurité ou continuellement éclairés, pendant 40 jours. La teneur en chlorophylle a été mesurée dans les feuilles des bourgeons néoformés et cultivés en présence de sulfate ferreux pendant 40 jours. L'activité peroxydasique a été dosée, après six jours de culture, dans les tissus se développant sur des milieux contenant du sulfate ferreux ou du chlorure ferrique.

1.2.1. - Action sur le bourgeonnement

1.2.1.1. - Du sulfate ferreux

Si le sulfate ferreux est chélaté par des doses croissantes d'EDTA, le bourgeonnement est stimulé, mais au delà de 37,70 mg l⁻¹ d'EDTA cette stimulation est en partie masquée par l'effet toxique de l'agent chélateur (Tableau 14).

Fe ⁺⁺	0	0,02	0,04	0,10	0,14	0,20 At. g × 10 ⁻³		
A	27,35	38,08	25,86	20,50	15,02	17,33	I	} Lumière
B	2,23	4,49	5,49	4,39	2,13	0,88		
A	27,35	38,08	35,86	39,74	44,12	36,39	II	
B	2,23	4,49	4,60	6,34	6,21	5,15		
A	13,76	10,83	19,42	19,86	8,24	9,92	I	} Obscurité
B	1,09	2,40	2,78	2,97	1,94	1,41		
A	13,76	10,83	17,50	20,70	10,59	24,86	II	
B	1,09	2,40	2,97	3,14	3,02	3,66		

A : % de bourgeons dans la région apicale des explantats ; B : nombre moyen de bourgeons par explantat ; I : le fer est chélaté par des doses croissantes d'EDTA ; II : le fer est chélaté par 7,46 mg/litre d'EDTA.

Tableau 14 : Action du sulfate ferreux sur le bourgeonnement de feuille d'Endive.

Par contre, si la chélation est réalisée par une dose d'EDTA (7,46 mg l⁻¹) qui ne modifie pas le bourgeonnement, la stimulation est d'autant plus forte que la quantité de fer est plus importante.

Ceci s'observe aussi bien quand les explantats sont éclairés 24 heures sur 24 que lorsqu'ils sont maintenus à l'obscurité.

1.2.1.2. - Du chlorure ferreux

Si la dose d'EDTA augmente avec celle du chlorure ferreux, on constate très vite une diminution du bourgeonnement liée à la concentration de l'EDTA et non à celle du fer (Tableau 15).

Quand le chlorure ferreux est chélaté par une dose constante d'EDTA (7,46 mg l⁻¹) le nombre de bourgeons apparus augmente jusqu'à une teneur de 0,10 milliatomegrammes de fer par litre, ensuite il décroît mais reste néanmoins supérieur au nombre obtenu sur le milieu ne contenant pas de fer.

Fe ⁺⁺	0	0,02	0,04	0,10	0,14	0,20	At. g × 10 ⁻³	
A	21,59	31,13	28,52	28,02	23,00	29,05	I	Lumière
B	2,13	3,34	5,82	3,39	3,00	1,17		
A	21,59	31,13	38,03	21,36	39,85	18,95	II	
B	2,13	3,34	4,18	5,57	4,04	3,43		
A	21,59	35,25	27,44	32,55	23,02	40,11	III	
B	2,13	2,95	3,17	3,63	4,17	5,31		
A	12,50	26,00	20,08	21,16	13,06	23,00	II	Obscurité
B	1,04	2,00	2,26	2,74	2,45	2,00		
A	12,50	22,05	26,50	25,81	33,21	33,33	III	
B	1,04	1,95	2,83	2,75	2,74	3,12		

A : % de bourgeons dans la région apicale des explantats ; B : nombre moyen de bourgeons par explantat ; I : le fer est chélaté par des doses croissantes d'EDTA ; II : le fer est chélaté par 7,46 mg/litre d'EDTA ; III : le fer n'est pas chélaté.

Tableau 15 : Action du chlorure ferreux sur le bourgeonnement de feuille d'Endive.

Si le fer n'est pas chélaté, il stimule d'autant mieux le bourgeonnement que sa concentration est plus forte.

On notera, et ceci pour les tissus cultivés à la lumière, que pour obtenir en moyenne 5 à 6 bourgeons par explantat, il faut 0,2 milliatomegrammes de fer non chélaté, il n'en faut que deux fois moins en présence de 7,46 mg d'EDTA et cinq fois moins avec 14,92 mg d'EDTA.

A l'obscurité, les avantages de la chélation sont moins évidents, mais le chlorure ferreux stimule nettement la néoformation des bourgeons.

1.2.1.3. - Du chlorure ferrique

Le chlorure ferrique (Tableau 16) stimule le bourgeonnement, son effet est optimal pour 0,10 milliatomegrammes de fer non chélaté et pour une dose plus faible, 0,04 milliatomegrammes en présence d'EDTA. C'est sous cette forme qu'il est le plus efficace, ceci est très net pour les explantats éclairés.

Fe ⁺⁺⁺	0	0,02	0,04	0,10	0,14	0,20 At.g × 10 ⁻³			
A	21,59	26,88	34,69	34,59	45,06	60,16	} II	} Lumière	
B	2,13	5,58	6,83	6,62	6,08	6,00			
A	21,59	32,05	34,34	32,03	39,19	34,58	} III		
B	2,13	3,12	4,95	5,15	3,98	4,51			
A	12,50	19,33	17,03	22,33	16,01	49,43	} II		} Obscurité
B	1,04	2,69	3,17	2,91	2,81	3,54			
A	12,50	26,96	17,83	20,12	37,20	14,95	} III		
B	1,04	1,78	1,85	3,13	2,58	2,14			

A : % de bourgeons dans la région apicale des explantats ; B : nombre moyen de bourgeons par explantat ; II : le fer est chélaté par 7,46 mg/litre d'EDTA ; III : le fer n'est pas chélaté.

Tableau 16 : Action du chlorure ferrique sur le bourgeonnement de feuille d'Endive.

1.2.2. Action sur la teneur en chlorophylle

Un simple examen des cultures montre que les feuilles des bourgeons néoformés sont plus vertes lorsque le milieu de culture contient du fer. Il y a donc synthèse active de chlorophylle et, fait assez particulier, à la dose de 0,2 milliatomegrammes des anthocyanes apparaissent sur les feuilles.

Concentrations milliatg.l ⁻¹			FeSO ₄		FeCl ₃	
			0	0,04	0,10	0,04
A.P.	Lumière	30,6	48,7	40,4	39,9	32,2
	Obscurité	60,6	62,4	66,2	53,4	66,3
A.P.S.	Lumière	21,7	29,5	19,7	25,0	21,1
	Obscurité	59,5	74,8	80,3	47,0	77,3

Tableau 18 : Action des sels de fer sur l'activité peroxydasique d'explantats cultivés pendant six jours à l'obscurité ou à la lumière.
(A.P.S.) - activité peroxydasique spécifique



Des résultats consignés dans le tableau 17, il apparaît que l'EDTA, seul, favorise l'accumulation de la chlorophylle et que la plus faible dose de fer (0,02 milliatogrammes) suffit pour augmenter considérablement la teneur en chlorophylle des feuilles.

Chlorophylle mg g ⁻¹ M.F.	MB	MBE	MBE + FeSO ₄ milliatg.l ⁻¹			
			0,02	0,04	0,14	0,20
	0,118	0,246	0,346	0,391	0,396	0,516

Tableau 17 : Action du FeSO₄ sur la teneur en chlorophylle des feuilles des bourgeons néoformés après 40 jours de culture (MB - milieu de base ; MBE - milieu de base + EDTA 7,46 mg l⁻¹ ; P.F. - poids de substance fraîche).

1.2.3. - Action sur l'activité peroxydasique

Aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité, l'activité peroxydasique est plus forte dans les explantats cultivés pendant 6 jours en présence de fer (Tableau 18). Le fer ferreux agit plus que le fer ferrique, et quelle que soit la forme utilisée c'est toujours la concentration la plus faible qui augmente le plus l'activité de l'enzyme, quand les tissus sont éclairés. A l'obscurité, par contre, plus la dose de fer est grande plus l'activité peroxydasique est élevée.

1.3. - Apports de fer pendant des périodes de courte durée.

Nous venons de voir que la lumière intervient très tôt sur l'intensité de la néoformation des bourgeons. Par comparaison, nous avons voulu savoir si le fer agissait également au cours des premiers jours de culture ou si au contraire il favorisait la néoformation des bourgeons pendant toute la culture.

Pour ces essais, nous avons utilisé du sulfate ferreux à la dose de 0,04 milliatogrammes l^{-1} , chélaté par de l'EDTA (7,46 mg l^{-1}). Les lots témoins sont constitués par des explantats cultivés pendant 40 jours sur le milieu de base ou sur le milieu contenant le sel de fer. De plus, puisque pour supprimer l'apport de fer il faut transplanter les explantats après 3 ou 9 jours sur un milieu neuf sans fer, d'autres lots de référence sont nécessaires, la transplantation pouvant intervenir sur le développement des fragments de feuille étiolée. Ces lots de référence sont constitués d'explantats repiqués après 3 ou 9 jours sur des milieux neufs identiques au milieu initial d'ensemencement.

L'expérience se déroule en lumière continue, à 25° C ; et nous avons analysé l'influence d'apports de fer pendant une période relativement courte sur la néoformation des bourgeons, sur la teneur en chlorophylle des feuilles des bourgeons néoformés et sur l'activité peroxydasique des cals après 40 jours de culture.

Lorsque le milieu ne contient pas de fer (Tableau 19), les transplantations après 3 ou 9 jours interviennent relativement peu sur le nombre de bourgeons néoformés, alors que si le milieu contient du fer on constate une augmentation sensible. Mais l'effet des transplantations se manifeste surtout dans l'expression de la polarité (Tableau 19). En effet, le nombre de bourgeons naissant dans la région apicale de l'explantat est nettement augmenté avec ou sans fer.

Un passage de trois jours sur un milieu contenant du fer, suivi d'un repiquage sur un milieu neuf, exempt de cet oligoélément, favorise la néoformation des bourgeons. Il suffit de cultiver les tissus de feuille pendant 9 jours en présence de fer et de supprimer ensuite ce dernier pour obtenir un nombre de bourgeons identique à celui obtenu sur des explantats cultivés continuellement sur un milieu contenant une même dose de fer.

La teneur en chlorophylle des feuilles des bourgeons néoformés est augmentée dans les tissus transplantés sur un milieu identique au milieu initial (Tableau 19). Les augmentations sont respectivement, pour des repiquages intervenant au troisième et au

CONDITIONS EXPERIMENTALES	Nombre moyen de bourgeons par explant.	% de bourgeons coté apical	Teneur en chlorophyl.
MB 40j.	2,40	24,0	0,118
MB 3j → MB 37j	2,45	47,4	0,143
MB 9j → MB 31j	2,58	56,8	0,213
MF 40j	3,86	38,2	0,311
MF 3j → MF 37j	4,10	49,5	0,389
MF 9j → MF 31j	4,45	54,0	0,428
MF 3j → MB 37j	3,13	43,4	0,189
MF 9j → MB 31j	3,91	50,1	0,318

Tableau 19 : Action du fer, en apports de courtes durées sur la néoformation des bourgeons par des explantats de feuille étiolée et sur la teneur en chlorophylle des feuilles de bourgeons néoformés

MB - milieu de base ; MF - Milieu de base + FeSO_4 0,04 milliatomogrammes ; la flèche indique le moment de transplantation ; la teneur en chlorophylle est donnée en mg. g^{-1} PF.

neuvième jour, de 22 et 80 % si le milieu ne contient pas de fer et de 25 et 37 % quand le milieu est enrichi de fer.

Si les explantats sont cultivés seulement pendant trois jours en présence de fer, la teneur en chlorophylle des feuilles est la même que celle trouvée dans des feuilles développées sur des explantats transplantés sur le milieu de base. Par contre, si la transplantation a lieu après 9 jours, la quantité de chlorophylle trouvée est voisine de celle dosée lorsque les explantats ont été cultivés pendant 40 jours sur un milieu enrichi en fer.

Après 40 jours de culture, l'activité peroxydasique a été dosée dans les cals (Tableau 20).

Les transplantations provoquent une augmentation légère ou sensible de l'activité peroxydasique des tissus cultivés respectivement en absence ou en présence de fer. Cet accroissement est d'autant plus fort que le repiquage intervient plus tard.

Conditions expérimentales	MB 40j	MB3j MB37j	MB9j MB31j	MF 40j	MF3j MF37j	MF9j MF31j	MF3j MB37j	MF9j MB31j
AP/100mgPF	4,75	4,75	5,60	5,40	6,50	7,10	5,15	7,75
P /100mgPF	171,6	184,5	214,0	154,0	170,1	166,4	163,9	170,5
APS	27,67	25,77	26,16	35,04	38,20	42,66	31,40	45,45

Tableau 20 : Action du fer en apports de courtes durées sur l'activité peroxydasique des cals après 40 jours de culture d'explantats de feuille étiolée.
(AP - activité peroxydasique ; PF - poids de substance fraîche ; P - protéines, APS - activité peroxydasique spécifique ; MB - milieu de base MF - milieu de base + FeSO_4 0,04 milliatomogrammes/l ; flèche - changement de milieu).

Si le fer est apporté seulement pendant trois jours, l'activité peroxydasique n'est pas très différente de celle trouvée dans les cals d'explantats repiqués sur le milieu de base. Si après 9 jours de culture, sur un milieu enrichi en fer, les explantats sont transplantés sur un milieu sans fer, l'activité peroxydasique est très forte, supérieure à celle d'explantats cultivés continuellement en présence de fer.

La teneur en protéines des cals augmente lorsque les tissus sont transplantés sur un milieu sans fer. Si cet oligoélément est présent continuellement ou seulement pendant quelque temps la quantité de protéines dans les cals est la même que celle trouvée dans les tissus non transplantés sur le milieu de base.

II. - ROLE DE L'ACIDE DELTA-AMINOLEVULINIQUE ET DE L'ACIDE LEVULINIQUE .

Au cours de la synthèse de la protoporphyrine IX une enzyme intervient, l'ALA-deshydratase, elle catalyse la condensation de deux molécules d'acide delta-aminolévulinique pour former le monopyrrole porphobilinogène. NANDI et SHEMIN (1968) ont montré que l'acide lévulinique (LA), un analogue du ALA, est un inhibiteur compétitif de l'ALA deshydratase. Nous avons donc employé l'ALA et le LA et analysé leurs effets sur le développement des feuilles étiolées.

II.1. - Action sur la néoformation des bourgeons

II.1.1. - Action de l'acide delta-aminolévulinique

L'acide delta-aminolévulinique a été utilisé à des doses variant de 10^{-7} à 10^{-4} M. Après 40 jours de culture, en lumière continue et à 25°C les cals ont été pesés et les bourgeons dénombrés et pesés.

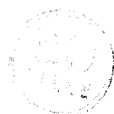
La callogénèse, stimulée par les doses faibles d'ALA (10^{-7} , 10^{-6} M) est ralentie par les doses élevées (Tableau 21). La néoformation des bourgeons n'est que peu influencée par l'acide delta-aminolévulinique, tout au plus une diminution légère, mais progressive, du nombre de bourgeons néoformés quand la concentration en ALA augmente, peut être notée.

ALA Mol l ⁻¹	0	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
PF moyen cals mg/Expl.	155,5	235,5	174,7	141,7	106,4
Nombre moyen bourgeons/Expl.	1,8	1,7	1,4	1,3	1,2
PF moyen des bourgeons/mg Expl.	79,2	47,7	66,2	69,4	124,2

Tableau 21 : Action de l'acide delta-aminolévulinique (ALA) sur la callogénèse, la néoformation et le développement des bourgeons apparus sur des tissus de feuille étiolée.

A L A Mol l ⁻¹	0		10 ⁻⁷		10 ⁻⁴	
FeSO ₄ milliatg	0	0,04	0	0,04	0	0,04
PF moyen des cals mg/Expl	155,5	150,2	235,5	129,5	106,4	69,3
Nombre moyen bourgeons/Expl.	1,8	5,2	1,7	4,1	1,2	1,8
Chlorophylle mg/g PF feuille	0,238	0,349	0,144	0,453	0,132	0,471

Tableau 22 : Action conjuguée de l'acide delta-amino-lévulinique et du fer sur la prolifération, le bourgeonnement et la teneur en pigments chlorophylliens des feuilles des bourgeons néoformés sur des explantats de feuille étiolée, après 40 jours de culture.



Mais si on s'intéresse au poids moyen des bourgeons produits par explantat, ce qui traduit leur développement, il apparaît que plus les concentrations en ALA sont fortes plus la biomasse est importante.

II.1.2. - Action conjuguée du ALA et du Fer.

Nous avons retenu de l'expérience précédente les deux concentrations extrêmes 10^{-7} et 10^{-4} M d'acide delta-aminolévulinique auxquelles nous avons associé le fer sous forme de sulfate ferreux à la dose de 0,04 milliatomegrammes l^{-1} .

L'analyse des résultats reportés dans le tableau 22 montre que le poids des cals obtenus sur le milieu de base est identique à celui trouvé en présence de fer. L'association fer-ALA provoque une nette diminution de la callogenèse.

Le fer ajouté au milieu de base, nous l'avons vu, favorise considérablement la néoformation des bourgeons. Cet effet est légèrement masqué si l'ALA est ajouté à la dose de 10^{-7} M et franchement annihilé à la dose de 10^{-4} M.

La teneur en chlorophylle diminue dans les feuilles des bourgeons néoformés lorsque l'ALA est seul présent, alors que s'il est associé au fer la teneur en chlorophylle est plus importante que dans les lots témoins (Tableau 22).

II.1.3. - Action de l'acide lévulinique

Des essais préliminaires nous ont montré que l'acide lévulinique était sans effet, aux concentrations inférieures à 10^{-3} M sur la néoformation des bourgeons. C'est pourquoi nous l'avons ajouté à des doses de 10^{-3} à $5 \cdot 10^{-2}$ M additionné ou non de sulfate ferreux à 0,04 milliatomegrammes l^{-1} .

Plus la dose d'acide lévulinique augmente, moins le nombre de bourgeons néoformés est grand. Ce nombre est diminué de moitié si l'acide lévulinique est employé seul, alors qu'il y a huit fois moins de bourgeons quand le fer est associé à l'acide lévulinique à la dose de 10^{-2} M (Tableau 23).

La dose 5.10^{-2} M d'acide lévulinique est toxique et provoque la nécrose des tissus.

L A Mol l ⁻¹		0	10^{-3}	5.10^{-3}	10^{-2}	5.10^{-2}
F e S O 4	0	2,5	2,2	1,9	1,3	0
	0,04	5,0	6,0	3,3	0,8	0

Tableau 23 : Action conjuguée du fer et de l'acide lévulinique (LA) sur le nombre moyen de bourgeons néoformés par explantats de feuille étiolée, après 40 jours de culture.

II.2. - Action sur l'activité peroxydasique

Dans des explantats âgés de 6 jours et cultivés en présence d'acide delta-aminolévulinique (10^{-7} et 10^{-4} M ou d'acide lévulinique (10^{-3} , 5.10^{-3} et 10^{-2} M) et/ou de fer (FeSO₄) à 0,04 milliatogrammes l⁻¹, nous avons mesuré l'activité peroxydasique (Tableau 24), d'explantats de feuille étiolée cultivés pendant 6 jours en lumière continue.

Le fer augmente légèrement l'activité peroxydasique des explantats. L'ALA utilisé seul est plus actif que le fer, et l'activité peroxydasique est doublée pour la concentration de 10^{-4} M.



Fe milliat.g.	ALA 0		ALA 10^{-7} M		ALA 10^{-4} M		LA 10^{-3} M		LA $5 \cdot 10^{-3}$ M		LA 10^{-2} M	
	0	0,04	0	0,04	0	0,04	0	0,04	0	0,04	0	0,04
AP/Expl.	21,20	26,95	31,62	23,27	49,97	45,80	40,78	36,53	33,96	33,70	24,98	31,32
P/100mgPF	149,5	141,4	141,6	130,6	194,3	156,7	165,8	137,4	178,0	121,8	130,5	113,9
APS	18,40	25,62	31,22	23,15	39,75	39,37	36,18	37,84	26,06	37,73	29,41	35,11

Tableau 24 : Action de l'acide delta-aminolévulinique (A.L.A.) et de l'acide lévulinique (LA) associés ou non au fer sur l'activité peroxydasique d'explantats de feuille étiolée cultivés pendant 6 jours en lumière continue à 25° C.

L'acide lévulinique, à la plus faible concentration utilisée (10^{-3} M) accroît considérablement l'activité peroxydasique, celle-ci diminue quand la concentration en LA augmente.

Si l'acide delta-aminolévulinique ou l'acide lévulinique sont associés au fer, les activités peroxydasiques sont toujours plus faibles que lorsque ces composés agissent seuls.

Les augmentations d'activité peroxydasique, en présence de fer, de LA ou d'ALA se traduisent sur les électrophorogrammes par une augmentation d'activité de chaque isoperoxydase (Figure 34).

Il n'y a pas de différences dans la composition isoperoxydasique des tissus.

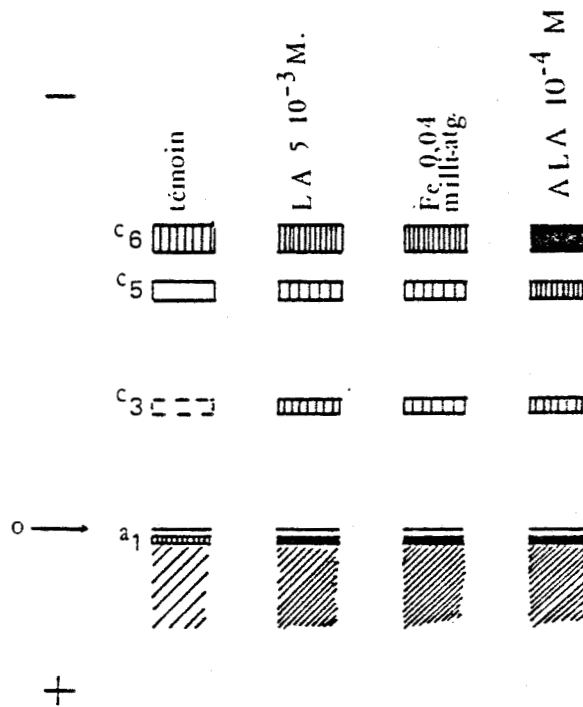


Figure 34 : Zymogramme des peroxydases solubles d'extraits de feuilles étioilées cultivées pendant 6 jours en présence de LA $5 \cdot 10^{-3}$ M, Fe 0,04 milliatomes et ALA 10^{-4} M.

III. - ACTION DES REGULATEURS DE CROISSANCE

Les régulateurs de croissance interviennent sur l'organogénèse des tissus cultivés *in vitro*.

VASSEUR (1979) sur des fragments de feuille étiolée de *Cichorium intybus*, a montré que la kinétine favorise le bourgeonnement, il a de plus signalé que l'hypothèse de SKOOG et MILLER (1957), selon laquelle les phénomènes d'organogénèse sont réglés par un équilibre hormonal auxine/cytokinine, se vérifiait. Par ailleurs, BOURIQUET (1972), LEFEBVRE (1972) ont observé sur des explantats de racine de *Cichorium intybus* un effet stimulant de l'éthylène sur le bourgeonnement.

De plus, ces régulateurs de croissance interviennent aussi sur les chlorophylles et les peroxydases. Notamment la kinétine ralentit la perte en chlorophylle des feuilles excisées (BEEVERS, 1968), diminue la synthèse chlorophyllienne (PEAUD LE NOEL, 1972), et augmente l'activité peroxydasique (GASPAR et Coll., 1982) alors que les composés auxinomimétiques ont tendance à diminuer cette dernière (LEGRAND et DUBOIS, 1977). Enfin, l'éthylène agit sur les peroxydases (DUBUCQ, 1977) et réduit le taux de chlorophylle des feuilles des bourgeons néoformés sur des explantats d'Endive (LEFEBVRE, 1972).

Par conséquent, ces régulateurs de croissance peuvent intervenir sur le bourgeonnement, sur la synthèse des chlorophylles et/ou des peroxydases, c'est pourquoi nous avons étudié leur action.

III.1. - Action sur la néoformation des bourgeons

III.1.1. - Action conjuguée de la kinétine et du fer

Nous savons que la kinétine favorise le bourgeonnement de feuilles étiolées (VASSEUR, 1979) et nous venons d'observer que le fer, lui aussi, stimule la néoformation des bourgeons. C'est pourquoi nous nous sommes proposé d'analyser les effets conjugués de ces deux substances.

La kinétine, à des concentrations variant de 10^{-7} à 10^{-5} M, a été associée à des doses croissantes, 0,02 ; 0,04 et 0,1 milliatomegrammes de $FeCl_3$ non chélaté.

Les résultats consignés dans le tableau 25 montrent que la kinétine employée seule stimule la néoformation des bourgeons à toutes les concentrations utilisées, le fer également.

Si pour la kinétine, à mesure que les concentrations augmentent on note que le développement des bourgeons est de plus en plus faible, au contraire, en présence de fer, le développement des bourgeons n'est pas affecté par les fortes concentrations.

Fe \ K	0	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
0	2,3	3,3	3,7	4,5
0,02	4,6	6,9	8,3	5,4
0,04	5,0	6,3	7,7	5,2
0,1	5,4	8,4	7	3,6

Tableau 25 : Action conjuguée de la kinétine et du fer (milliatomegrammes l^{-1}) sur la néoformation de bourgeons par des tissus de feuille étiolée, après 40 jours de culture.
K - kinétine ; Fe : $FeCl_3$

L'association de ces deux substances favorise leurs effets stimulants individuels, et pour une dose de 10^{-6} M de kinétine et 0,02 milliatomegrammes de fer la stimulation est maximale. Mais l'association fer/kinétine n'est plus bénéfique si la kinétine est employée à la dose de 10^{-5} M.

III.1.2. - Action conjuguée de l'acide indolylacétique et du fer

VASSEUR (1979) a montré que l'acide indolylacétique (AIA) inhibe le bourgeonnement des tissus de feuille étiolée, et que cette inhibition peut être levée par les cytokinines. Il était alors tentant de voir si le fer provoquait les mêmes effets.

De l'AIA à des concentrations variant de 10^{-7} à 10^{-5} M est associé à des quantités de FeCl_3 de 0,03 ; 0,04 et 0,1 milliatomegrammes l^{-1} .

Plus la dose d'AIA est élevée moins le nombre de bourgeons néoformés est grand (Tableau 26).

L'effet stimulant du fer n'est presque pas masqué pour une dose d'AIA de 10^{-7} M, mais l'effet inhibiteur de l'AIA aux plus fortes doses est très net.

Fe \ AIA	0	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
0	2,3	1,2	0,7	0,5
0,02	4,6	4,0	2,6	1,3
0,04	5,0	4,4	2,6	1,1
0,1	5,4	4,1	2,1	0,8

Tableau 26 : Action conjuguée de l'acide indolylacétique (concentrations molaires) et du fer (milliatomegrammes l^{-1}) sur la néoformation de bourgeons par des tissus de feuille étiolée, après 40 jours de culture.

AIA = acide indolylacétique ; Fe = FeCl_3 .

III.1.3. - Action de l'éthylène

Dans cette expérience nous avons utilisé des explantats provenant d'organes différents. D'une part des disques de feuille étiolée et d'autre part des fragments prélevés dans la région médiane de racine de *Cichorium intybus*. Ces fragments mesurent 1 cm de long et 0,8 cm de diamètre, ils comportent l'assise génératrice, du xylème et du phloème. Les explantats sont ensemencés dans le sens normal c'est-à-dire qu'ils sont placés verticalement, la région racinaire appliquée sur le milieu de culture.

Ces tissus sont cultivés sur le milieu de base 24 heures après l'ensemencement, ils sont placés dans des enceintes d'un volume de 10 litres, hermétiquement closes dans lesquelles on injecte 1 à 5 ml d'éthylène.

Le traitement sous éthylène dure 3 jours, ensuite les lots sont replacés en atmosphère ordinaire à 25° C en lumière continue. Les bourgeons néoformés sont dénombrés après 40 jours pour les tissus de feuille et 35 jours pour les tissus de racine (Tableau 27).

L'éthylène ne modifie pratiquement pas le bourgeonnement des tissus de feuille, sa présence, quelle que soit la concentration aurait tendance à diminuer le nombre de bourgeons néoformés.

Le bourgeonnement des tissus de racines est stimulé par l'éthylène.

Concentrations en C ₂ H ₄ ml l ⁻¹	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Explantat de feuille	1,6	1,3	1,4	1,1	1,1	1,2
Explantat de racine	5,15		9,4			8,6

Tableau 27 : Influence de l'éthylène sur la néoformation de bourgeons par des explantats de feuille étiolée ou de racine de *Cichorium intybus*. L'éthylène est fourni pendant 72 heures.



III.2. Action sur l'activité peroxydasique

III.2.1. - Action de la kinétine et de l'acide indolylacétique

L'activité peroxydasique des tissus de feuille étiolée cultivés sur des milieux contenant de la kinétine (10⁻⁶ M) ou de l'acide indolylacétique (10⁻⁵ M) a été mesurée (Figure 35).

Après trois jours de culture l'activité peroxydasique est plus faible ou sensiblement égale en présence respectivement de kinétine ou d'AIA que celle trouvée dans les tissus cultivés sur le milieu de base.

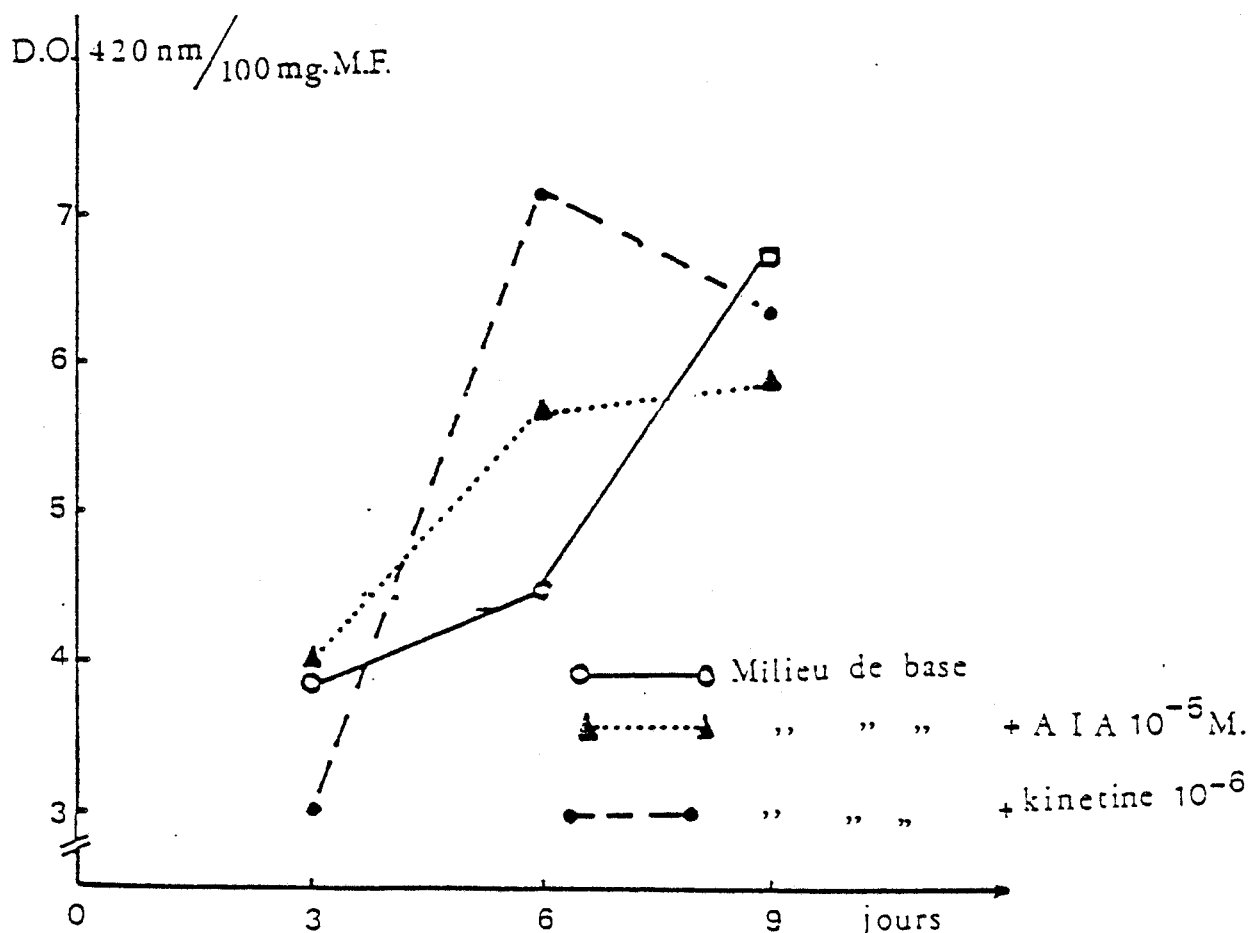


Figure 35 : Action de la kinétine ou de l'AIA sur l'activité peroxydasique d'explantats de feuille étiolée.

Du troisième au sixième jour, l'activité peroxydasique est exaltée par la kinétine et sensiblement augmentée en présence d'AIA. Cette dernière augmente encore mais plus faiblement du sixième au neuvième jour et au contraire en présence de kinétine l'activité peroxydasique décroît.

Après 9 jours de culture les activités peroxydasiques des tissus cultivés sur les milieux additionnés de régulateurs de croissance sont plus faibles que celle des tissus qui en sont privés.

Il n'y a pas de différence dans la composition en isoperoxydases des extraits provenant de tissus cultivés en présence d'AIA ou de Kinétine ou sur le milieu de base.

III.2.2. - Action de l'éthylène

Après le traitement par l'éthylène, soit quatre jours après l'ensemencement, les explantats de feuille ou de racine sont récoltés, leur activité peroxydasique dosée et leur composition isoperoxydasique analysée.

Si l'activité peroxydasique, des tissus de feuille, est rapportée à l'explantat (Tableau 28), l'influence de l'éthylène est faible, il augmente l'activité enzymatique par rapport aux tissus non traités mais cette augmentation est la même quelle que soit la dose de gaz utilisée.

Si l'activité peroxydasique est rapportée à l'unité protéique (APS) un accroissement sensible apparaît proportionnellement à l'augmentation de la concentration en éthylène.

Conc. C_2H_4 ml l^{-1}	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
AP/EXPL.	16,13	21,63	22,86	21,81	23,37	22,82
Pr/100mg M.F.	91,78	108,51	99,03	95,01	102,61	97,47
A.P.S.	19,97	22,37	26,93	28,76	29,06	30,93

Tableau 28 : Action de l'éthylène sur l'activité peroxydasique de fragments de feuille étiolée, après 4 jours de culture.
(AP = activité peroxydasique ; p = protéines ; PF = poids de substance fraîche ; APS = activité peroxydasique spécifique).

Les zymogrammes des extraits des tissus de feuille montrent que l'isoperoxydase C_3 faiblement active en l'absence d'éthylène a une activité plus importante pour la dose de $0,5 \text{ ml l}^{-1}$. (Figure 36). L'activité de l'isoperoxydase C_5 est d'autant plus grande que la dose d'éthylène utilisée est plus forte. Inversement, l'activité de l'isoenzyme C_6 est très diminuée par le gaz.

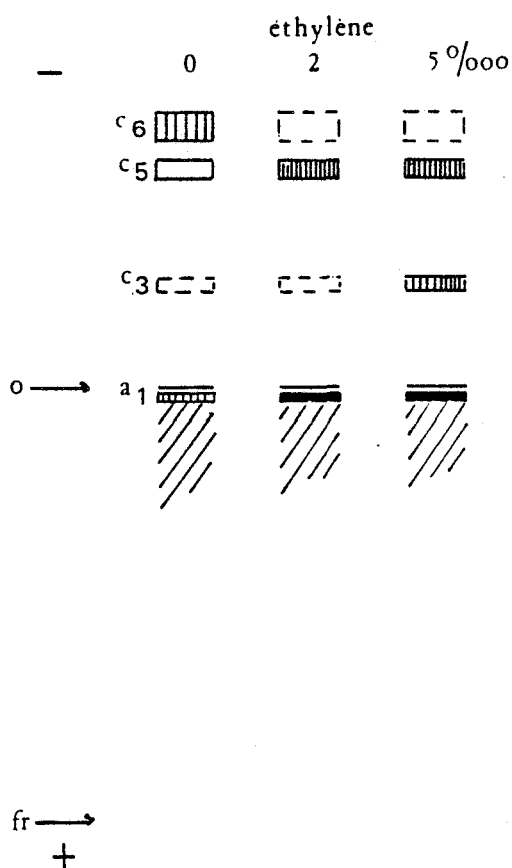
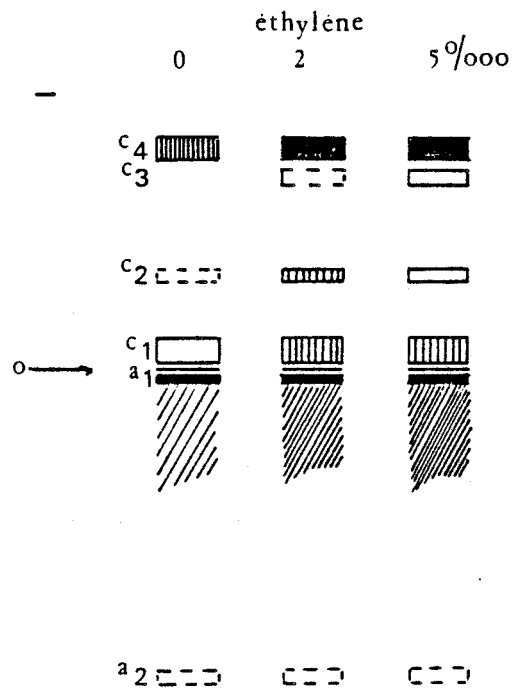


Figure 36 : Zymogramme des peroxydases solubles d'extraits de tissus de feuille étiolée, âgés de quatre jours et traités trois jours par l'éthylène.



fr →
+

Figure 37 : Zymogramme des peroxydases solubles d'extraits de tissus de racine de *Cichorium intybus* âgés de quatre jours et traités trois jours par l'éthylène.

L'éthylène appliqué aux tissus de racine provoque une augmentation très nette de l'activité peroxydasique (Tableau 29). Cette augmentation est fonction de la concentration en C_2H_4 , très forte à la dose de $0,2 \text{ ml l}^{-1}$ que l'on considère l'activité exprimée par rapport à l'explantat ou à l'unité protéique (APS), elle est moindre à la concentration $0,5 \text{ ml l}^{-1}$.

Conc. C_2H_4 ml. l^{-1}	0	0,2	0,5
AP/EXPL	42,11	75,21	68,13
Pr/100mg M.F.	229,4	261,1	289,3
A.P.S.	14,73	22,02	16,48

Tableau 29 : Action de l'éthylène sur l'activité peroxydasique de fragments de racine de *Cichorium intybus* après 4 jours de culture. (AP - activité peroxydasique ; P - protéines ; PF = poids de substance fraîche ; APS = activité peroxydasique spécifique)



Plus la dose d'éthylène augmente plus il y a de protéines dans les extraits.

Les zymogrammes des extraits des tissus de racine révèlent une augmentation de l'activité de l'isoperoxydase C_4 , une augmentation plus nuancée de celles des isoperoxydases C_1 et C_2 , et enfin l'apparition dans les tissus traités à l'éthylène d'une nouvelle isoenzyme, la C_3 (Figure 37).

IV. - CONCLUSIONS

Le bourgeonnement et l'activité peroxydasique des tissus de feuille étiolée de *Cichorium intybus* sont influencés par les composés susceptibles de modifier le métabolisme des prophyries.

L'action de l'EDTA se traduit par une diminution du nombre de bourgeons néoformés et par une baisse de l'activité peroxydasique. Nous conseillons donc l'utiliser, pour les tissus de *Cichorium intybus*, une dose cinq fois moins concentrée que celle préconisée par MURASHIGE et SKOOG, (1962), soit 7,46 mg l⁻¹.

Les sels de fer ajoutés aux milieux de culture ont un effet favorable sur le bourgeonnement. La chélation, qui théoriquement permet une meilleure disponibilité du fer, est peu importante pour les tissus maintenus à l'obscurité ; en effet le nombre de bourgeons néoformés est parfois plus élevé quand le fer n'est pas chélaté. La valence du fer intervient aussi bien sur le bourgeonnement que sur l'activité peroxydasique. C'est lorsque le fer est sous sa forme réduite (Fe⁺⁺) qu'il agit plus.

Un traitement de courte durée par le fer suffit à accroître le bourgeonnement et, corrélativement l'activité peroxydasique, seulement après 6 jours de culture, est plus importante dans les tissus traités. On notera toutefois que si dans les cals, donc après 40 jours de culture, on trouve une augmentation de la teneur en protéines totales lorsque du fer est ajouté au milieu de culture, dans les tissus primaires au contraire cette teneur en protéines est diminuée, au sixième jour.

En plus de son action bénéfique sur la production de bourgeons, le fer intervient sur leur développement. Ceux-ci sont plus chlorophylliens et ils sont de plus grande taille que les bourgeons obtenus sur le milieu de base, ou sur le milieu contenant de la kinétine. En effet, en présence de cette dernière, les feuilles des bourgeons néoformés sont souvent petites, vitreuses peu chlorophylliennes, la présence du fer permet de pallier ces inconvénients. De plus, ces deux substances, fer et kinétine associées ont un effet synergique sur le bourgeonnement.

Une autre particularité liée à la présence du fer a été mise en évidence. Du fait de nos conditions expérimentales, température de 25° C et lumière continue, il n'est pas rare, après 60 jours de culture d'observer la transformation des bourgeons végétatifs en boutons inflorescentiels mais

peu d'entre eux s'épanouissent. Dans ce cas, les inflorescences sont colorées en bleu clair. En présence de fer, le nombre de boutons est considérablement augmenté, la plupart donnent des inflorescences dont les fleurs ligulées sont intensément colorés.

L'action des composés précurseur (ALA) ou inhibiteur (LA) de la synthèse de la protoporphyrine IX est différente selon qu'ils sont ou non combinés au fer.

Les doses les plus fortes d'acide delta-aminovulinique utilisées diminuent la callogénèse ce qui est en relation avec la diminution du nombre de bourgeons néoformés. L'activité peroxydasique est, elle, très fortement augmentée. Des résultats similaires sont obtenus quand on ajoute de l'acide lévulinique à la place du ALA dans le milieu de culture. On notera toutefois que plus la concentration en LA est grande moins l'activité peroxydasique est forte.

Si en plus on associe le fer à l'une ou l'autre de ces substances, les activités peroxydasiques sont plus faibles, le bourgeonnement inhibé et la teneur en chlorophylle, est importante notamment en présence de fer et d'ALA.

Il n'y a pas de modifications de la carte isoperoxydasique des tissus traités par ces composés.

La sensibilité à l'éthylène varie selon la nature des tissus. Pour les tissus de feuille le bourgeonnement est à peine diminué et l'activité peroxydasique légèrement augmentée par cette hormone. Celle-ci interviendrait sur la répartition différente des activités des isoperoxydases. En effet l'isoperoxydase cathodique, qui migre plus rapidement présente une forte activité dans les tissus non traités et une activité faible dans les tissus traités, alors que pour les autres isoperoxydases le traitement à l'éthylène provoque un effet inverse.

Pour les tissus de racine, BOURIQUET (1972) avait déjà montré l'effet stimulant de l'éthylène sur la néoformation des bourgeons, ce que nos résultats confirment. Cette stimulation est précédée par une augmentation de la teneur en protéines et de l'activité peroxydasique et par l'apparition d'une nouvelle isoperoxydase dans les tissus après 4 jours seulement de traitement.

**RELATIONS ENTRE ACTIVITE PEROXYDASIQUE ET TENEUR EN
COMPOSES PHENOLIQUES**

L'action des facteurs physiques ou chimiques, qui interviennent sur le bourgeonnement, se traduit par une augmentation de l'activité des peroxydases solubles quand le bourgeonnement est stimulé et, inversement par une baisse d'activité des peroxydases s'il y a moins de bourgeons néoformés.

Toutefois, ces facteurs ne provoquent pas l'apparition de nouvelles isoperoxydases puisque les électrophorèses d'extraits de tissus ayant subi différents traitements révèlent des compositions isoperoxydasiques identiques.

Nous avons vu (Chapitre I) qu'il était possible de mesurer l'activité auxine-oxydasique des tissus de feuille étiolée fraîchement récoltés. Quarante huit heures après la mise en culture cette activité n'est plus décelable. Nous pensons qu'elle est masquée par des effecteurs présents dans les extraits bruts (PILET et GASPÀR, 1968).

Nous avons donc émis l'hypothèse de l'existence, dans les extraits bruts que nous employons, de composés capables de modifier l'activité peroxydasique et nous les avons recherchés.

I. - RECHERCHE D'EFFECTEURS

L'hypothèse est la suivante : si des composés, intervenant sur l'activité peroxydasique, existent dans les extraits bruts, en les ajoutant au mélange d'incubation comprenant du gaïacol et de l'eau oxygénée, la vitesse d'oxydation du gaïacol par une peroxydase purifiée variera. Il faut au préalable inactiver les enzymes contenues dans les extraits bruts, c'est pourquoi nous les avons placés au bain-marie à 100° C pendant 30 minutes.

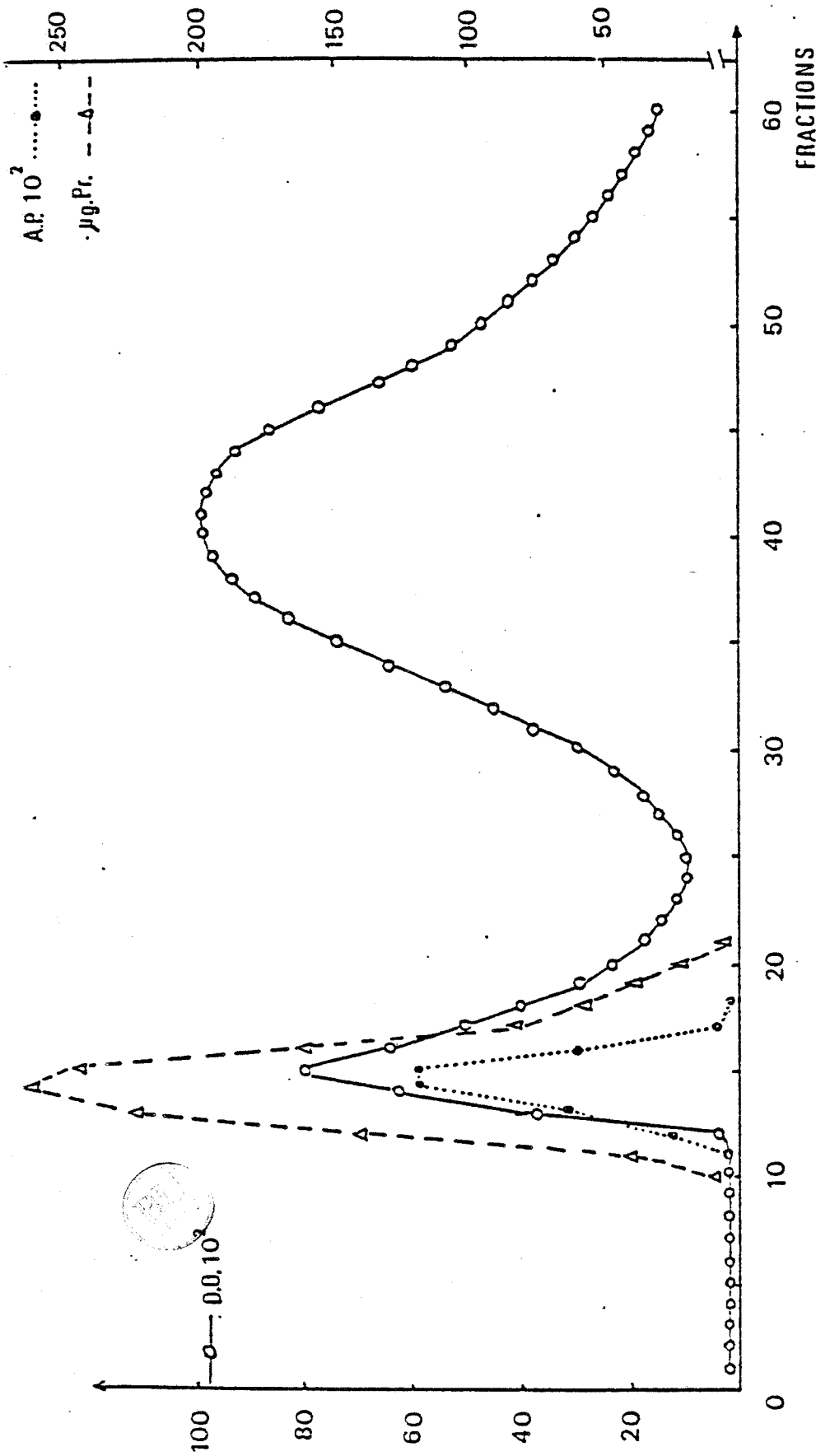


Figure 38 : Chromatographie d'un extrait (150 mg de tissus lyophilisés pour 10 ml) sur Sephadex G100 (débit d'éluion 2,5 ml/h/cm²).

Variations de l'absorbance ($D.O.10^2$) à 280 nm, de l'activité peroxydase (A.P. 10^2 - variation de la D.O. à 420 nm en 10 mn pour 2 ml de la fraction analysée) et de la teneur en protéines (μ g Pr. pour 4,5 ml de la fraction analysée).

Pour ces essais, nous avons choisi deux extraits provenant de tissus de feuille étiolée cultivés pendant six jours à l'obscurité ou éclairés.

Les résultats consignés dans le tableau 30 montrent que l'activité de la HRP, égale à 100 % quand le mélange d'incubation ne contient pas d'extrait bouilli, diminue en présence de ce dernier. Cette diminution est d'autant plus forte que le volume d'extrait bouilli ajouté est grand. Par conséquent il existe des effecteurs négatifs, donc des inhibiteurs dans les extraits. De plus, pour un même volume d'extrait bouilli, l'activité peroxydasique est plus faible si l'extrait provient de tissus cultivés à la lumière. Il y a donc moins d'inhibiteurs dans les tissus cultivés à l'obscurité.

Volume d'extrait brut bouilli	OBSCURITE	LUMIERE
2 ml	84	56
5 ml	57	17

Tableau 30 : Activité peroxydasique d'une peroxydase purifiée (HRP) en présence d'extraits bruts bouillis de tissus de feuille étiolée cultivés à l'obscurité ou à la lumière pendant 6 jours.

(Les résultats sont exprimés en % par rapport à l'activité peroxydasique, égale à 100 %, de la HRP quand le mélange d'incubation ne contient pas d'extrait bouilli.)

II. - TAMISAGE MOLECULAIRE

II.1. - Fractionnement d'un extrait brut

Le tamisage moléculaire, d'un extrait brut, sur colonne de Séphadex G100 et l'enregistrement de l'absorption de l'éluat de façon continue à 280 nm, permettent de mettre en évidence deux pics (Figure 38).

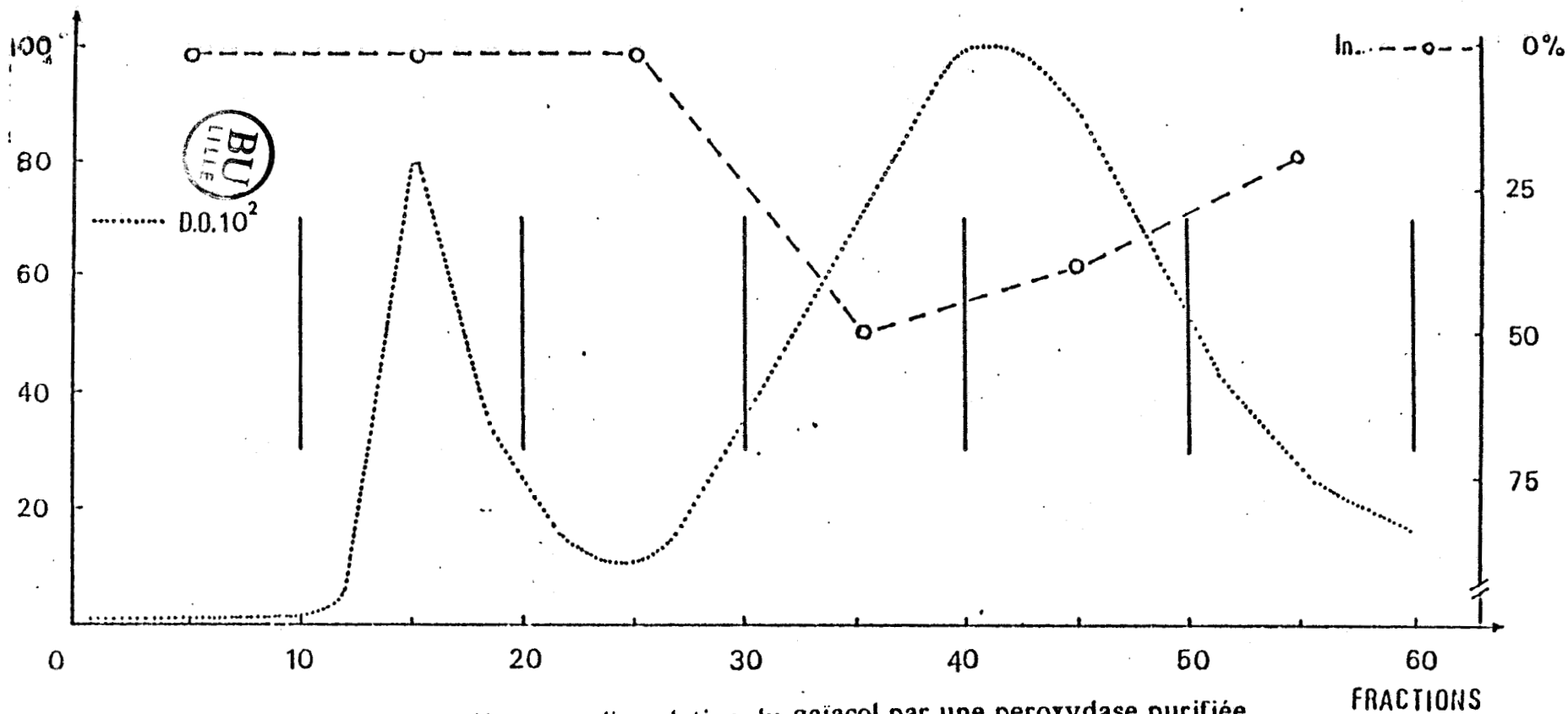


Figure 39 : Action *in vitro* des éluats sur l'oxydation du gaiacol par une peroxydase purifiée.

Après chromatographie (variation de l'absorbance D.O.² à 280 nm) sur Sephadex G.100 (débit d'élution 2,5 ml/h/cm²) d'un extrait (150 mg de tissu lyophilisé pour 10 ml) bouilli pendant 30 mn, les fractions sont regroupées par 10 et concentrées sous vide à 5 ml. On remplace dans le mélange d'incubation 1 ml de tampon pour 1 ml de l'éluat. L'inhibition (In) est exprimée en % par rapport à l'activité peroxydasique obtenue en présence de 1 ml d'éluat provenant des dix premières fractions ne renfermant que le tampon d'élution.

La teneur en protéines et l'activité peroxydasique ont été mesurées dans chaque fraction. Seules les fractions correspondantes au premier pic contiennent des protéines et des peroxydases. Dans les fractions relatives au deuxième pic, après précipitation par l'acide trichloracétique et dissolution sodique, il n'est pas possible de déceler les protéines et pourtant il y a absorption de la lumière à 280 nm ; longueur d'onde "spécifique" des protéines. Cette absorption est donc due à une interférence avec d'autres composés. En présence du réactif de FOLIN-CIOCALTEU une coloration bleue, caractéristique des phénols apparaît. Les fractions constituant le deuxième pic contiennent donc des composés phénoliques.

II.2. - Séparation des inhibiteurs

Après une chromatographie, similaire à celle ci-dessus, sur colonne de Séphadex G100, d'un extrait brut bouilli, nous avons cherché à localiser les inhibiteurs. Les premiers essais à partir d'aliquotes de chaque fraction n'ont pas permis de trouver les inhibiteurs, probablement par suite de la dilution provoquée par la chromatographie. Nous avons alors regroupé les fractions et les avons concentrées. Les fractions correspondantes au premier pic (Figure 39) ne modifient pas l'activité peroxydasique de la HRP, celle-ci est diminuée par les fractions du deuxième pic.

C'est dans ce deuxième pic que nous avons précédemment localisé les phénols, les inhibiteurs de l'activité peroxydasique seraient donc des composés phénoliques.

La chromatographie, sur papier, d'extraits méthanoliques de tissus de feuille étiolée de *Cichorium intybus* révèlent la présence en quantité relativement importante d'acides chlorogénique et caféique parmi d'autres composés phénoliques. A partir de solutions phénoliques réalisées avec des produits purs, acide chlorogénique et acide caféique 10^{-3} M, chromatographiées sur Séphadex G100 nous avons pu constater que l'élution de ces phénols intervenait dans les fractions correspondantes à celles dans lesquelles les inhibiteurs ont été mis en évidence.

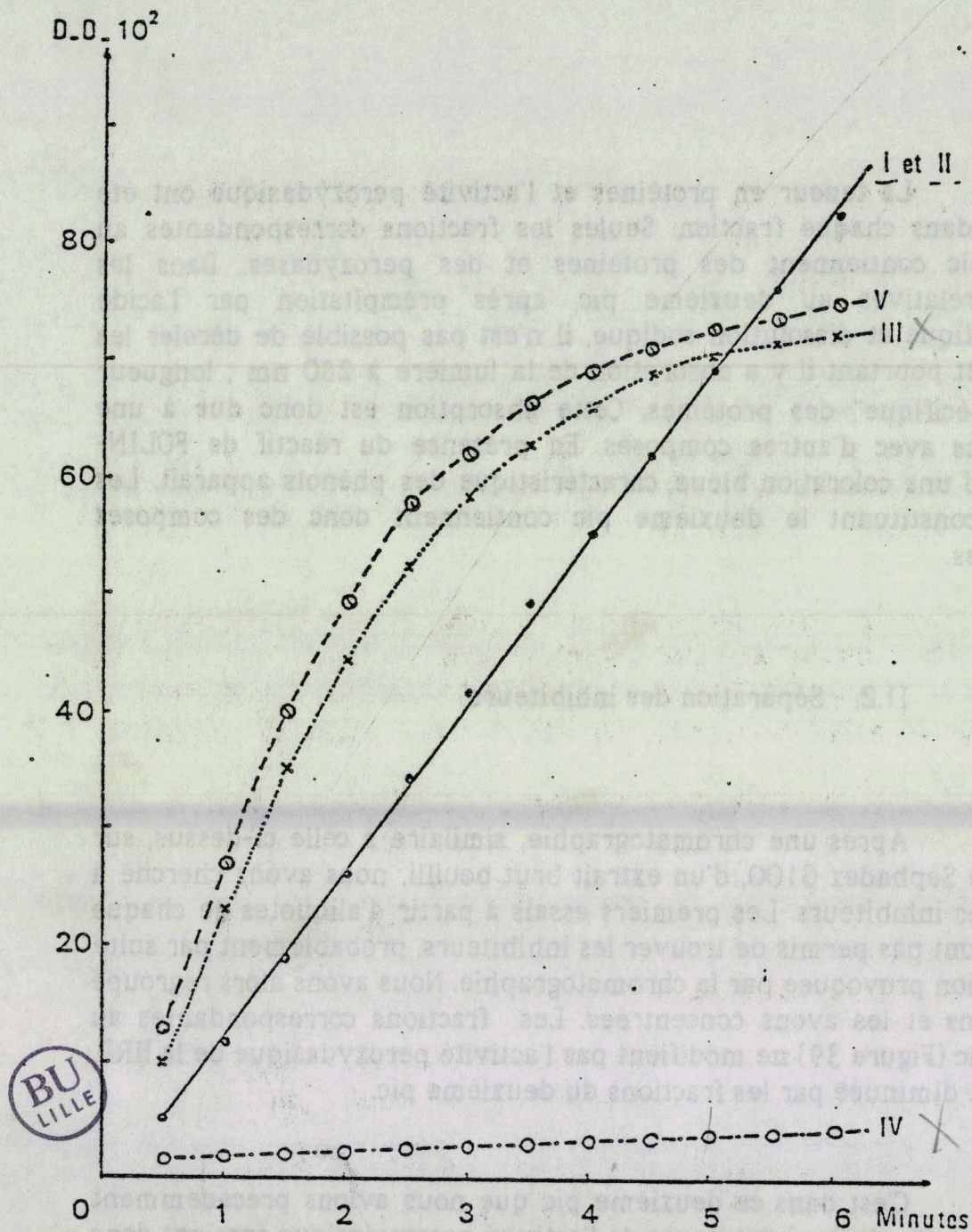


Figure 40 : Action *in vitro* de l'acide chlorogénique et de l'acide caféique sur l'oxydation du gaïacol par une peroxydase purifiée.

Les mélanges d'incubation contiennent :

- I. tampon 6,7 ml + gaïacol 2 ml + H_2O_2 1 ml
- II. tampon 5,7 ml + Gaïacol 3 ml + H_2O_2 1 ml
- III. tampon 5,7 ml + gaïacol 2 ml + H_2O_2 1 ml + Ac. Caf. 1 ml
- IV. tampon 5,7 ml + gaïacol 2 ml + H_2O_2 1 ml + Ac. Chlor. 1 ml
- V. tampon 4,7 ml + gaïacol 2 ml + H_2O_2 1 ml + Ac. Caf. 1 ml + Ac. Chlor. 1 ml

L'enzyme (0,3 ml d'une solution à 10^{-6} g/l) est ajoutée la dernière. On lit alors les variations de la D.O. 420 nm.

III. - ACTION *IN VITRO* DES ACIDES CHLOROGENIQUE ET CAFEIQUE SUR L'OXYDATION DU GAIACOL PAR UNE PEROXYDASE PURIFIEE (HRP).

Dans les extraits bruts de tissus de feuille nous venons de mettre en évidence des inhibiteurs, ils seraient de nature phénolique, il s'agirait probablement de l'acide chlorogénique et de l'acide caféique, composés phénoliques bien représentés dans les tissus de feuille étiolée d'Endive.

Par conséquent, à partir de produits purs du commerce, il est possible de vérifier ces suppositions. Pour cela, nous avons réalisé les cinétiques d'oxydation du gaiacol par une peroxydase purifiée en ajoutant au mélange d'incubation de l'acide caféique et/ou de l'acide chlorogénique.

Les mélanges, à savoir : $H_2O_2 + \text{gaiacol}$; $H_2O_2 + \text{gaiacol} + \text{acide caféique}$; $H_2O_2 + \text{gaiacol} + \text{acide chlorogénique}$; $H_2O_2 + \text{gaiacol} + \text{acides chlorogénique et caféique}$; sont donc préparés et l'enzyme (HRP) est ajoutée la dernière. Une remarque importante, tant que la peroxydase n'est pas présente les mélanges restent incolores, il n'y a par conséquent pas d'oxydation chimique des composés phénoliques.

Les cinétiques d'activité enzymatique en fonction de la composition du milieu d'incubation sont résumées dans la figure 40.

Pour la mélange de référence, c'est-à-dire $H_2O_2 + \text{gaiacol}$, la vitesse de la réaction est constante en fonction du temps; cela se traduit par une droite sur le graphique. Si on ajoute de l'acide chlorogénique la réaction est inhibée, au contraire si l'acide caféique est présent, la vitesse de la réaction varie, elle est rapide pendant les premières minutes, puis se stabilise et enfin s'annule presque par la suite.

Si le mélange d'incubation contient à la fois les deux composés phénoliques tout se passe comme si l'acide chlorogénique n'intervenait pas, la courbe est identique à celle obtenue avec l'acide caféique seul.

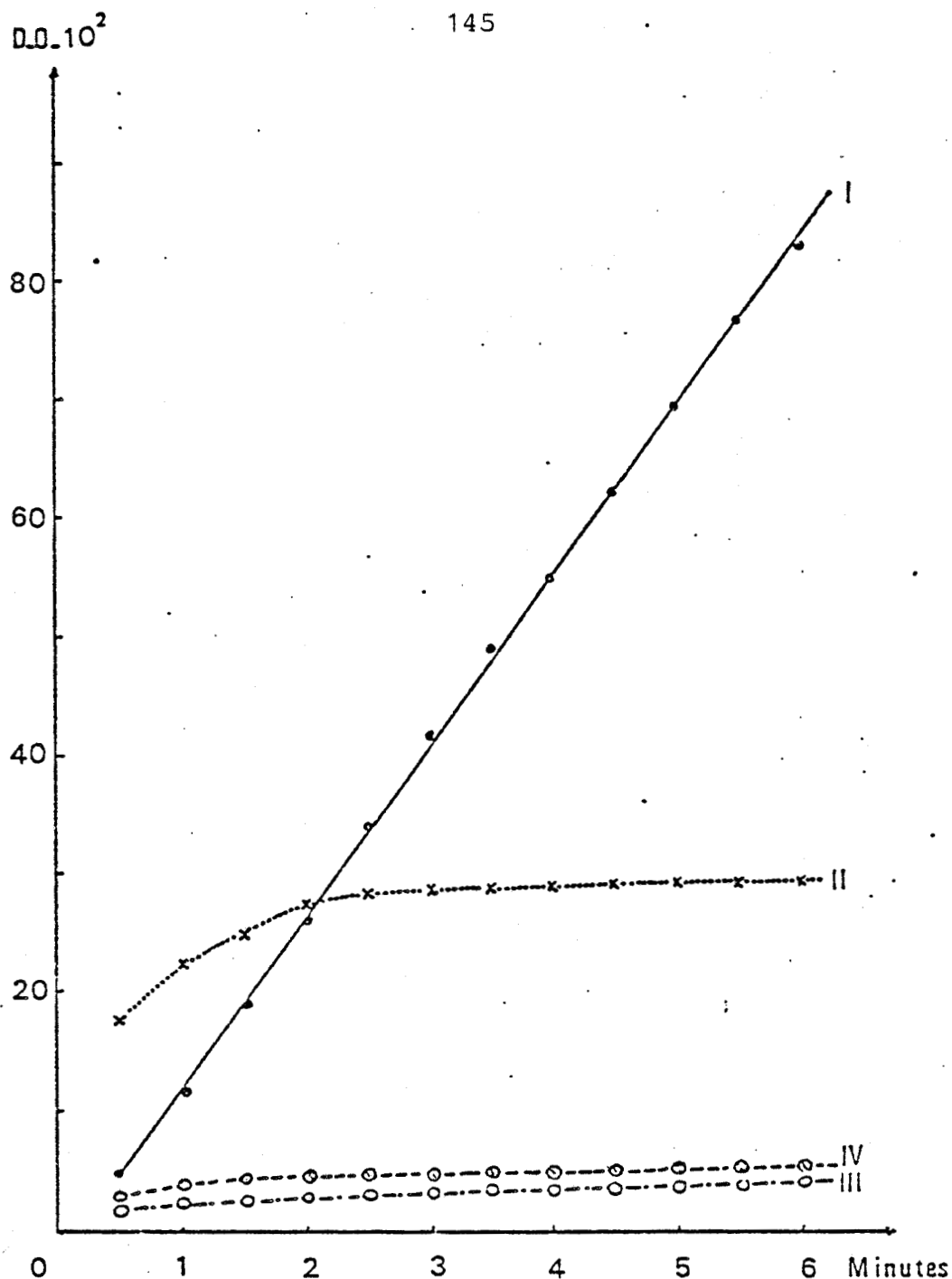


Figure 41 : Action *in vitro* des produits d'oxydation de l'acide chlorogénique et de l'acide caféique sur l'oxydation du gâiacol par une peroxydase purifiée.

- I. tampon 6,7 ml + H₂O₂ 1 ml + Enzyme 0,3 ml
 II. tampon 5,7 ml + H₂O₂ 1 ml + Enzyme 0,3 ml + Ac. caf. 1 ml
 III. tampon 5,7 ml + H₂O₂ 1 ml + Enzyme 0,3 ml + Ac. Chlor. 1 ml
 IV. tampon 4,7 ml + H₂O₂ 1 ml + Enzyme 0,3 ml + Ac. Caf. 1 ml + ac. chlor. 1 ml.

L'enzyme oxyde, l'acide caféique et l'acide chlorogénique. Après 10 mn d'incubation et remise à zéro du colorimètre ; 2 ml du gâiacol sont ajoutés, on lit alors les variations de la D.O. 420 nm.

Les composés phénoliques peuvent être oxydés par la peroxydase. Aussi, dans un deuxième essai, nous avons d'abord laissé agir l'enzyme sur l'acide caféique et/ou sur l'acide chlorogénique et, après cinq minutes, nous avons ajouté le gaiacol.

Dans ces conditions, les résultats obtenus sont différents (Figure 41).

L'oxydation du gaiacol est nettement diminuée en présence d'acide caféique alors qu'elle est complètement inhibée par l'acide chlorogénique seul ou associé à l'acide caféique.

L'acide chlorogénique oxydé est donc encore inhibiteur et l'acide caféique le devient après oxydation.

IV. - VARIATIONS DE LA TENEUR EN PHENOLS TOTAUX

Les localisations subcellulaires des peroxydases et des composés phénoliques sont probablement différentes. Mais, lors de l'extraction des enzymes, qui nécessite le broyage des tissus, la compartimentation intracellulaire des composants organiques n'est plus respectée. Par conséquent, les activités peroxydasiques mesurées dans les extraits bruts peuvent être influencées par la présence plus ou moins grande de composés phénoliques dans les tissus. C'est pourquoi nous avons, en reprenant certaines expériences, entrepris le dosage des phénols totaux.

IV.1. - Influence des conditions d'éclairément

Nous avons étudié l'évolution de la teneur en phénols totaux dans des explantats de feuille étiolée cultivés, pendant 12 jours, en lumière continue ou à l'obscurité totale, et dans des explantats soit éclairés pendant 3, 6 ou 9 jours puis placés à l'obscurité durant 3 jours, soit maintenus à l'obscurité 3, 6 ou 9 jours puis éclairés pendant trois jours. L'activité peroxydasique des cultures a également été mesurée.

En lumière continue, la synthèse des composés phénoliques est importante, elle se poursuit continuellement pendant les 12 jours de culture (Figure 42).

Composés phénoliques
 $\mu\text{g. par explantat}$

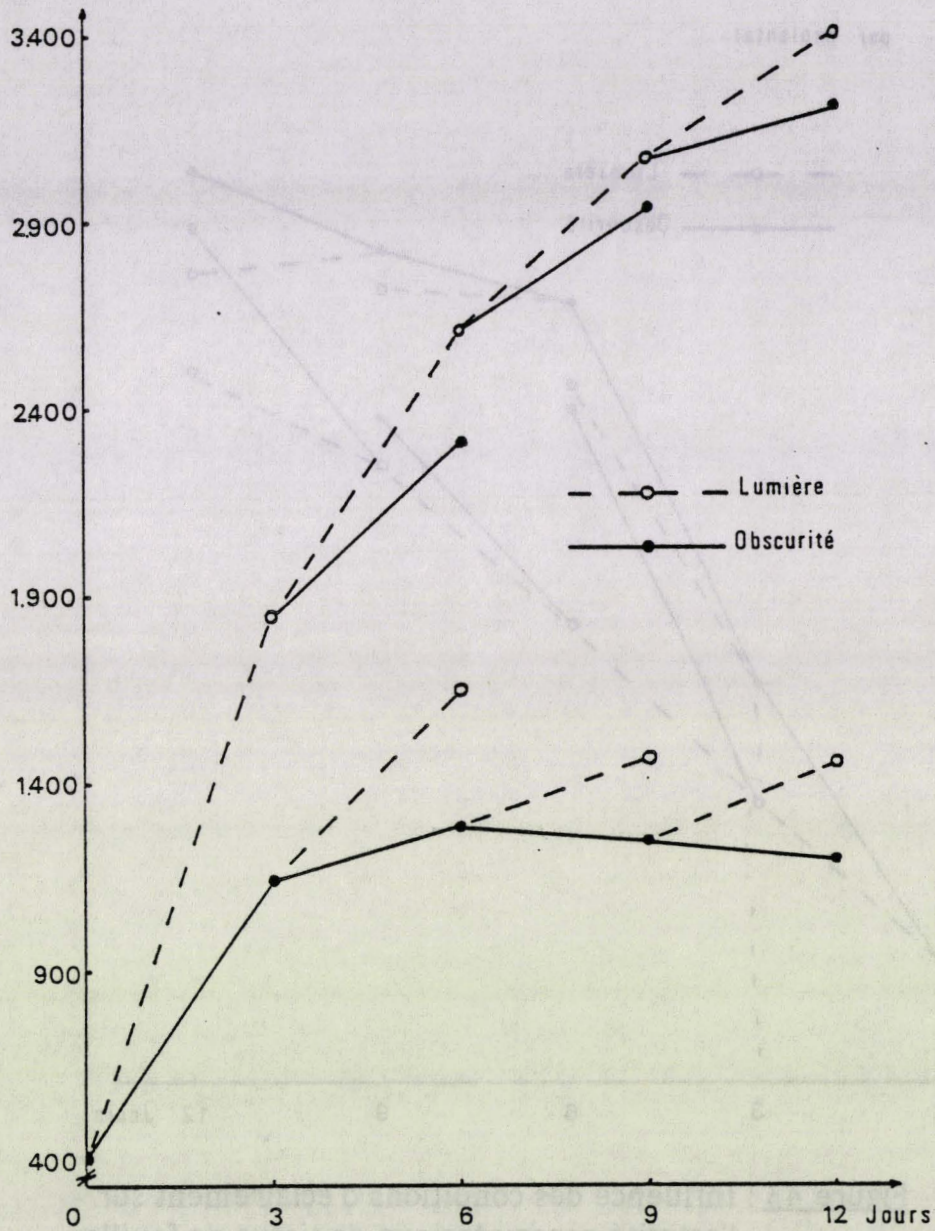


Figure 42 : Evolution de la teneur en composés phénoliques totaux, en fonction de l'éclairage de tissus de feuille étiolée cultivés *in vitro*.

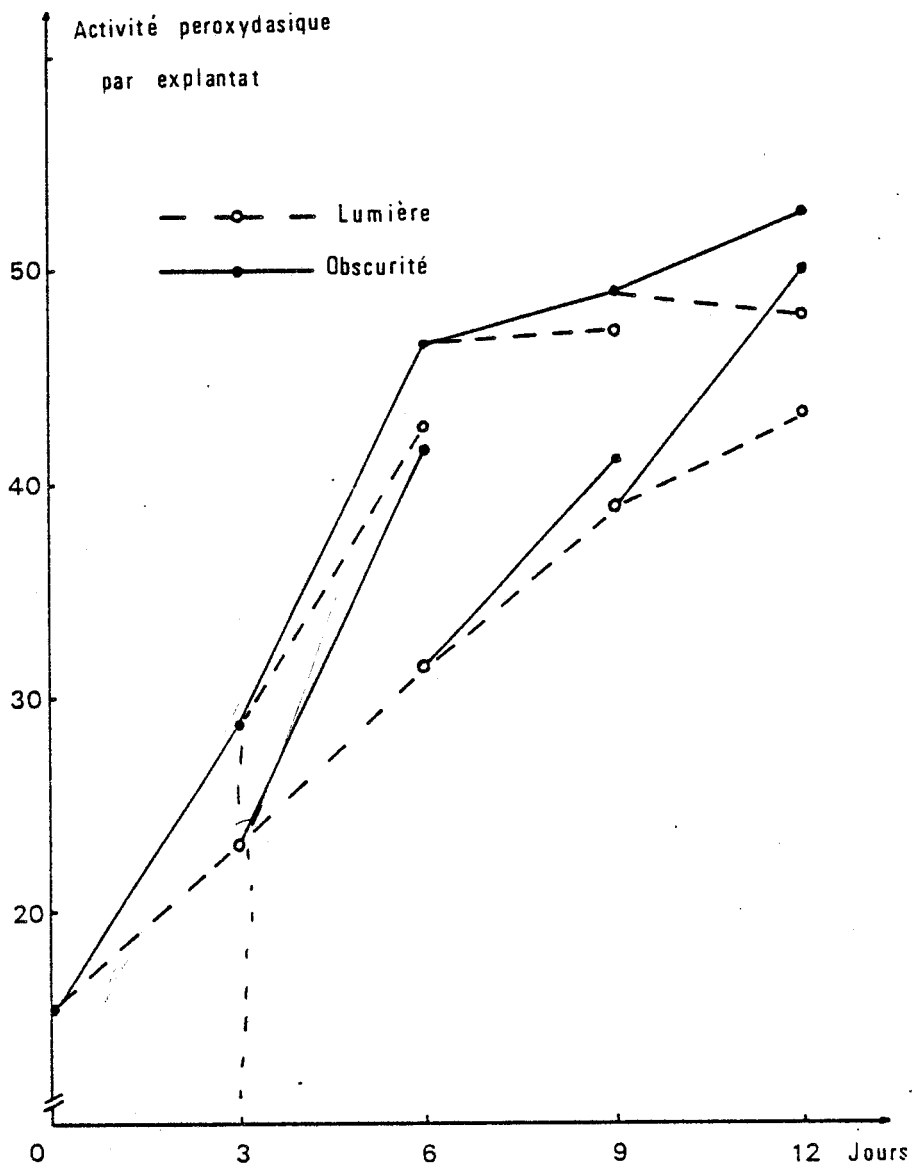


Figure 43 : Influence des conditions d'éclairément sur l'activité peroxydasique de tissus de feuille étiolée de *Cichorium intybus*.

Si les tissus sont maintenus à l'obscurité, on constate une accumulation des phénols pendant les trois premiers jours. Celle-ci est bloquée par la suite puisque la teneur en phénols diminue entre le sixième et le douzième jour.

La teneur en composés phénoliques diminue si les explantats d'abord éclairés, sont ensuite privés de lumière. Inversement, dans les tissus initialement placés à l'obscurité puis éclairés la concentration en phénols augmente.

Si l'on compare ces résultats à ceux qui traduisent les variations d'activité peroxydasique des tissus placés dans les mêmes conditions expérimentales (Figure 43) on observe :

- que les tissus cultivés en lumière continue ont une activité peroxydasique relativement faible alors que les phénols sont présents en plus grande quantité.

- que les tissus maintenus à l'obscurité manifestent une forte activité peroxydasique tandis que leur teneur en phénols est faible.

Il existe donc une relation inverse entre niveau d'activité peroxydasique et quantité en composés phénoliques.

Cette relation se confirme si on modifie les conditions d'éclairement.

Le passage à la lumière de tissus qui en sont, au préalable, privés, déclenche la synthèse des phénols et diminue l'activité peroxydasique alors que celle-ci est augmentée et la teneur en phénols abaissée par le transfert à l'obscurité de tissus d'abord éclairés.

IV.2. - Influence de la qualité de la lumière

Les conditions expérimentales sont celles décrites dans le chapitre II paragraphe II.4.

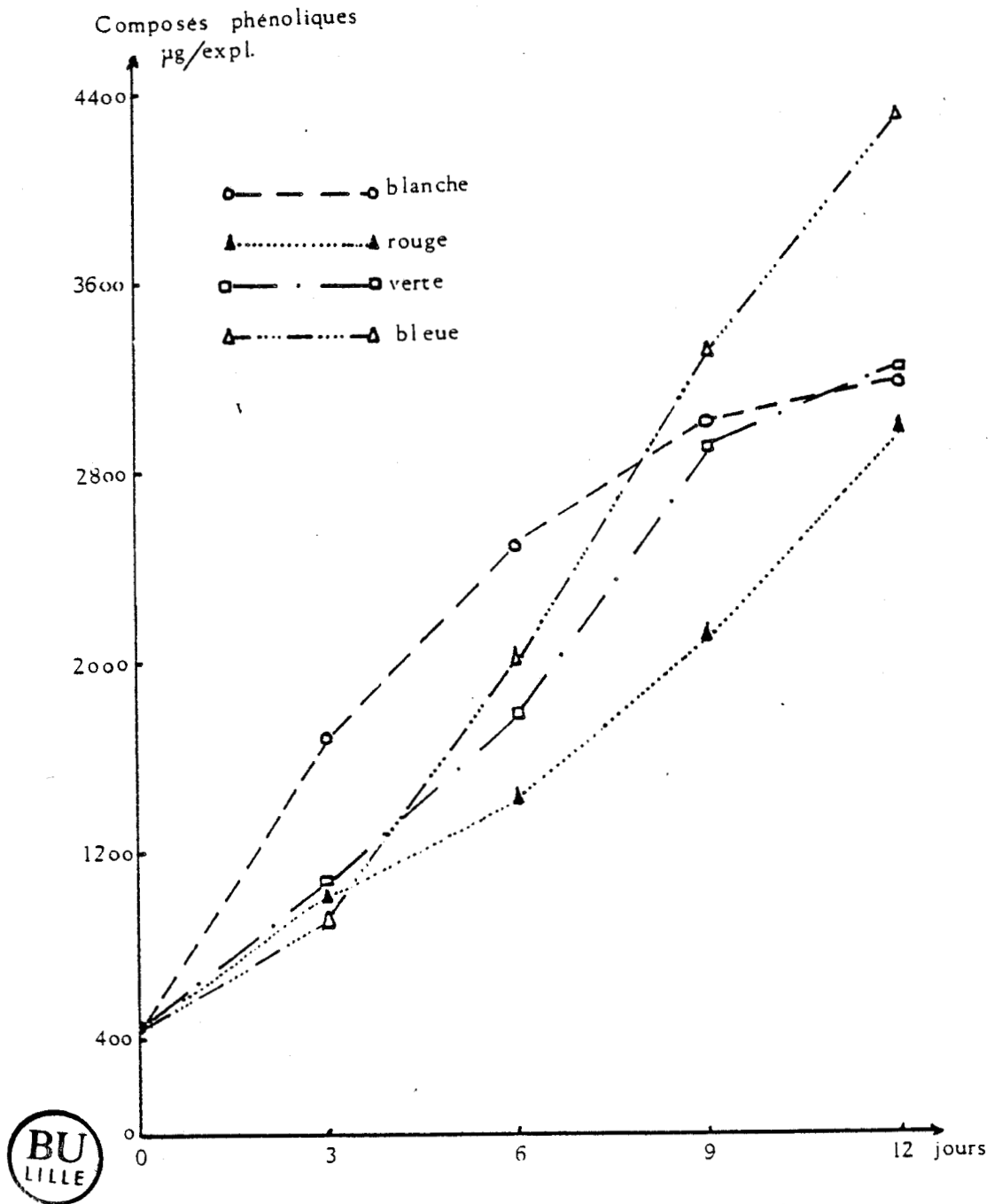


Figure 44 : Influence de lumières relativement monochromatiques sur la teneur en phénols totaux de tissus de feuille étiolée de *Cichorium intybus*.

La teneur en phénols est fortement influencée par la nature de l'éclairement (Figure 44).

Après trois jours de culture, la teneur en phénols des tissus recevant des éclairagements relativement monochromatiques de 460, 530 et 665 nm est fortement inférieure à celle des lots témoins éclairés par la lumière polychromatique.

Du troisième au douzième jour, l'accumulation des composés phénoliques se poursuit, sa vitesse est, d'après la pente des courbes, nuancée par la nature de l'éclairement. Les radiations rouges, moins actives pendant les six premiers jours, accélèrent la synthèse entre le sixième et le douzième jour. En lumière verte, une légère stimulation entre le sixième et le neuvième jour, suivie d'un ralentissement jusqu'au douzième jour est constatée. La vitesse d'accumulation des phénols des tissus soumis aux radiations bleues est constante et rapide à partir du troisième jour. Dès le neuvième jour, la teneur en phénols des tissus ainsi éclairés devient supérieure à celle des tissus cultivés sous lumière polychromatique.

Si nous comparons les résultats de vitesse d'accumulation des phénols (Figure 45) à ceux trouvés lors de l'étude de l'influence de la qualité de la lumière sur l'activation peroxydasique (Figure 32) il apparaît :

- Après trois jours de culture, l'activité peroxydasique est plus forte dans les explantats soumis aux différentes radiations que dans ceux éclairés en lumière blanche. Corrélativement, les vitesses de production des composés phénoliques sont plus faibles dans ces premiers que dans les derniers.

- Six jours après la mise en culture, c'est en lumière bleue que l'activité peroxydasique est la plus faible, elle est inférieure à celle trouvée en lumière blanche, alors que les activités en lumière verte et rouge sont supérieures à cette dernière. Or, la vitesse d'accumulation des phénols en lumière bleue est plus grande qu'en lumière blanche, elle même plus forte qu'en lumière verte ou rouge.

- Entre le sixième et le neuvième jour de culture, les radiations vertes accélèrent la production des composés phénoliques et cela se traduit par un ralentissement très net de l'activité peroxydasique. Celle-ci diminue aussi en lumière rouge pour égaler celle trouvée en lumière polychromatique, et, au neuvième jour, la vitesse d'accumulation des phénols est plus rapide en lumière rouge.

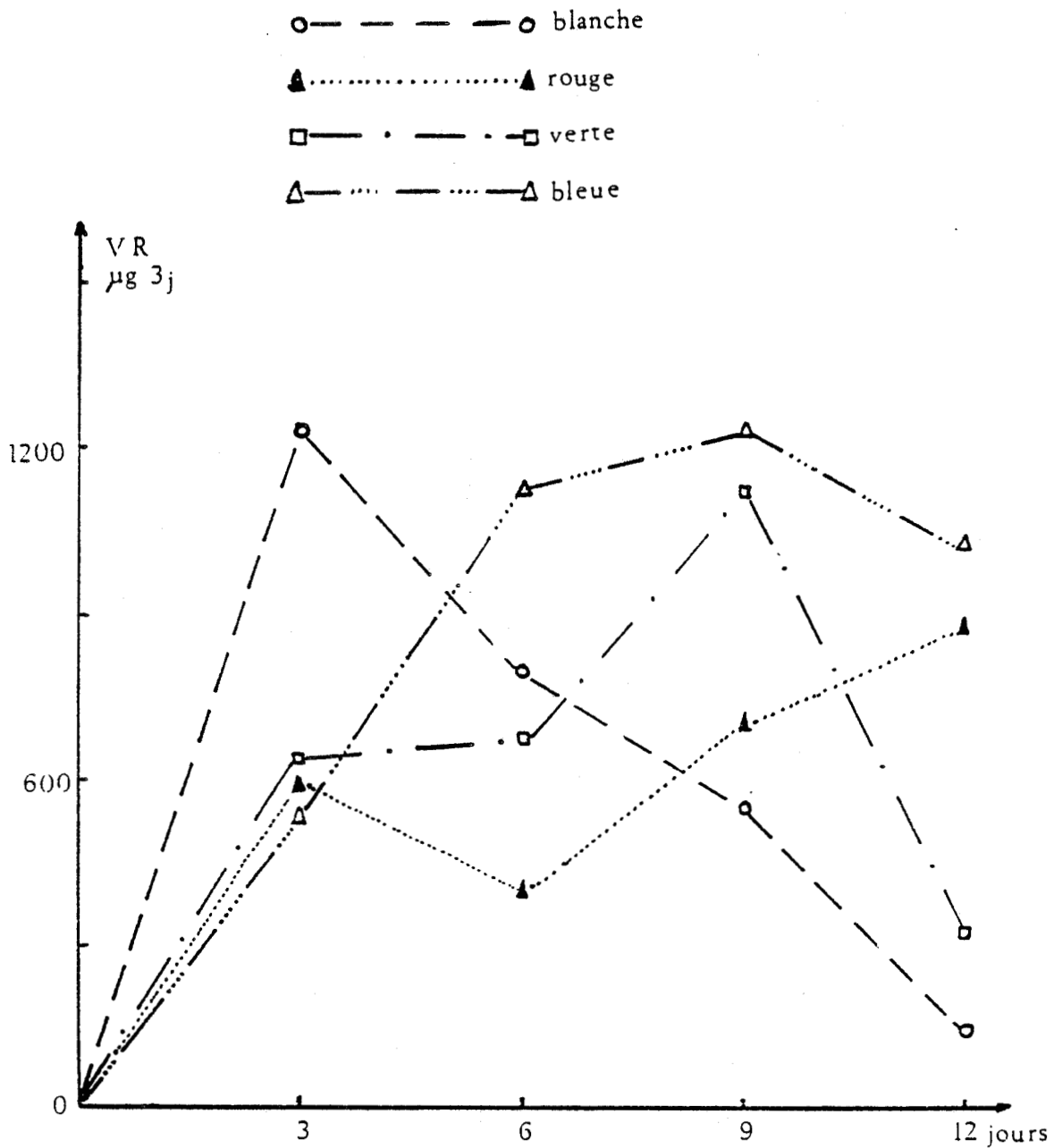


Figure 45 : Vitesses relatives (ug/3 jours) d'accumulation des composés phénoliques dans des explantats de feuille étiolée cultivés sous des lumières relativement monochromatiques.

- Enfin, après douze jours de culture, en lumière rouge ou bleue les activités peroxydasiques sont plus faibles et l'accumulation des composés phénoliques plus rapides qu'en lumière blanche ou verte. La reprise d'activité peroxydasique pour cette dernière condition semblant liée à la chute brutale de la production des composés phénoliques.

IV.3. - Influence de l'éthylène

Les phénols totaux ont été dosés, juste après le traitement d'explantats de racine et de feuille de *Cichorium intybus* par l'éthylène, dont l'action sur l'activité peroxydasique a déjà été étudiée (paragraphe III.2.2.).

La concentration en phénols des tissus de feuille augmente en présence d'éthylène et l'activité peroxydasique est peu modifiée (Figure 46).

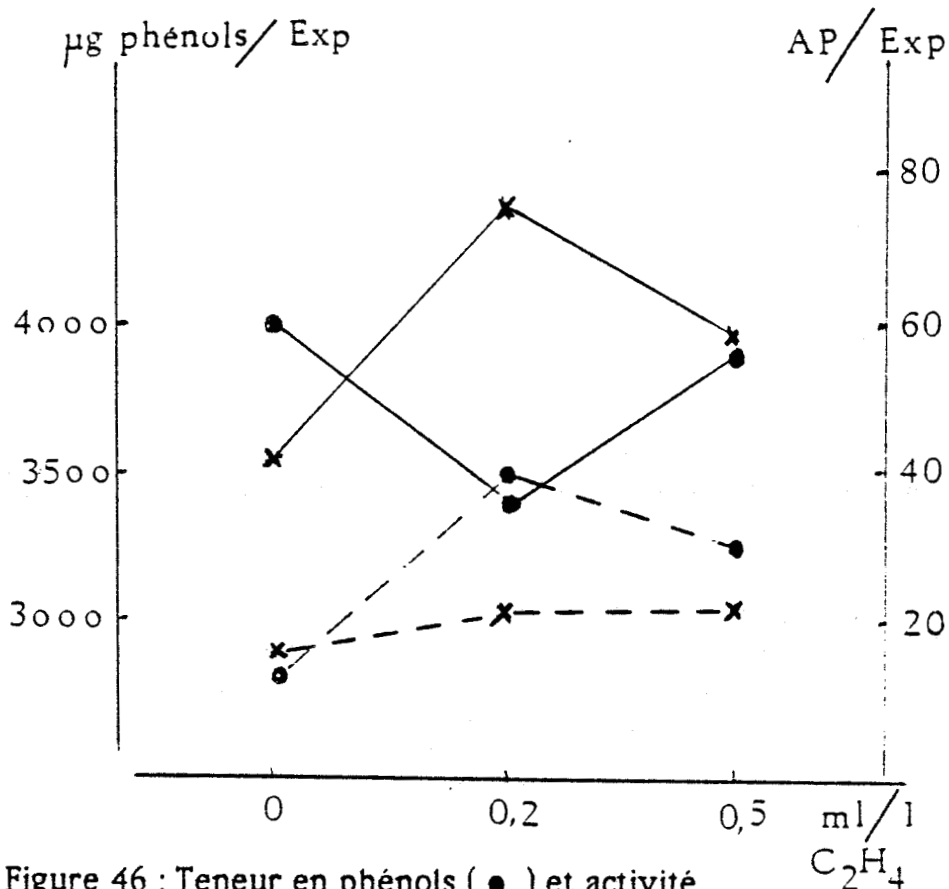


Figure 46 : Teneur en phénols (●) et activité peroxydasique (x) d'explantats de feuille étiolée (- - - -) et de racine (—) de *Cichorium intybus*, après 4 jours de traitement par C_2H_4 .

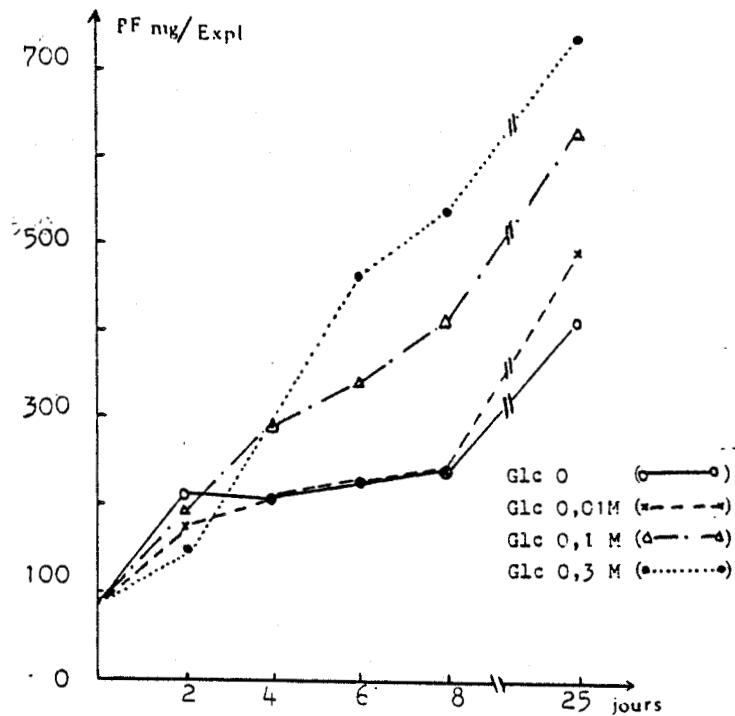


Figure 47 : Variations du poids de matière fraîche (PF) d'explantats de racine de *Cichorium intybus* en fonction de la concentration en glucose.

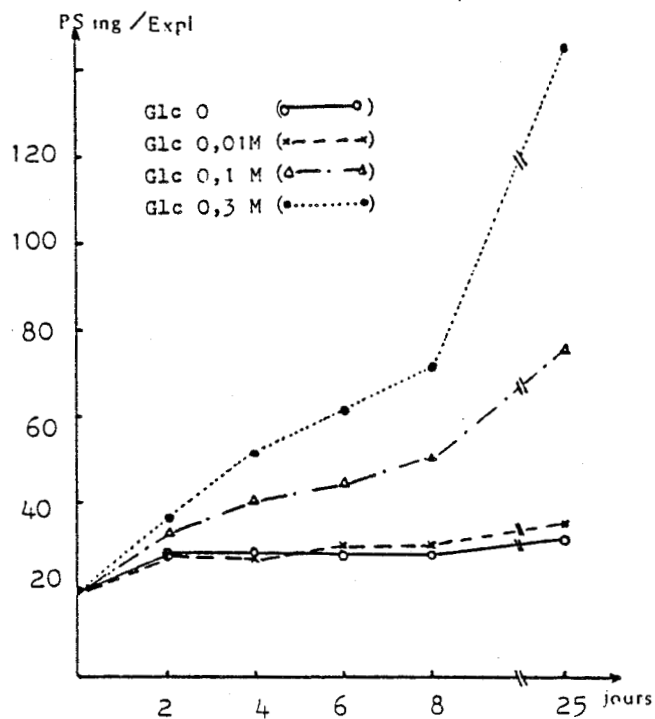


Figure 48 : Variations du poids de matière sèche (PS) d'explantats de racine de *Cichorium intybus* en fonction de la concentration en glucose.



Dans les tissus de racine, l'éthylène $0,2 \text{ ml l}^{-1}$ provoque une nette augmentation de l'activité peroxydasique et, comparée aux tissus non traités la teneur en phénols est fortement diminuée.

A la dose de $0,5 \text{ ml l}^{-1}$ l'activité peroxydasique est plus faible et la teneur en phénols plus importante que celles mesurées pour la concentration $0,2 \text{ ml l}^{-1}$.

IV.4. - Influence du glucose

Jusqu'alors, la plupart de nos résultats montrent que les facteurs qui favorisent le bourgeonnement agissent, très tôt, en augmentant l'activité peroxydasique et en diminuant la teneur en composés phénoliques des tissus.

Nous étions curieux de savoir quels seraient les effets de facteurs limitant le bourgeonnement, et suite aux observations de VASSEUR (1979) , LEFEBVRE (1979) et de BACKOULA (1987), indiquant que les sucres ajoutés aux milieux de culture pouvaient inhiber le bourgeonnement, nous nous sommes intéressé au glucose.

Nous avons utilisé les tissus de racine de *Cichorium intybus*. Les petits explantats, 2 mm d'épaisseur et 6 mm de diamètre, sont cultivés, en lumière continue à 25°C , en présence de glucose à raison de 0 ; 0,01 ; 0,1 et 0,3 M. ajouté au milieu de culture contenant les sels minéraux de la solution préconisée par HELLER (1953).

IV.4.1. - Influence sur la croissance des explantats et sur le nombre de bourgeons néoformés.

Les variations des poids de matière fraîche et de matière sèche sont reportées dans les figures 47 et 48.

Sans glucose dans le milieu de culture ou en présence de 0,01 M., le poids de matière fraîche augmente légèrement tandis que le poids de substance sèche ne varie pas.

La biomasse des cultures augmente d'autant plus que le milieu de culture est riche en glucose, et après huit jours de culture le poids de substance sèche est doublé pour la dose 0,1 M. et triplé pour la dose 0,3 M.

Après 25 jours de culture, les bourgeons sont dénombrés et la biomasse des explantats est évaluée en tenant compte d'une part du poids des bourgeons et d'autre part du poids des tissus (cals + tissus primaires). Ces résultats sont consignés dans le tableau 31.

: Concentrations en glucose Mol l ⁻¹	0	0,01	0,1	0,3
Nombre moyen de bourgeons/Expl.	3,06	2,6	1,86	1,06
Poids moyen des bourgeons/Expl en mg.	131	144	121	70
PS	9,4	10,5	12	7,7
Poids moyen des cals + tissus primaires/ Expl.(mg)	301	336	550	838
PS	23,6	27,1	63,3	136,4
Activité peroxydasique/100mg P.S cal+ tissus primaires	14,8	13	8,7	4,3
Teneur en phénols ug/100mg PS cal+ tissus primaires	1090	1040	1680	2040

Tableau 31 : Action du glucose sur le nombre de bourgeons néoformés, sur la biomasse, sur l'activité peroxydasique et sur la teneur en phénols totaux d'explantats de racine de *Cichorium intybus* après 25 jours de culture en lumière continue à 25° C.



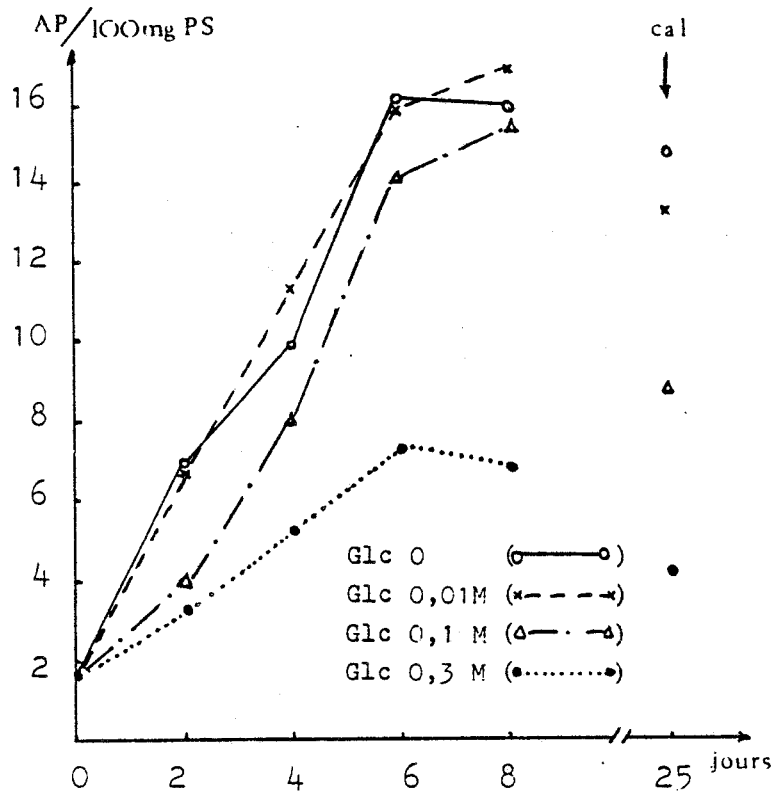


Figure 49 : Variations de l'activité peroxydasique (AP) d'explantats de racine de *Cichorium intybus* en fonction de la concentration en glucose.

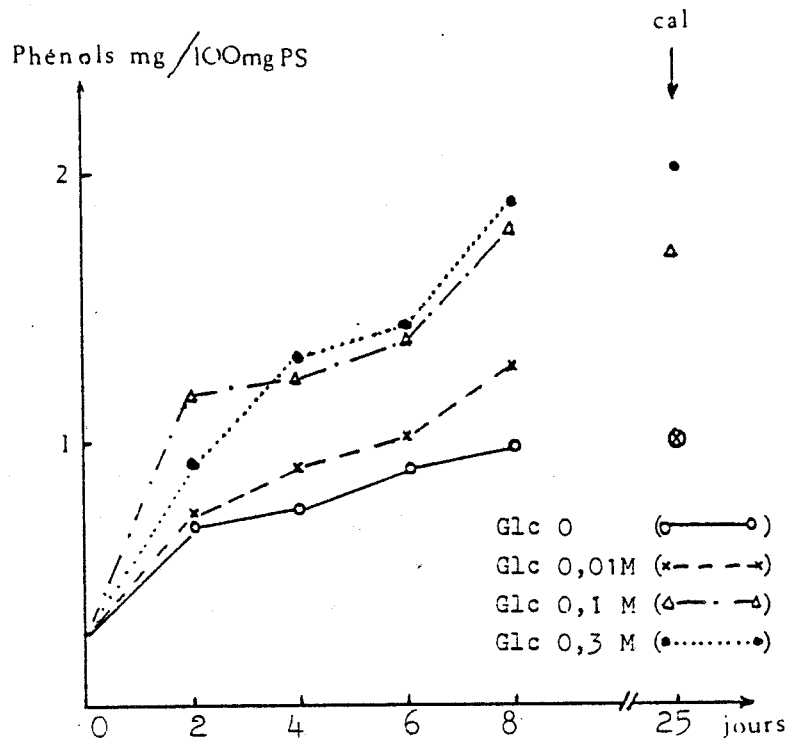


Figure 50 : Variations de la teneur en phénols totaux d'explantats de racine de *Cichorium intybus* en fonction de la concentration en glucose.

Plus il y a de sucre dans le milieu de culture, moins le nombre de bourgeons néoformés est grand.

La prolifération de tissus est d'autant plus importante que la dose de glucose employée est forte.

Les bourgeons représentent 30 % de la biomasse de l'explantat sans sucre dans le milieu de culture, 30 % également avec 0,01 M. 18,5 % et 7,7 % aux doses respectivement de 0,1 M. et 0,03 M.

IV.4.2. - Influence sur l'activité peroxydasique et la teneur en phénols totaux.

Les résultats des dosages de l'activité peroxydasique et de la teneur en phénols totaux, pendant les huit premiers jours de culture, sont reportés dans les figures 49 et 50.

- Les activités peroxydasiques des explantats cultivés sans sucre ou en présence de 0,01 M. de glucose sont les mêmes. Elles évoluent de façon identique, c'est à dire qu'elles augmentent rapidement jusqu'au sixième jour puis se stabilisent du sixième au huitième jour. Elles sont plus importantes dans les milieux peu riches en sucre ; c'est à la concentration 0,3 M. que l'activité peroxydasique est la plus faible.

- L'accumulation des phénols pendant les premiers jours de culture est d'autant plus grande que la teneur en glucose du milieu de culture est élevée.

- Après 25 jours de culture (Tableau 31), les activités peroxydasiques et les teneurs en phénols totaux ont été mesurées dans les explantats débarrassés de leurs bourgeons. on retrouve la même distribution qu'après huit jours de culture, c'est-à-dire que plus il y a de sucre dans le milieu plus il y a de phénols et moins l'activité peroxydasique est forte.

Les diagrammes (Figure 51) des activités peroxydasiques et des teneurs en composés phénoliques après six jours de culture, donc avant l'apparition des bourgeons, associés au diagramme du nombre de bourgeons produits par explantats après 25 jours de culture sont très démonstratifs.

Ils témoignent d'une part que la diminution précoce de l'activité peroxydasique, provoquée par la présence de sucre dans le milieu, réduit ultérieurement le bourgeonnement, que d'autre part à une activité peroxydasique faible correspond une teneur élevée en composés phénoliques.

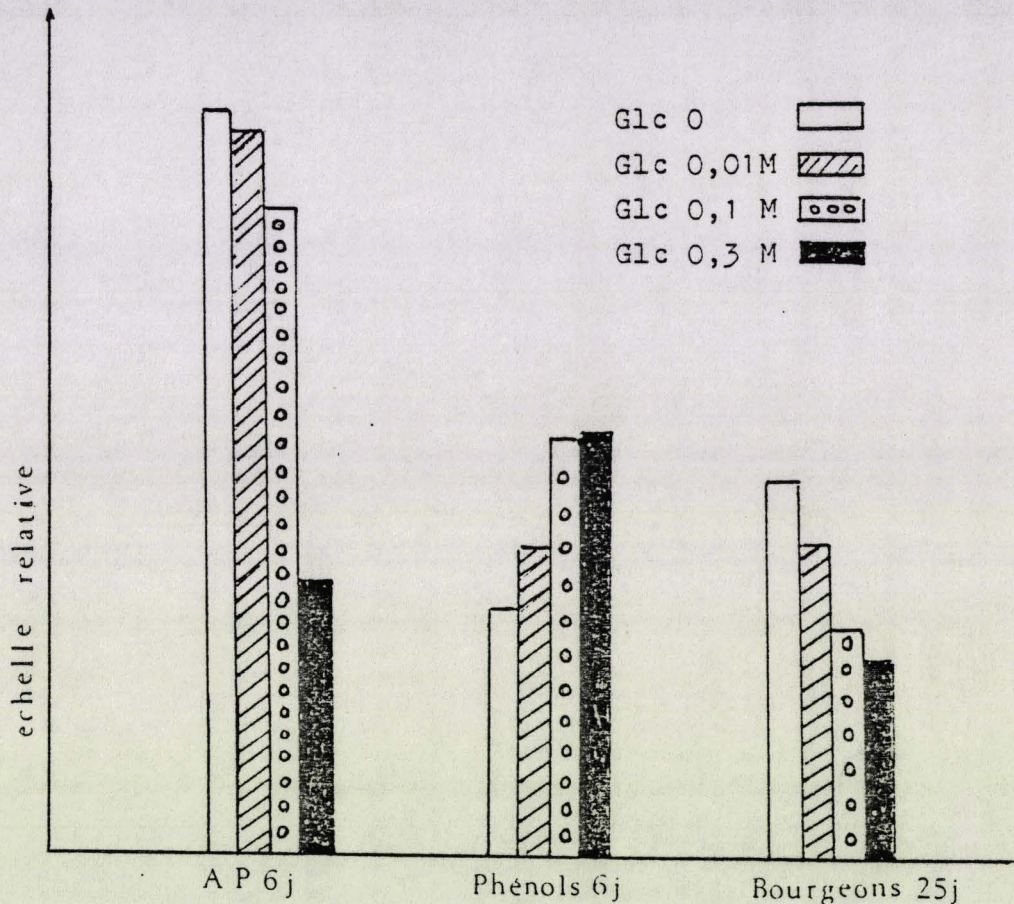


Figure 51 : Diagrammes montrant la relation inverse entre activité peroxydasique (AP) et teneur en composés phénoliques d'une part, et l'influence du niveau d'activité peroxydasique après 6 jours de culture sur la capacité de néoformation de bourgeons, par des explantats de racine de *Cichorium intybus* d'autre part.



V. - L'ELECTROFOCALISATION

La séparation des isoperoxydases de tissus de feuille étiolée par électrophorèse sur gel d'amidon ne permet pas d'apprécier les effets différentiels des composés phénoliques sur certaines d'entre elles. Aucune différence aussi bien qualitative que quantitative ne peut être observée entre les isoperoxydases des tissus cultivés à la lumière ou à l'obscurité. De même ces différences n'existent pas entre des tissus non traités ou traités par la kinétine et, pourtant dans ces dernières, l'activité peroxydasique globale est fortement augmentée.

L'électrofocalisation sur gel d'acrylamide des isoperoxydases à partir des extraits de tissus de feuille étiolée donne des résultats intéressants (Figure 52).

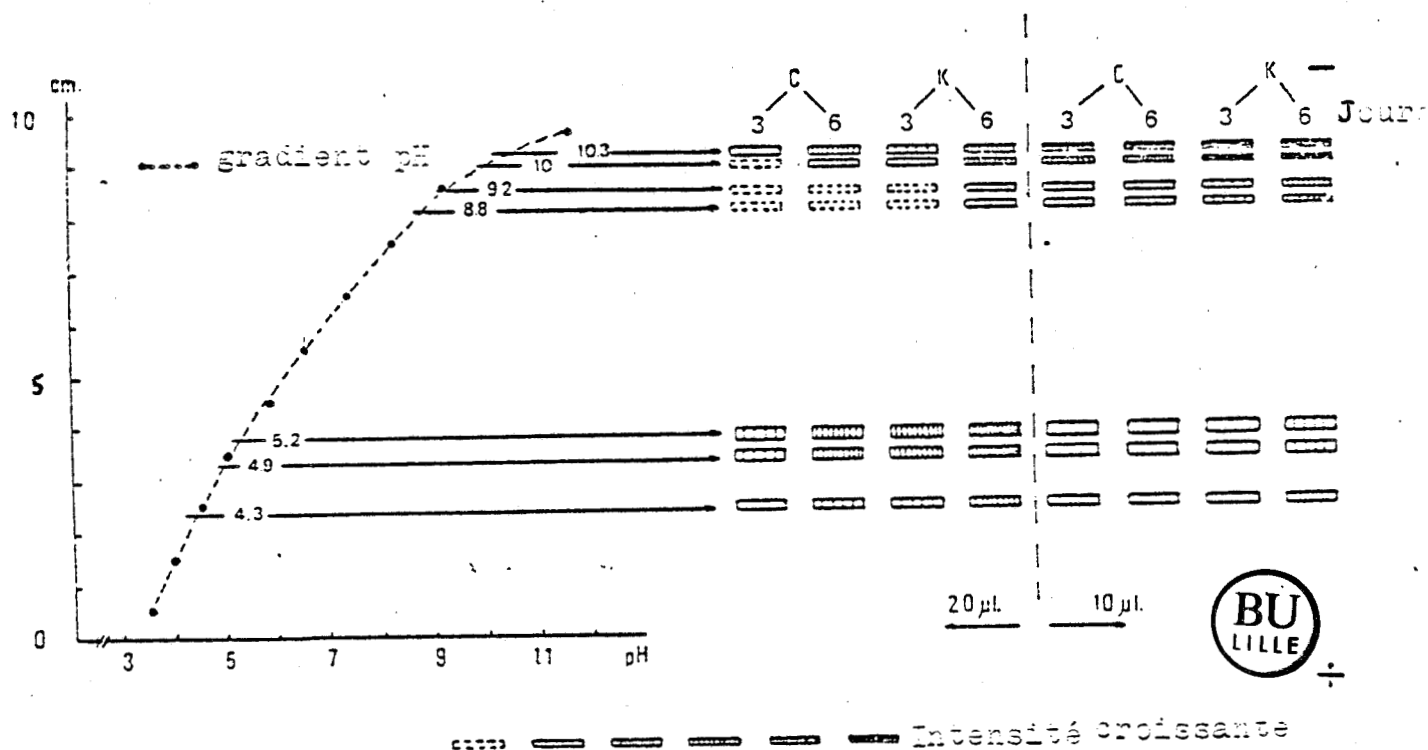


Figure 52 : Electrofocalisation sur gel de polyacrylamide d'extraits de feuille étiolée de *Cichorium intybus* cultivée 3 ou 6 jours en présence (K) ou sans (C) de kinétine (10^{-5} M.) en lumière continue. Deux quantités différentes des mêmes extraits ont été déposées sur le gel.

Par cette méthode, toutes les isoenzymes séparées dans les extraits de tissus traités par la kinétine montrent une plus grande intensité que celle des tissus témoins.

Si l'on dépose une quantité plus faible d'extrait, l'intensité des isoenzymes décroît, exceptée celle des deux plus cathodiques qui augmente.

Ceci peut être interprété comme une dilution de composés qui, en dessous d'une certaine concentration, inhibent de façon moins importante les isoperoxydases. Il semblerait alors que l'inhibiteur peu accompagner l'isoperoxydase pendant sa migration électrophorétique.

VI. - CONCLUSIONS

Nous avons démontré qu'il existe des inhibiteurs de l'activité peroxydasique dans les extraits bruts que nous utilisons.

Ces inhibiteurs sont de nature phénoliques.

Nos résultats, de l'action *in vitro* sur l'oxydation du gaïacol par une peroxydase purifiée, des acides chlorogénique et caféique, composés bien représentés dans les tissus de feuille étiolée de *Cichorium intybus* nous permettent d'avancer l'hypothèse selon laquelle l'inhibition serait probablement attribuée à des formes oxydées de ces composés phénoliques.

Les conditions d'éclairement influencent la synthèse des phénols, celle-ci est faible quand les tissus ne sont pas éclairés. Un passage à la lumière déclenche la synthèse phénolique qui est freinée ou arrêtée par un retour à l'obscurité.

Il existe une relation inverse entre activité peroxydasique et teneur en composés phénoliques. Cette relation n'est pas liée aux valeurs absolues, en effet c'est lorsque l'accumulation des phénols est la plus grande que l'activité peroxydasique est la plus diminuée.

L'action de l'éthylène sur la teneur en composés phénoliques de tissus de feuille étiolée est faible, de même que son action sur l'activité

peroxydasique. Par contre, dans les tissus des racine^s, l'éthylène augmente sensiblement l'activité peroxydasique et ceci est corrélatif d'une diminution de la teneur en phénols.

A partir de petits explantats de racine de *Cichorium intybus* nous confirmons les résultats de BACKOULA (1987) quant au rôle du glucose sur la néoformation des bourgeons. Plus le milieu de culture est riche en sucre, moins il y a de bourgeons formés. En début de culture, l'activité peroxydasique est forte et la teneur en phénols faibles en présence de petites quantités de sucre, alors que c'est l'inverse quand la concentration en glucose du milieu de culture augmente.

La séparation des peroxydases par électrofocalisation fournit des résultats qui permettent de penser que les phénols interviendraient en accompagnant l'isoperoxydase pendant sa migration, peut être en se fixant sur les sites actifs de l'enzyme ou tout au moins les masqueraient plus ou moins selon leur concentration dans les extraits.

CONSIDERATIONS GENERALES ET CONCLUSION

Nous allons maintenant essayer de situer nos résultats dans le contexte des acquis de la littérature et de dégager les perspectives de recherches qui permettront d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de bourgeonnement des tissus cultivés *in vitro*.

Nous avons pour nos expériences utilisé les tissus de *Cichorium intybus* qui produisent naturellement des bourgeons en culture *in vitro*. Pour étudier les modifications biochimiques qui accompagnent le bourgeonnement nous pouvions ou l'inhiber ou au contraire le favoriser et comparer les résultats à ceux obtenus dans des conditions prises pour référence. En effet, il est généralement admis que le fait de cultiver *in vitro* des tissus, supprime les corrélations qui existent entre organes et conduit à une simplification qui facilite l'approche des problèmes physiologiques puisque les influences sont réduites. Cependant si par la technique de culture *in vitro* on affranchit les tissus prélevés de l'ensemble des corrélations auxquelles ils étaient soumis dans la plante entière, cela n'exclut pas l'influence éventuelle de certains métabolites présents dans les tissus avant leur mise en culture. De plus, la culture des tissus nécessite leur prélèvement, donc leur blessure, dont les effets sur le métabolisme sont nombreux (PARISH, 1968 ; BIRECKA et Coll., 1973; HAARD et MARSHALL, 1976 ; BIRECKA et GARRAWAY, 1978). Ceci laisse supposer qu'un tissu blessé réagira différemment. Enfin, l'environnement chimique, physique et biologique des tissus est complètement bouleversé afin d'orienter l'organogénèse et, la comparaison avec ce qui se passe réellement dans la plante entière risque d'être délicate, d'autant plus que les potentialités organogénétiques d'un tissu ne s'expriment que si l'on supprime les influences corrélatives de son environnement tissulaire (STEWART et Coll., 1958).

S'il est en principe possible de régénérer une plante entière à partir d'une cellule isolée, ceci implique que la cellule (ou le protoplaste) doit d'abord se diviser et former un cal à partir duquel les phénomènes d'organogénèse pourront se manifester. En se divisant, la cellule crée de nouvelles corrélations qui conduiront à une réorientation du programme, réorientation largement influencée d'ailleurs par la composition du milieu de culture, dont le contenu hormonal induira la production d'un type

d'organe, bourgeon végétatif, bouton floral ou racine. mais, s'agit-il d'un simple équilibre hormonal comme le laissent supposer les résultats de SKOOG et MILLER (1957) ? L'hormone exogène ne serait alors qu'un complément de l'hormone endogène. Ou alors, s'agit-il d'une modification plus profonde du métabolisme par les apports exogènes entraînant une chaîne de réactions et nous pensons par exemple à l'influence de l'éthylène sur la phénylalanine ammonialyase (ROBERTS et MILLER, 1982 ; KEVERS et Coll. 1985) qui elle-même interviendra sur la synthèse des composés phénoliques qui, selon leur nature, agiront sur l'activité de l'auxine-oxydase capable de modifier le taux en auxine endogène. Ce qui revient à dire qu'il n'existe pas de substances morphogènes spécifiques et que ce sont les interactions entre divers facteurs de croissance, pas forcément hormonaux, qui régulent la morphogénèse.

Nous ne disposons encore actuellement que de très peu de modèles, celui de TRAN THANH VAN et TRINH (1978) qui fait appel aux couches superficielles d'entre-noeud de Tabac et celui de VASSEUR et Coll. (1986) à partir de petits fragments racinaires d'Endive, permettant d'orienter les programmes organogénétiques. Les marqueurs biochimiques de l'organogénèse sont d'ailleurs peu nombreux (GASPAR et Coll., 1977 ; THORPE et Coll., 1978 ; KEVERS et Coll., 1981). Ceci peut s'expliquer par l'orientation des travaux vers l'amélioration de la production des bourgeons pour la multiplication végétative, sans tenir compte du déterminisme du bourgeonnement. C'est pourquoi on emploie souvent le terme de différenciation pour traduire une réorientation du métabolisme.

La différenciation à partir de la cellule oeuf serait liée à la polarité résultant des gradients hormonaux et nutritionnels qui s'établissent dans l'embryon (WARDLAW, 1968).

Cette polarité existe aussi en culture *in vitro* et la régénération d'organes à partir de fragments de racines en est un exemple, les bourgeons se forment du côté apical et les racines du côté basal indépendamment de l'orientation lors de la mise en culture (GAUTHERET, 1959).

Par conséquent, si un tissu est capable de former des organes, il le fera de manière polarisée par suite des gradients existants et des nouvelles corrélations qui s'établiront.

Dans le bourgeon étioilé d'Endive, avant la mise en culture, nous avons démontré la présence de tels gradients et établi qu'il existe une relation entre la capacité organogène et la répartition des peroxydases. Ce sont les tissus qui ont la plus grande activité peroxydasique (ou auxine-oxydasique) qui sont les plus aptes à bourgeonner. Nous avons donc choisi de prélever les explantats dans la région médiane de la feuille moyenne et de rechercher quelles sont les conditions physiques ou chimiques qui permettent d'optimiser ou de réduire le bourgeonnement, tout en évitant le bouleversement complet du métabolisme par des modifications importantes de la composition des milieux de culture. Les composés chimiques utilisés ont souvent été choisis en fonction de leur possibilité d'intervention sur les enzymes du catabolisme auxinique.

INFLUENCE DES FACTEURS PHYSIQUES

Si depuis longtemps on sait que les facteurs physiques jouent un rôle important sur le développement, et si leurs effets sur la prolifération des tissus cultivés *in vitro* ont été analysés (HILDEBRANDT et Coll., 1945 ; de CAPITE, 1955 ; GAUTHERET, 1959 ; DUBOIS, 1980), relativement peu de chercheurs se sont intéressés à leur action sur les phénomènes d'organogenèse. La pratique générale est de maintenir les cultures dans un environnement à photopériode et température constantes ce qui exclut les fluctuations diurnes et saisonnières auxquelles sont soumises normalement les plantes entières.

LA TEMPERATURE

Pour les tissus de feuille étioilée d'Endive, la température constante la plus favorable au bourgeonnement se situe aux environs de 25° C. C'est celle la plus souvent utilisée, mais son efficacité n'est pas universelle. En effet, SKOOG (1944) montre que la formation des pousses feuillées à partir des cals de Tabac est plus importante à 18° C, les températures extrêmes, 12 et 30° C, inhibant la formation des organes. FONNESBECH (1974 a et b) indique qu'une température constante comprise

entre 18 et 21° C est favorable au développement des plantules issues de pétioles de *Begonia cheimantha*.

Pour tenter de recréer l'environnement naturel des essais d'alternance de températures diurnes et nocturnes ont été réalisés. Pour KEFFORD et CASO (1972), la formation de bourgeons sur des racines de *Chondrilla juncea* est maximale pour des alternances diurnes et nocturnes respectivement comprises entre 21-27° C et 16-22° C, ils observent toutefois le même rendement avec une température constante de 25° C. SEABROOK et CUMMING (1982) aboutissent aux mêmes conclusions, les différents régimes de températures ne sont pas plus efficaces qu'une température constante de 25° C sur la néoformation de bourgeons par des tissus de Narcissus. Par conséquent, pour les tissus cultivés *in vitro* l'alternance de températures diurnes et nocturnes n'est que rarement favorable à l'organogénèse. Néanmoins, à partir de tissus de Topinambour, GAUTHERET (1969) a émis l'hypothèse que les températures élevées sont favorables à la formation des cambiums et que les températures nocturnes basses interviennent au cours de la transformation des cambiums en primordiums racinaires.

L'influence de la température sur les modifications des peroxydases a également été étudiée. Les résultats à partir de plantes entières ou d'explantats cultivés *in vitro* sont très différents.

Si l'analyse des peroxydases est faite à partir d'organes prélevés sur des plantes entières, les températures basses provoquent l'augmentation de l'activité peroxydasique et l'apparition de nouvelles isoperoxydases. C'est le cas pour la Luzerne (GERLOFF et Coll., 1967), le Blé (ROBERTS, 1969), le Dianthus (Mc COWN et Coll., 1969 a), le Sedum acre, le *Salix fragilis* mais pas pour le *Cornus stolonifera* (Mc COWN et Coll., 1969 b). Toutes ces expériences concernent les modifications intervenant au cours de l'accoutumance au froid et sont en relation avec la capacité d'adaptation des plantes aux conditions hivernales.

Au contraire, lorsqu'il s'agit de tissus isolés, cultivés *in vitro*, plus la température est élevée, plus l'activité peroxydasique est forte. Elle n'est, par exemple, pas modifiée à 4° C alors qu'elle augmente considérablement à 28° C dans les fragments de tubercule de Topinambour (BASTIN et DIJKMANS, 1970). Les électrophorèses d'extraits de cals de *Dianthus* sp Wyoming permettent de révéler un nombre plus important d'isoenzymes à 25° C qu'à 5° C (Mc COWN et Coll., 1970). Un cas particulier

est néanmoins signalé par DE JONG et ses collaborateurs (1968), celui des cellules isolées de Tabac dont l'activité peroxydasique est plus forte à 13 et 25° C qu'à 35° C. Mais il s'agit d'analyses portant sur des cellules ayant subi plusieurs passages aux températures étudiées, peut être accoutumées, ce qui rejoindrait le phénomène adaptatif signalé plus haut pour les plantes entières.

L'activité peroxydasique des tissus de feuille étiolée d'Endive, après cinq jours de culture, est d'autant plus forte que la température est plus élevée. Ceci résulte de l'activation du métabolisme général par l'augmentation de température et ne peut être reliée aux événements organogènes. Il faut donc se référer aux étapes morphologiques pour comparer les effets de températures variables. Dans ce cas, la cinétique d'activité peroxydasique, quelle que soit la température utilisée, à condition qu'elle permette l'organogénèse, se traduit par une augmentation suivie d'un palier précédant l'apparition des bourgeons. Les peroxydases en modifiant et rendant ainsi favorable le rapport auxines/cytokinines, agiraient sur l'initiation des méristèmes caulinares, le palier, signe d'un ralentissement du catabolisme auxinique, permettrait le développement des bourgeons.

Cette diminution du taux d'auxine endogène lors de la néoformation de bourgeons par des explantats racinaires de *Cichorium intybus* a été signalée par CAMUS (1949), WARMKE et WARMKE (1950), et VARDJAN et NITSCH (1961). Ces derniers signalent une remontée du taux en auxine entre le neuvième et le douzième jour dans la zone apicale de l'explantat, zone d'où émergeront les bourgeons.

Si l'augmentation de l'activité peroxydasique n'est pas ralentie, c'est le cas à 35° C, l'organogénèse est perturbée.

L'ECLAIREMENT

Les effets de la lumière se manifestent par la durée journalière de l'éclairement (photopériode), l'intensité de l'éclairement et enfin la qualité de la lumière.

L'allongement de l'héméropériode n'affecte guère le bourgeonnement des turions d'Asperge (HASEGAWA et Coll., 1973) ou des feuilles de Bégonia (HEIDE, 1964) alors qu'il est légèrement augmenté pour les tissus de racine de *Cichorium intybus* (BOURIQUET, 1966).

L'alternance jour-nuit ne favorise pas toujours l'organogénèse ; nous avons vu que le nombre de bourgeons formés par les tissus de feuille étiolée d'Endive est plus important en lumière continue.

L'évolution des activités peroxydasiques est peu différente à la lumière continue et en éclairnement photopériodique, et nous avons montré que l'activité peroxydasique varie différemment pendant les premières heures de nuit ou de jour. Nous avons donc abandonné cette condition photopériodique pour la suite de nos expériences, d'autant plus que si, dans la nature, les plantes nécessitent pour leur développement des périodes d'exposition journalières à la lumière, en culture *in vitro*, ces périodes ne semblent pas nécessaires (MURASHIGE, 1974).

Les tissus de feuille étiolée d'Endive maintenus continuellement à l'obscurité sont capables de bourgeonner, et, comme pour l'Orme (GAUTHERET, 1942 a), les racines de *Cichorium intybus* (GAUTHERET, 1942 b), les colonies tumorales d'hybrides de Tabac (SKOOG, 1944) et le Nautilocalys (VENVERLOO, 1976) la lumière n'est pas indispensable à la formation des bourgeons alors qu'elle l'est pour le Chou-fleur (MARGARA, 1969).

L'activité peroxydasique et la production de bourgeons par des fragments de feuille étiolée d'Endive cultivés à la lumière continue sont respectivement plus faible et plus importante que celles d'explantats maintenus constamment à l'obscurité. Il semble donc que les tissus qui ont la plus faible activité peroxydasique produisent le plus de bourgeons et que la lumière favorise le bourgeonnement.

Cette première constatation se trouve contredite par nos résultats, plus originaux, relatifs à l'influence de périodes d'éclairnement ou d'obscurité de durées variables, ou encore ceux concernant l'application de soixante-douze heures de lumière ou d'obscurité à des tissus cultivés respectivement à l'obscurité ou à la lumière. En effet le nombre de bourgeons néoformés dépend de la nature du traitement (lumière ou obscurité) et de sa durée.

- Pour les tissus constamment cultivés à l'obscurité, le bourgeonnement est faible, il est encore diminué si les tissus sont éclairés pendant les trois premiers jours, ou du troisième au sixième jour. Corrélativement, l'activité peroxydasique est affaiblie par les séjours à la lumière.

Donc la lumière est inhibitrice du bourgeonnement et la baisse d'activité peroxydasique peut expliquer la diminution du nombre des bourgeons produits.

- Inversement, trois jours d'obscurité, appliqués au début de la culture ou entre le troisième et le sixième jour, provoquent une augmentation du nombre de bourgeons par rapport à celui produit par des tissus toujours éclairés. On constate que l'activité peroxydasique des tissus privés temporairement de lumière est plus importante que celle des tissus continuellement éclairés.

Donc l'obscurité est stimulatrice du bourgeonnement et l'augmentation de l'activité peroxydasique explique le bourgeonnement plus intensif.

Nous essaierons d'interpréter nos résultats apparemment contradictoires, lorsque nous aborderons la discussion sur les composés phénoliques. nous pouvons retenir que lorsque l'activité peroxydasique est stimulée (obscurité) au cours des six premiers jours de culture le nombre de bourgeons est plus important, inversement une baisse de cette activité (lumière) en début de culture entraîne une diminution du bourgeonnement.

Si les conditions d'éclairement modifient nettement l'activité peroxydasique, leurs effets sont comparables sur les peroxydases solubles et les peroxydases liées ioniquement ; elles n'interviennent donc pas sur la compartimentation des peroxydases ni d'ailleurs sur la composition isoperoxydasique des tissus de feuille étiolée d'Endive. Ces résultats confirment donc que la lumière n'a que peu d'effets sur l'hétérogénéité moléculaire des peroxydases (Mc COWN et Coll., 1970 ; LEU et Coll., 1975 ; SINGH et SINGH, 1975).

Nous avons constaté, dans les 24 heures, qui suivent le traumatisme provoqué par le prélèvement des explantats, quedes nouvelles peroxydases solubles ou liées ioniquement apparaissent à la cathode, mais que simultanément du côté anodique une isoperoxydase de la fraction

ionique disparaît, ainsi que les trois isoperoxydases acides de la fraction covalente. La disparition de ces peroxydases pourrait s'expliquer par leur libération dans le milieu de culture sous forme d'exoenzymes comme l'ont déjà montré certains auteurs (STRAUSS et CAMPBELL, 1963 ; RITZERT et TURIN, 1970 ; LEGRAND et DUBOIS, 1977 ; MADER et WALTER, 1986).

Après 24 heures de culture et quelles que soient les conditions d'éclairage, l'équipement isoperoxydasique est fixé et aucune isoenzyme ne peut servir de marqueur des différentes étapes successives d'activation, de mitoses, de prolifération cellulaire ou de formation des méristèmes caulinaires, conduisant à l'organogénèse.

L'activité peroxydasique des cals est plus importante que celle des tissus primaires, un gradient existe donc dans l'explantat et c'est d'ailleurs généralement sur les cals que naissent les bourgeons. Le gradient expliquerait alors la polarité du bourgeonnement des explantats.

Les tissus de feuille d'Endive sont peu sensibles à l'intensité de l'éclairage, des intensités lumineuses, comprises entre 500 et 3 500 lux ont les mêmes effets sur les capacités néoformatrices des explantats. Ce manque de sensibilité a été signalé par DUBOIS (1973) pour la prolifération des tissus de Carotte et par APPELGREEN et HEIDE (1972) pour le bourgeonnement de feuilles de *Streptocarpus*. Dans le cas présent il peut s'expliquer par le fait que les tissus de feuille étiolée, dépourvus de chlorophylle, sont incapables de réaliser la photosynthèse et utilisent les sucres fournis par le milieu de culture.

Très peu de résultats ont été publiés sur les effets de la qualité de la lumière sur le bourgeonnement et sur les peroxydases.

La lumière bleue serait responsable de l'organogénèse des cultures de moelle de Tabac, car en lumière rouge claire ou rouge sombre, il ne se forme pas de bourgeons (WEISS et JAFE, 1969). De même, d'après SEIBERT (1973) la lumière bleue est plus efficace que la lumière jaune ou rouge dans la production de pousses feuillées par des cals de Tabac. Les tissus étiolés de feuille d'Endive seraient donc un cas particulier car seule la lumière verte agit à la fois sur la prolifération et sur le bourgeonnement. D'après les résultats de SEIBERT et Coll. (1975), à la fois l'intensité et la longueur d'onde, sont des paramètres importants pour comprendre la photomorphogénèse en culture des tissus. Une même radiation sera stimulatrice ou inhibitrice selon un degré de saturation.

Selon BJORN (1967) l'activité peroxydasique des racines de Blé est plus faible en lumière bleue et plus forte en lumière rouge qu'à l'obscurité. Dans les feuilles de Tomate, (BENEDICT, 1971), l'activité peroxydasique est plus importante en lumière verte (550 nm). Les analyses que nous avons réalisées aboutissent aux même résultats, mais les matériels utilisés sont trop différents et les informations trop peu nombreuses pour permettre de généraliser le rôle de la qualité de la lumière sur les peroxydases.

De nouveaux arguments quant à l'existence d'une relation entre le niveau d'activité peroxydasique au tout début de la culture, et l'intensité du bourgeonnement, nous sont apportés par les expériences en lumière approximativement monochromatiques.

- L'activité peroxydasique des tissus est plus forte en lumière verte et rouge et plus faible en lumière bleue qu'en lumière blanche.

- Corrélativement, le nombre de bourgeons produits est plus important par ordre décroissant en lumière verte, rouge, blanche et enfin bleue.

- A une activité peroxydasique importante en début de culture correspond un bourgeonnement plus intensif.

Si nous comparons les résultats ci-dessus à ceux obtenus pour des tissus cultivés à l'obscurité, ces derniers après six jours de culture ont la même activité peroxydasique que celle des tissus soumis aux radiations rouges et pourtant ils produisent nettement moins de bourgeons. Cela montre que pour comparer nos résultats nous devons nous référer à la lumière polychromatique et non à l'obscurité. En effet, par définition la lumière blanche ou polychromatique englobe les différentes radiations, le fait de les sélectionner par des filtres conduit à en appliquer une "dose" plus ou moins "grande". Les modifications portent donc sur la lumière et non sur l'obscurité.

INFLUENCE DES FACTEURS CHIMIQUES

Dans la plupart de nos expériences, les facteurs chimiques ont le plus souvent été choisis pour leur intervention possible sur les peroxydases, le fer parce qu'il entre dans la composition de l'hème, l'acide delta-aminolevulinique car il est le précurseur des porphyrines, l'éthylène et la kinétine pour leur rôle sur les peroxydases (GASPAR et Coll., 1982), sur la synthèse des chlorophylles (LEFEBVRE, 1973) et sur le bourgeonnement (BOURIQUET, 1972 ; VASSEUR, 1979 ; VAN AARTRIJK, 1985).

L'emploi de chélateur pour éviter la précipitation des sels de fer dans les milieux de culture est souvent fait empiriquement. Les chélateurs diminuent l'activité peroxydasique des tissus de Topinambour (BASTIN et DIJKMANS, 1970), de Pois (DEROK et VAUGHAN, 1973) et nous avons vu que la dose préconisée pour leur solution nutritive par MURASIGE et SKOOG freine l'activité peroxydasique et inhibe le bourgeonnement des tissus de feuille étiolée d'Endive.

D'après SHIBATA et OCHIAI (1976 et 1977) l'EDTA agirait non pas sur la synthèse des peroxydases mais sur l'activité de l'ALA-déshydratase, enzyme impliquée dans la synthèse des porphyrines.

La présence d'EDTA dans les milieux de culture diminue donc l'activité peroxydasique et le bourgeonnement. KLEIN et MANOS (1960) trouvent que l'inhibition de croissance des tissus de *Daucus carota* par l'EDTA peut être levée par des apports de fer. Ceci se révèle en partie exact quant à la capacité de bourgeonnement des tissus de feuille étiolée, puisque les fortes concentrations d'EDTA, même en présence de fer restent inhibitrices.

L'action stimulatrice spectaculaire du fer sur le bourgeonnement n'a à notre connaissance jamais été signalée.

Selon SOMERS et SCHIVE (1942) la disponibilité physiologique du fer dans les plantes ne dépend pas du niveau absolu de fer mais plutôt d'une proportion relative d'autres ions, le Mn^{++} par exemple. Cette interaction entre le fer et les autres éléments a permis à WALLACE (1957) d'annoncer d'une part qu'en fonction de sa concentration le fer augmente l'activité peroxydasique et que d'autre part il est capable de contrebalancer l'effet toxique de certains ions sur les peroxydases. Cette stimulation des peroxydases par le fer a également été signalée par EVANS

(1959) ; DEKOK et Coll., (1960) et AGAWARLA et Coll., (1972), et est confirmée par nos résultats.

Chez le Pois, étioilé ou chlorophyllien, le Fe^{++} est plus facilement absorbé que le Fe^{+++} (BAKARDJIEVA et DEMIRESKA, 1973 et 1975), ceci s'accorde bien avec le fait que l'activité peroxydasique des tissus de feuille étioilée d'Endive est plus importante en présence de $FeSO_4$. Cette forme réduite serait donc plus active. On notera toutefois que s'il existe une proportionalité entre la teneur en fer et l'activité peroxydasique quand les tissus sont cultivés à l'obscurité, un effet limitant de la plus forte concentration utilisée est constaté en éclaircissement continu. Les feuilles des bourgeons naissant à la lumière, sont chlorophylliennes, une partie du fer serait donc mobilisée pour la synthèse des chlorophylles (MARSH et Coll., 1963 a et b).

Si le fer chélaté est généralement plus efficace sur la production de bourgeons par les tissus éclairés, il peut paraître curieux que cette efficacité soit moins évidente quand les tissus sont maintenus à l'obscurité. Pour expliquer cette différence on en est réduit à des hypothèses :

- ou bien les tissus excrètent une substance (HELLER (1959) permettant le maintien du fer non chélaté sous une forme assimilable,

- ou bien du fait de la synthèse chlorophyllienne à la lumière les tissus utilisent d'avantage de fer et par conséquent l'absorbent plus rapidement ce qui nécessite la présence du chélateur, pour faciliter l'utilisation du fer.

La présence du fer n'est pas nécessaire pendant toute la durée de la culture, car des apports de fer de courte durée, en début de culture, ont les mêmes effets sur l'activité peroxydasique, le bourgeonnement et la teneur en chlorophylle des feuilles.

Appliqué seulement pendant trois jours, le fer augmente l'activité peroxydasique des tissus, cette augmentation d'activité en début de culture se traduira par un nombre de bourgeons néoformés beaucoup plus important. Il y aurait donc induction du bourgeonnement par le fer, mais son rôle exact reste à déterminer, peut-être intervient-il par son action précoce sur l'activité peroxydasique.

Le rôle du fer dans la synthèse des pigments chlorophylliens a été souvent évoqué et l'abondance de la littérature concernant ce sujet laisse place à des hypothèses diverses. Notre propos n'est pas ici de faire l'inventaire de toutes les connaissances actuelles, mais d'insister sur certains aspects particuliers. Si la présence de fer, pendant 40 jours dans les milieux de culture, provoque l'apparition de bourgeons dont les feuilles sont très chlorophylliennes, nous nous expliquons plus difficilement que la même teneur en chlorophylle soit retrouvée dans des feuilles issues d'explantats dont le traitement par le fer a été interrompu après 9 jours, donc avant l'apparition des bourgeons. Il faudrait admettre que le fer a été emmagasiné par les tissus par exemple sous forme de phytoferritine (BAYER, 1956 ; HYDE et Coll., 1963) qui sont par excellence des protéines d'accumulation du fer, ces composés pouvant retenir jusqu'à 4 000 atomes de fer par molécule (HARRISON, 1964 ; SCHUBBERT, 1964).

Le fer agit donc à la fois sur les peroxydases avant la néoformation des bourgeons et sur la teneur en chlorophylle des feuilles des bourgeons néoformés. Les voies de synthèse de ces deux composés empruntent un large tronc commun dont le premier intermédiaire est l'acide delta-aminolevulinique (ALA). C'est un enzyme l'ALA-synthétase qui catalyse la formation du ALA à partir du succinyl CoA et du glycolle. La présence de cette enzyme a été démontrée chez les bactéries (KIRUCHI et Coll., 1958) et dans les tissus animaux (GIBSON et Coll., 1958) mais son extraction et sa purification n'ont pas encore été réalisées à partir de tissus végétaux chlorophylliens;

Quand les milieux de culture ne contiennent pas de fer, l'ALA augmente considérablement l'activité peroxydasique et diminue le bourgeonnement et la teneur en chlorophylle des feuilles. Lorsque le ALA et le fer sont associés, l'activité peroxydasique est légèrement plus faible et la teneur en chlorophylle très importante. L'idée du rôle limitant de l'ALA dans la synthèse des chlorophylles ne se vérifie donc pas en absence de fer, par contre les augmentations importantes d'activité peroxydasique témoignent du rôle de l'ALA dans la synthèse des protoporphyrines. Cette augmentation d'activité peroxydasique n'est plus corrélative d'une stimulation du bourgeonnement. Nous avons vu que l'ALA inhibait la callogénèse ce qui pourrait expliquer l'action inhibitrice de ce composé sur le bourgeonnement. De plus les affirmations de ELLIS et GREENWALD (1985) qui considèrent que l'ALA n'est pas impliqué directement dans la

synthèse des porphyrines, mais serait une source azotée possible, sont troublantes et remettent en cause le rôle spécifique de cette molécule.

Dans la voie de synthèse des porphyrines, une autre enzyme intervient, la delta-aminolévulinique acide deshydratase (ALAD). Elle catalyse la synthèse du pyrrole porphobilinogène qui est ensuite utilisé pour la formation des porphyrines de l'hème, des chlorophylles et d'autres composés à noyau tetrapyrrolique. Cette enzyme a été étudiée dans une large variété de systèmes chez les animaux, les végétaux et les bactéries. On sait que l'activité ALAD des plantes augmente pendant le développement des chloroplastes, période pendant laquelle les chlorophylles s'accumulent quand des plantes étiolées sont éclairées (SHIBATA et OSHIAI, 1977). L'action de cette enzyme peut être bloquée par l'utilisation d'un inhibiteur compétitif, l'acide lévulinique (LA) (BEALE, 1970, 1971, 1978 ; BEALE et CASTELFRANCO, 1974 ; VAN HUUSTEE, 1977). En ajoutant ce composé à nos milieux de culture nous pouvions nous attendre à une diminution de l'activité peroxydasique des tissus de feuille étiolée d'Endive, ce qui n'est pas le cas. En présence de LA on constate une diminution progressive de l'activité peroxydasique quand les doses augmentent ; mais, les valeurs d'activité trouvées sont beaucoup plus importantes que celles mesurées quand le milieu de culture ne contient pas de LA. Ce qui peut s'expliquer par une sensibilité différente entre les ALAD suivant leur compartimentation cellulaire. Les ALAD chloroplastiques sont plus sensibles au LA que les ALAD cytoplasmiques et d'autre part le LA exogène se fixerait dans les chloroplastes (BEALE, 1971). Dans l'Endive le LA provoquerait donc l'inhibition de l'ALAD chloroplastique, du ALA s'accumulerait donc dans les plastes et une partie diffuserait dans le cytoplasme où il agirait comme le ALA exogène pour stimuler la formation des peroxydase.

Sur les tissus de racine *Cichorium intybus*, l'éthylène agit en augmentant considérablement l'activité peroxydasique et une action similaire a été trouvée chez la Patate douce (STAHMANN et Coll., 1966 ; MATSUNO et URITANI, 1972), le Thé (SAIJO et TAKEO, 1974), le Haricot (POOVIAH et RASMUSSEN, 1973), le Coton (MORGAN et FOWLER, 1972) et le Saint-Paulia (WARFIELD et Coll., 1975). Il n'y aurait pas un caractère inductif de l'augmentation de l'activité peroxydasique puisqu'elle nécessite la présence constante du gaz pour se manifester (BIRECKA et Coll., 1973) et ce ne sont pas forcément les plus fortes doses qui donnent l'activité maximale (ATTO et NODI, 1969).

Cette augmentation de l'activité peroxydasique s'accompagne d'une stimulation des capacités néoformatrices de bourgeons par les tissus de *Cichorium intybus*. CORNEJO-MARTIN et Coll. (1979) trouvent que l'éthylène exogène favorise la formation de bourgeons par les cals de Riz. Les mêmes effets sont démontrés par Van AARTRIJK et Coll. (1984) sur des écaille de *Lilium speciosum*. Enfin, HUXTER et Coll. (1981), à partir de Tabac soulignent que la sensibilité des tissus dépend du moment d'application de l'éthylène. En début de culture les tissus ne réagissent pas, puis lorsque les premières divisions cellulaires interviennent l'apport d'éthylène favoriserait la formation des bourgeons.

Ce rôle favorable de l'éthylène n'est pas confirmé quand on le fait agir sur les tissus de feuille étiolée d'Endive, pour lesquels il ne modifie pas le bourgeonnement et ne stimule pas, en début de culture, l'activité peroxydasique. Cette dernière observation est en accord avec les travaux de STAHRMAN et Coll. (1966) sur la Pomme de terre et la Carotte et ceux de BIRECKA et Coll. (1973) et BIRECKA et MILLER (1974) sur la moelle de Tabac.

Les modifications obtenues seraient alors spécifiques du matériel, il n'y aurait pas de différence dans le mode d'action de l'éthylène, mais la présence ou l'absence d'isoperoxydases sensibles au gaz. Celui-ci provoquerait la synthèse "de novo" de peroxydases (MORGAN et FOWLEA, 1972 ; POOVAIAH et RASMUSSEN, 1973 ; SAJO et TAKEAO, 1974) et l'apparition de l'isoperoxydase C₃ dans les extraits de racine de *Cichorium intybus* en serait une confirmation ; ou bien, l'éthylène agirait sur l'activité des peroxydases constitutives (ADAMS et GALSTON, 1974 ; WARFIELD et Coll., 1975) comme nous l'avons vu pour les tissus de feuille étiolée d'Endive où, pour des activités peroxydasiques identiques, l'éthylène modifie l'activité de certaines isoperoxydases.

L'action des régulateurs de croissance sur l'activité peroxydasique ne se limite pas à celle de l'éthylène, elle a été au contraire largement analysée. En général, l'apport de kinétine provoque l'augmentation de l'activité peroxydasique (GASPAR et XHAUFFLAIRE, 1967 et 1968 ; LEE, 1972 et 1974 ; HRAAILIKS, 1976) liée à un accroissement de la synthèse protéique (MAAB et KLAMBT, 1977).

Au contraire, l'AIA ou les composés auxinominétiques auraient tendance à diminuer cette activité (OCKERSE et Coll., 1966 ; WHITMORE, 1971 ; BIRECKA et MILLER, 1974) en empêchant la synthèse

d'isoperoxydases (OCKERSE et Coll., 1966 ; LESHEM et GALSTON, 1971); il peut même y avoir formation d'isoenzymes en présence d'AIA mais elles seraient complètement excrétées sous forme d'exoenzymes (RITZERT et TURIN, 1970 ; LEGRAND et DUBOIS, 1978).

D'après GASPAR et Coll., (1973) et DARIMONT (1977) il y aurait action similaire de la kinétine et de l'auxine si les tissus sont isolés de la plante et l'activité peroxydasique globale serait augmentée, ce que nous retrouvons avec les tissus étiolee d'Endive, mais les effets de deux régulateurs de croissance seraient inverse sur les deux peroxydases les plus cathodiques (C₇ et C₈ des tissus de Lentille). Ceci infirme donc les travaux de GARDINER et CLELAND (1973) montrant que les changements du profil isoperoxydasique sont indépendants du traitement hormonal mais qu'ils dépendent de l'isolement des tissus.

DUBUCQ (1976) montre que l'activité peroxydasique globale diminue avec le temps quand les milieux contiennent de la kinétine alors qu'elle augmente en présence d'AIA, ceci s'accorde bien avec nos résultats.

Il faut enfin signaler que, malgré les modifications importantes d'activité peroxydasique, aucune modification significative n'a été constatée sur les profils isoperoxydasiques d'extraits de feuille étiolee d'Endive.

La kinétine favorise le bourgeonnement des tissus de feuille d'Endive (VASSEUR, 1979) et nous venons de voir qu'elle augmente l'activité peroxydasique de ces tissus. Nous avons constaté également que lorsque le fer et la kinétine sont associés ils ont un effet synergique sur le bourgeonnement. Dans les gammes de concentrations que nous avons utilisées, ces substances employées individuellement stimulent toujours le bourgeonnement, mais associées, elles deviennent, aux plus fortes doses, inhibitrices. KHANAM et MATTHEW (1970) ont montré que la kinétine a une influence sur l'absorption et le transport du fer. L'effet toxique que nous constatons serait donc dû à une trop grande absorption de fer.

L'acide indolyl-acétique inhibe le bourgeonnement des tissus de feuille d'Endive (VASSEUR, 1979). les apports de fer contrairement à ceux de kinétine ne lèvent pas cette inhibition. On peut donc penser que l'augmentation de l'activité des peroxydases, par le fer et la kinétine, permet à ces dernières d'abaisser suffisamment la teneur en auxine endogène pour que l'équilibre auxine-cytokinine dans les tissus devienne

favorable au bourgeonnement, alors que, l'augmentation de l'activité peroxydasique provoquée par le fer n'est pas suffisante, quand on ajoute de l'auxine au milieu de culture, pour établir un tel équilibre susceptible de stimuler le bourgeonnement.

Si nous rapprochons l'ensemble de nos résultats des observations de COUILLEROT (1978), différentes étapes dans la formation des bourgeons peuvent être considérées :

- Une activation cellulaire liée au traumatisme et à la suppression des corrélations tissulaires. Elle se manifeste dès le premier jour de culture par une diminution de la teneur en protéines et l'activité peroxydasique est peu modifiée. Rappelons que certaines isoperoxydases apparaissent notamment des basiques, alors que les acides ne sont plus toutes décelables.

- Il y a ensuite prédominance nette des synthèses protéiques et apparition au troisième jour, des premières divisions cellulaires qui s'accélèrent pour former une masse de cellules "indifférenciées" et on constate que pendant cette période l'activité peroxydasique augmente de façon importante.

- Une étape d'organisation qui est caractérisée par l'apparition des premiers nodules méristématiques après six jours de culture. Ce processus d'organisation débute avec une deuxième vague de synthèses, ARN et protéines, (VASSEUR et LEGRAND, 1972), qui sont parfois moins importantes que celles constatées au cours de la première phase ; parallèlement l'activité peroxydasique s'amplifie légèrement.

L'évolution des peroxydases reflète donc assez fidèlement les modifications biologiques observées.

Nos résultats sont en accord avec ceux de RUCKER et RADOLA (1971) ; MADER (1975) ; THORPE et Coll. (1978) ; THORPE et GASPARD (1978) et NEGRUTIU et Coll. (1979) ; KEVERS et Coll. (1980). La néoformation est précédée par une augmentation de l'activité peroxydasique, qui atteint un plateau avant l'émergence des bourgeons, mais ceci n'est pas confirmé par Von ARNOLD et GRONROOS (1986).

Pour les tissus de feuille étiolée, une stimulation de l'activité peroxydasique, par un facteur physique ou chimique, durant les six

premiers jours culture, donc durant les étapes préparatoires au bourgeonnement, sera suivie d'une augmentation du nombre de bourgeons formés.

L'aspect précoce du traitement sur le conditionnement des capacités néoformatrices des tissus de feuille étiolée est donc un phénomène capital. Et, l'effet inducteur du fer, dont la présence n'est nécessaire que pendant les trois premiers jours pour se manifester, en est la preuve.

Tous ces faits militent donc en faveur d'une relation entre l'activité peroxydasique et le bourgeonnement.

① REGULATION DE L'ACTIVITE PEROXYDASIQUE PAR LES COMPOSES PHENOLIQUES

On a coutume de séparer les peroxydases en deux groupes : les acides et les basiques. Dans les tissus de feuille étiolée, le nombre d'isoperoxydases anodiques solubles ne varie pas au cours de la culture ; les isoperoxydases cathodiques apparaissent après 24 heures, mais passé de délai, le profil isoperoxydasique reste inchangé, quels que soit les stimuli modifiant l'activité peroxydasique globale. Il paraît alors délicat de considérer toutes ces peroxydases comme étant des molécules natives puisqu'elles peuvent exister dans les tissus foliaires et qu'elles ne s'expriment qu'à cause du prélèvement.

Les variations rapides d'activité peroxydasique que nous constatons ne résulteraient donc pas d'une synthèse "de novo" des peroxydases mais seraient liées à l'activation d'enzymes constitutives. Les modifications du métabolisme apportées par la suppression des corrélations entraînerait peut être le démasquage des peroxydases, il existerait donc des substances stimulatrices ou inhibitrices de l'activité peroxydasique.

Nous avons pu constater :

- Après 24 heures de culture *in vitro* il n'est plus possible de mesurer l'activité auxine-oxydasique d'extraits de tissus de feuille étiolée. Très rapidement donc dans les tissus sont présents des effecteurs

(PILET GASPARD, 1968) puissants de cette activité, et le rôle des composés phénoliques qui selon leur nature mono ou diphenolique seront respectivement activateur ou inhibiteur, a été largement démontré (RABIN et KELIN, 1957 ; GORDON et PALEG, 1961 ; HENDERSON et NITSCH, 1962 ; GASPARD, 1965 ; TOMASZEWSKI et THIMANN, 1966 ; LEE et Coll., 1982).

- L'analyse qualitative des composés phénoliques dans les tissus de feuille étiolée, sans avoir la prétention d'être exhaustive en fonction de la technique employée a montré que les phénols sont représentés essentiellement par des esters hydroxycinnamiques, identifiés comme étant l'acide caféique et l'acide chlorogénique, tous deux des diphenols.

- *In vitro* les acides caféique et chlorogénique jouent un rôle sur la vitesse d'oxydation du gaiacol par une peroxydase purifiée (HRP). Leur présence dans les tissus et a fortiori dans les extraits peut donc être à l'origine des variations d'activité peroxydasique que nous avons constatées.

Nos résultats quant à l'action *in vitro* des composés phénoliques sur l'activité de la HRP nous conduisent à penser que les composés phénoliques endogènes (acide caféique et acide chlorogénique) régulent en fait l'activité peroxydasique. Une argumentation en faveur de cette hypothèse nous est encore donnée par l'électrofocalisation qui a bien montré la liaison et la régulation de certaines isoperoxydases par des composés phénoliques naturels.

La synthèse des composés phénoliques des tissus cultivés en lumière continue augmente régulièrement ; celle des tissus cultivés à l'obscurité, nettement plus faible, cesse après trois jours. ENGELSMA et MEIJER (1965) et ZUCKER (1963) ont montré que la quantité de phénols synthétisés est fonction de la durée d'éclairement. A l'obscurité, il n'y aurait pas de synthèse phénolique et celle que nous observons dans les tissus de feuille étiolée serait le reliquat de l'induction provoquée par le temps d'exposition à la lumière lors de l'ensemencement des tissus.

Lorsqu'on éclaire des tissus préalablement maintenus à l'obscurité la synthèse phénolique est augmentée, inversement, quand on place à l'obscurité des tissus cultivés à la lumière la teneur en phénols diminue. Si l'on compare ces résultats à ceux qui traduisent les effets de la lumière sur l'activité peroxydasique des tissus, on constate une relation inverse :

- L'éclairement provoque une diminution de l'activité peroxydasique et une augmentation de la teneur en composés phénoliques.

- Un séjour à l'obscurité augmente l'activité peroxydasique et diminue la teneur en phénols.

Nous comprenons alors mieux pourquoi, lorsque nous faisons une relation entre l'activité peroxydasique et l'intensité du bourgeonnement les résultats semblaient contradictoires. Il apparait, ici, que les métabolismes et en particulier celui des phénols, sont différents à la lumière et à l'obscurité. Le contrôle du bourgeonnement par les peroxydases est lié à l'action des composés phénoliques sur ces dernières. L'aspect multifactoriel ou tout au moins bifactoriel, puisqu'il fait intervenir les phénols et les peroxydases, du contrôle du bourgeonnement se dégage donc.

Dans la cellule, les composés phénoliques sont généralement emmagasinés au niveau de la vacuole et les peroxydases sont présentes dans le cytoplasme et/ou au niveau du plasmalemme et des parois. Cette compartimentation peut donc intervenir directement en empêchant le contact entre substances susceptibles de réagir entre elles. Bien que cela soit une remarque justifiée, nos résultats concernant l'influence de lumières approximativement monochromatiques nous inclinent à penser que cette compartimentation n'est qu'un état final et que le contact entre peroxydases et composés phénoliques peut s'établir au cours de la synthèse de ces derniers ou pendant leur transport vers la vacuole. En effet c'est quand l'accumulation des phénols est la plus importante que l'activité peroxydasique est la plus diminuée.

On sait que la lumière contrôle, via le phytochrome (HUAULT et Coll., 1971 ; ACTON et SCHOPFER, 1975) l'activité de la phényl alanine ammonialyase, enzyme essentielle de la biosynthèse des composés phénoliques (CONN, 1964 et BOHN, 1965), et par là même le pool phénolique.

Sur les petits explantats racinaires, les fortes concentrations en glucose inhibent le bourgeonnement, nous avons pu voir qu'elles diminuent l'activité peroxydasique alors qu'elles augmentent la teneur en phénols des tissus. NEGRUTIU et Coll. (1979) ont déjà signalé que la baisse de la capacité de formation des bourgeons par des cals d'Arabidopsis

correspond à une perte graduelle de l'activité peroxydasique globale. La production des composés phénoliques par les tissus cultivés *in vitro* nécessite un apport assez considérable de carbone (SHAH et METHA, 1978 ; KUBEK et SHULER, 1979). L'inhibition de bourgeonnement par les fortes concentrations de sucre pourrait alors s'expliquer par l'augmentation de la synthèse phénolique, les composés formés intervenant sur les enzymes du catabolisme auxinique. Cette expérience est une confirmation de plus des relations qui existent entre peroxydases, phénols et bourgeonnement.

Toutes ces considérations amènent finalement à concevoir les modulations de la capacité du bourgeonnement comme le résultat d'une suite de variations métaboliques et d'activités enzymatiques;

- D'abord une modulation de la synthèse des polyphénols.

- Suivie d'une régulation des peroxydases présentes ; toute augmentation de la synthèse des composés phénoliques conduit à une diminution de l'activité peroxydasique, mesurée *in vitro*, et inversement, une diminution de l'accumulation des composés phénoliques provoque une stimulation d'activité enzymatique.

- Cette augmentation indirecte de l'activité peroxydasique conditionne automatiquement un catabolisme auxinique accentué, d'où un niveau auxinique endogène abaissé et par conséquent un rapport auxine-cytokinine favorable au bourgeonnement.

Comme toute approche *in vitro*, ces différentes interprétations doivent être nuancées, car au niveau intracellulaire un certain nombre de notions doivent être prises en considération. Ainsi les phénomènes de compartimentation en créant un microenvironnement particulier, interviennent directement en favorisant ou en empêchant, selon les cas, le contact entre substances pouvant réagir entre elles.

Cette approche du déterminisme du bourgeonnement conditionnée par la modulation tant physique que chimique des composés phénoliques internes est nouvelle à notre connaissance. Elle a pu être mise en évidence grâce à une étude conjointe non seulement des facteurs physiques et chimiques mais aussi de l'analyse parallèle des peroxydases et des phénols endogènes, ce qui n'avait jusqu'à présent jamais été entrepris.

Nous avons pour la première fois (LEGRAND, 1972) montré qu'il existe des inhibiteurs de l'activité peroxydasique, qu'ils sont de nature phénolique et, l'électrofocalisation permet de penser que les phénols interviendraient en se fixant sur le site actif de l'enzyme.

En fait, de nombreuses questions restent en suspens. *In vitro* l'action de l'acide chlorogénique est masquée par l'acide caféique, qu'advient-il dans les tissus ? Suivant le stimulus, la synthèse de l'un ou l'autre de ces composés est-elle favorisée ? Une meilleure connaissance de la nature des phénols synthétisés, de leur évolution en fonction des stimuli est donc nécessaire. L'amélioration des techniques et nous pensons à l'utilisation de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) nous permettra de cerner de plus près le problème.

Enfin, une meilleure compréhension des interactions entre le métabolisme de l'auxine et celui des phénols nécessiterait des précisions sur la localisation des diverses réactions impliquées.

La régulation de l'activité peroxydasique par les phénols restera une question ouverte tant que la localisation subcellulaire de ces deux types de substances et leurs connections possibles n'auront pas été élucidées.

BIBLIOGRAPHIE

- AARTRIJK Van J., et G.J. BLOM-BARNHOORN, 1984. - Adventitious bud formation from bulb scale explants of *Lilium speciosum* Thunb. *in vitro* Interacting effects of NAA, TIBA, wounding and temperature. J. Plant Physiol., 116, 409-416.
- AARTRIJK Van J., G.J. BLOM-BARNHOORN et J. BRUINSMA, 1985. - Adventitious bud formation from bulb scale explants of *Lilium speciosum* Thunb *in vitro* Effects of amino-ethoxy vinyl glycine, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ethylene. J. Plant Physiol., 117, 401-410.
- ABELES F.B. et G.R. LEATHER, 1971. - Abscission : control of cellulase secretion by ethylene. Planta, 97, 87-91.
- ACTON G. J. et P. SCHOPFER, 1975. - Control over activation or synthesis of phenylalanine ammonia-lyase by phytochrome in mustard (*Sinapsis alba* L.) ? A contribution to eliminate some misconceptions. Biochem. Biophys. Acta, 404, 231-242.
- ADAMS D.O. et S.F. YANG, 1979. Ethylene biosynthesis : identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. Princ. Nat. l Acad. Sci. USA, 76, 170-174.
- ADAMS W. R. et A.W. GALSTON, 1974. - Differential effects of ethylene on pith peroxidase of intact Tobacco plants and excised tissue. Plant Physiol., 53, 931-933.
- ADATTHODY K.K. et D. RACUSEN, 1967. - On the extraction of peroxidase isozymes from bean leaves. Can. J. Bot., 45, 2237-2242.
- AGARWALA S.C., C.P. SHARMA et A. KUMAR., 1964. - Interrelationship of iron and manganese supply in growth, chlorophyll and non porphyrin enzymes in Barley plants. Plant. Physiol., 39, 603-609.
- AGAZAWA T. et I. HARA-NISCHIMURA, 1985. - Topographic aspects of biosynthesis, extracellular secretion, and intracellular storage of proteins in plants cells. Annu. Rev. Plant. Physiol., 36, 441-472.
- ALIBERT G., R. RANJEVA et A.M. BOUDET, 1977. - Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. Physiol. Vég., 15, 279-301.

- APELBAUM A., S.Y. WANG, A.G. BURGOON, J.E. BAKER et M. LIEBERMAN, 1981. - Inhibition of the conversion of 1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid to ethylene by structural analog, inhibitors of electron transfer, incouplers of oxydative phosphorylation and free radical scavengers. *Plant . Physiol.*, 67, 74-79.
- APPELGREN M. et O. HEIDE, 1972. - Regeneration of *Streptocarpus* leaf discs and its regulation by temperature and growth substances. *Physiol. Plant.*, 27, 417-423.
- BACKOULA E., 1987. - Participation du métabolisme glucidique à l'orientation organogène de tissus de *Cichorium intybus* cultivés *in vitro*. Thèse 3ème cycle, Univ. Lille, 95 p.
- BACKOULA E., R. LEFEBVRE et J. VASSEUR, 1985. - Modalité d'action du glucose sur le bourgeonnement de petits explantats racinaires de *Cichorium intybus* L. cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 301, 3, 13, 639-642.
- BAKARDJIEVA N., et K. DEMIREVSKA-KEPOVA, 1973. - Effects of the higher content of calcium, copper and iron ions in young pea seedlings on the activity and isoenzyme of peroxidase and IAA oxidase. *Rev. Roum. Bioch.* 10, 263-273.
- BAKARDJIEVA N. et K. DEMIREVSKA-KEPOVA, 1975. - The manifestation of ion control on the isoenzyme component of peroxidase in etiolated pea plants. *Rev. Roum. Bioch.*, 12, 67-73.
- BAKER J.E., C.Y. WANG, M. LIEBERMAN et R. HARDENBURG, 1977. - Delay of senescence in carnation by rhizobitoxine analog and sodium benzoate. *Hort. Science*, 12, 38-39.
- BASTIN M. et H. DIJKMANS, 1970. - Oxidation processes in relation to the induction of enzymes in Jerusalem Artichoke tuber slices. *Can. J. Biochemistry*, 48, 316-321.
- BAYER E., 1956. Biologische und Chemische Wege zur Aureicherung von Spurenelementen. *Experimentia*, 12, 365-368.
- BEALE S., 1970. - The biosynthesis of delta-aminolevulinic acid in *Chlorella*. *Plant. Physiol.*, 45, 504-506.

- BEALE S., 1971. - Studies of the biosynthesis and metabolism of delta-aminolevulinic acid in *Chlorella*. *Plant. Physiol.*, 48, 316-319.
- BEALE S., 1978. Delta-aminolevulinic acid in plants : its biosynthesis regulation and role in plastid development. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 29, 95-120.
- BEALE S. et P. CASTELFRANCO, 1974. - The biosynthesis of delta-aminolevulinic acid in higher plants. I. Accumulation of delta-aminolevulinic acid in greening plant tissues. *Plant. Physiol.*, 53, 291-296.
- BEEVERS L., 1968. - Growth regulator control of senescence in leaf discs of nasturtium (*Tropaeolum majus*). Proceedings on the 6 th International conference on Plant growth substances Carleton University Ottawa, 1417-1435
- BENEDICT W., 1971. - Effect of intensity and quality of light on peroxidase activity associated with Septoria leaf spot of tomato. *Can. J. Bot.*, 49, 1721-1726.
- BESEMER J., 1968. - Der Einfluß von Wachstumsregulatoren auf Protein- und Enzym Spektren Kultiverter Explantate aus Rüben von *Cichorium intybus* L. *Planta*, 82, 211-222.
- BESEMER J., U. HARDEN et 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.
- 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. et J.P. NITSCH, 1968. - Effet du moment de l'application d'acide gibbérélique ou de 2,6-diaminopurine sur la néoformation des bourgeons chez *Begonia rex* Putz. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 267, 619-621.
- BIRECKA H., L. SHIH et GALSTON A., 1972. - Isoperoxidase patterns in tobacco pith and their alteration following tissue excision. *J. Exp. Bot.* 23, 655-666.

- BIRECKA H., A. BRIDER et J. CATALFAMO, 1973. - Comparative studies on tobacco pith and sweet potato root isoperoxidase in relation to injury, indoleacetic acid, and ethylene effects. *Plant. Physiol.*, 52, 43-49.
- BIRECKA H. et A. MILLER, 1974. - Cell wall and protoplast isoperoxidases in relation to injury, indoleacetic acid and ethylene effects. *Plant. Physiol.*, 53, 569-574.
- BIRECKA H., J. CATALFAMO et P. URBAN, 1976. - Cell isoperoxidases in sweet potato plants in relation to mechanical injury and ethylene. *Plant. Physiol.*, 57, 74-79.
- BIRECKA H. et M.O. GARRAWAY, 1978. Corn leaf isoperoxidase reaction to mechanical injury and infection with *Helminthosporium maydis* Effect of cycloheximide. *Plant. Physiol.*, 61 (4), 561-566.
- BJORN L.O., 1967. - Some effects of light on excised wheat roots with special reference to peroxide metabolism. *Physiol. Plant.*, 20, 149-170.
- BOHM B.A., 1965. Shikimic acid (3,4,5-trihydroxyl-cyclohexene-1-carboxylic acid). *Chem. Reviews*, 65, 435-466.
- BONNER W.D., 1957. - Soluble oxidases and their functions. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 8, 427-452.
- BOURIQUET R., 1966. - Action de la lumière sur le développement des tissus de feuilles d'endive cultivées *in vitro* Photochem. and Photobiol. 55, 391-395.
- BOURIQUET R., 1972. - Action de l'éthylène sur le bourgeonnement et la floraison *in vitro* de fragments de racines d'endive. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 275, 33-34.
- BOURIQUET R. et J. VASSEUR, 1966. - Sur la croissance et le bourgeonnement des tissus de feuilles d'endive cultivés *in vitro* Dans : "Les phytohormones et l'organogénèse", Congrès international, Université de Liège, 38, 381-38
- BOYER N. et G. DE JAEGER, 1986. - Direct or indirect role of peroxidase in ethylene biosynthesis. *Molecular and Physiological aspects of plant*

- peroxidases. Eds. H. GREPPIN, C. PENEL et Th. GASPAR. Université de Genève, 47-60.
- BROWN J. C. et W.E. JONES, 1962. - Absorption of Fe, Mn, Zn, Ca, Rb and phosphate ions by soybean roots that differ in their reductive capacity. *Soil. Sci.*, 94, 173-179.
- BRUINSMA J., 1963. - The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plants extracts. *Photochem. and Photobiol.*, 2, 241-249. Pergamon Press Ltd (G.B.)
- BRUNEL A., 1948. - *Traité pratique de chimie végétale.* (Georges Frère éd.) Tourcoing, II, 515 p.
- BURG S.P., 1962. - The physiology of ethylene formation. *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 13, 265-302.
- BUTENKO R.G., 1968. - Plant tissue culture and plant morphogenesis. (Chailakhyan M. Kh. éd.), Israel program for scientific translations, 291 p.
- CAMUS G. 1949. - Recherches sur le rôle des bourgeons dans les phénomènes de morphogénèse. *Rev. Cyt. Biol. Vég.*, 11, 1-199.
- CAPITE (de) L., 1955. - Action of light and temperature on growth of plant tissue cultures *in vitro*. *Am. J. Bot.*, 42, 869-873.
- CASTILLO F.J., C. PENEL, Th. GASPAR et H. GREPPIN. 1981. - Masquage et démasquage des isoperoxydases de pelargonium. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 292, 259-262.
- CASTILLO F.J., F. CELARDIN et H. GREPPIN, 1984. - Peroxidase assay in plants : interference by ascorbic acid and endogenous inhibitors in *Sedum* and *Pelargonium* enzyme extracts. *Plant Growth reg.*, 2, 69-75.
- CATESSON A.M., Y. GZANINSKI et B. MONTIES, 1978. - Histochemical characterization of cell wall peroxidase during lignification. *C. R. Acad. Sci.*, 286, 1787-1790.

- CATESSON A.M., A. IMBERTY, R. GOLBERG et Y. GZANINSKI, 1986. - Nature, localization and specificity of peroxidases involved on lignification processes. In : Molecular and Physiological Aspects of plant peroxidase. H. GREPPIN, C. PENEL and Th GASPAR Eds. 189-198.
- CHAMPAGNAT P., 1961. - Différenciation. Formation des racines et des bourgeons, dominance apicale et épinastie. *Encycl. of Plant Physiol.*, 14, 839-908.
- CHANEY R.L., J.C. BROWN et L.O. TIFFIN, 1972. - Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptakes by soybeans. *Plant Physiol.*, 50, 208-213.
- CHAPPET A. et J. DUBOUCHET, 1970. - Gradients peroxydasiques des coléoptiles de blé. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 270, 3224-3227.
- CHMIELNICKA J., G. OHLSSON, K.G. PAUL et J. STIGBRAND, 1971. - Substrate specificity of plant peroxidases. *FEBS Letters*, 17, 181-184.
- CHODAT R. et A. BACH., 1903. - Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde un der chemie der lebenden Zelle.V. Zerlegung der sogenannten oxydasen in oxygenasen und peroxydasen. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, 36, 606-608.
- CHRIST R.A., 1974. - Iron requirement and iron uptake from various iron compounds by different plant species. *Plant Physiol.*, 54, 582-585.
- CONN E.E., 1964. - Enzymology of phenolic compounds. In : Biochemistry of phenolic compounds. HARBONNE J.B. ed. Academic Press, New York, 399-435.
- CORNEJO-MARTIN M.J., A.M. MINGO-CASTEL et E. PRIMO-MILLO, 1979. - Organ redifferenciation in rice callus. Effects of C₂H₄, CO₂ and cytokinins. *Z. Pflanzenphysiol.*, 94, 117-123.
- COUILLEROT J.P., R. BOURIQUET et J.L. BONNEMAIN, 1978. - Phénomènes d'histogénèse dans les explantats de feuilles d'endive étiolées (*Cichorium intybus* L.) cultivés *in vitro* *Rev. Gen. Bot.*, 85, 3-10.

- CZANINSKI Y., et A.M. CATESSON, 1969. - Localisation ultrastructurale d'activités peroxydasiques dans les tissus conducteurs végétaux au cours du cycle annuel. *J. Micro. Fr.*, 8, 875-888.
- DARIMONT E., 1977. - Les peroxydases de la racine de lentille. Leur variation en rapport avec l'interaction auxine-cytokinine sur la croissance. Thèse Univ. de Liège, 223 p.
- DARIMONT E. et Th. GASPAR, 1972. - A propos du nombre et du poids moléculaire des isoenzymes peroxydasiques de la racine de *Lens culinaris*. *Soc. Bot. Fr. Mémoire Coll. Morphologie*, 211-222
- DARIMONT E. et R. BAXTER, 1973. - Ribosomal and mitochondrial peroxidase isoenzymes of the Lentil (*Leus culinaris*) root. *Planta*, 110, 205-212.
- DARIMONT E., K. SCHWACHHOFER et TH. GASPAR. - 1973. - Isoperoxydases et hydroxyproline dans les parois cellulaires des racines de lentille. *Biochim. Biophys. Acta*, 321, 461-466.
- DARIMONT E., C. PENEL, G. AUDERSET, H. GREPPIN et Th. GASPAR, 1977. - Peroxydases de haut poids moléculaire identifiées à des peroxydases membranaires chez la lentille. *Arch. Inter. Physiol. et Bioch.*, 85, 497-507.
- DECEDUE C.J. et R. BORCHERT, 1980. - Potato peroxidase isozymes. *Plant Physiol.*, 65 (Suppl.) : 29.
- DE JONG D.W., 1967. An Investigation on the role of plant peroxidase in cell wall development by the histochemical method. *Jour. Histochem. Cytochem.*, 15, 335-346.
- DE JONG D.W., 1972. - Detergent extraction of enzymes from tobacco leaves varying in maturity. *Plant Physiol.*, 50, 733-737.
- DE JONG D.W., 1973. - Effect of temperature and day length on peroxidase and malate (NAD) dehydrogenase isozyme composition in tobacco leaf extracts. *Amer. J. Bot.*, 60, 846-852.

- DE JONG D.W., A.C. OLSON, K.M. HAWKER et E.F. JANSEN, 1968. - Effect of cultivation temperature on peroxidase isozymes of plant cells grown in suspension. *Plant Physiol.*, 43, 841-844.
- DEKOCK P.C., K. COMMISIONG, V.C. FARMER et R.H. INKSON, 1960. - Interrelationships of catalase, peroxidase hematin, and chlorophyll. *Plant Physiol.*, 35, 599-604.
- DEKOCK P.C. et P. VAUGHAN, 1975. - Effects of some chelating and phenolic substances on the growth of excised pea root segments. *Planta*, 126, 187-195.
- DELINCEE H., B.J. RADOLA et F. DRAWERT., 1973. - The effect of combined heat and irradiation treatment on the isoelectric and size properties of horseradish peroxidase. *Acta Alimentaria*, 2, 259-274.
- DORE J., 1965. - Physiology of regeneration in cormophytes. *Handbuch Pflanzenphysiol.*, 15, 1-91.
- DUBOIS J., 1973. - Action de la lumière sur la croissance et la teneur en pigments plastidaux des tissus isolés de Carotte. *Bull. Soc. Fr.*, 120, 3-26.
- DUBOIS J., 1980. - Composés sulfhydrilés et croissance de tissus isolés de carotte (*Daucus carota* L.) et de suspensions cellulaires de Silene (*Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause). Thèse Univ. Lille, 335 p.
- DUBUCQ M., 1976. - Compared action of IAA, kinetin and ethrel on isoperoxidase and growth of *Lens culinaris* Med. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.*, 109, 93-108.
- DUBUCQ M., M. HOFINGER et Th. GASPAR, 1978. Auxin-controlled root growth and ethylene production. *Plant Cell. Environ.*, 1, 151-153.
- DUNFORD H.B., 1986. - Catalytic mechanisms of plant peroxidases with emphasis on reactions of compounds I and II. *Molecular and Physiological aspects of plant peroxidase*. Eds. H. GREPPIN, C. PENEL et Th. GASPAR. Université de Genève, 15-23.
- ELLIS R. et M. GREENAWALD, 1985. - Utilization of aminolevulinic acid as a nitrogen source by a green alga. *Plant Science Letters*, 37, 213-216.

- ENGELSMA G. et G. MEIJER, 1965. - The influence of light of different spectral regions on the synthesis of phenolic compounds in Gherkin seedlings in relation to morphogenesis. I. Biosynthesis of phenolic compounds. *Acta Botanica.*, 14, 54-72.
- ENGULD K.C., 1973. Shoot differentiation in callus cultures of *Datura innoxia* *Physiol. Plant.*, 28, 155-159.
- EVANS H., 1959. - The biochemical role of iron in plant metabolism. School of Forestry Bull. 15, Duke University, Durham, North Carolina
- EVANS J.J., 1970. - Spectral similarities and kinetic differences of two tomato plant peroxidase isoenzymes. *Plant Physiol.*, 45, 66-69.
- FEINSTEIN R., 1949. - Perborate as substrate in a new assay of catalase. *J. Biol. Chem.*, 180, 1197-1202.
- FLEURIET A. et A. DELOIRE, 1982. - Aspects histochimiques et biochimiques de la cicatrisation des fruits de Tomate blessés. *Z. Pflanzenphysiol.*, 107, 259-268.
- FOLIN O. et U. CIOCALTEU, 1927. - On tyrosine and tryptophane determination in protein. *J. Biol. Chem.*, 73, 622-650.
- FONNESBECH M., 1974 (a). - The influence of NAA, BA and temperature on shoot and root development from Begonia x Cheimantha petiole segments grown *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 32, 49-54.
- FONNESBECH M., 1974 (b). - Temperature effects on shoot and root development from Begonia x Cheimantha petiole segments grown *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 32, 282-286.
- FREUDENBERG K., 1959. - Biosynthesis and constitution of lignin. *Nature*, 183, 11-52.
- GALSTON A.W., J. BONNER et S.S. BAKER, 1953. - Flavoprotein and peroxidase as components of the indole acetic acid oxidase system of Peas. *Arch. Biochem. Biophys.*, 42, 456-470.

- GALSTON A. et P. DAVIES, 1969. - Hormonal regulation in higher plants. *Sciences*, 163, 1288-1297.
- GALSTON A. W. et W.S. HILLMAN, 1961. - The degradation of auxin. *Handb. d. Pflanzenphysiologie*, 14, 647-670.
- GALSTON A., S. LAVEE et B. SIEGEL, 1968. - The induction and repression of peroxidase isoenzymes by 3-indole acetic acid. In : *Biochemistry and Physiology of plant growth substances*. F. WIGTMAN and G. SETERFIELD, eds, p. 455-472, Ottawa Ring Press.
- GARDINER M. et R. CLELAND, 1974 (a). - Peroxidase changes during the cessation of elongation in *Pisum sativum* stems. *Phytochemistry*, 13, 1095-1098.
- GARDINER M., et R. CLELAND, 1974 (b). - Peroxidase isoenzymes of avena coleoptile. *Phytochemistry*, 13, 1707-1711.
- GASPAR Th., 1965. - Catabolisme auxinique et effecteurs auxines-oxydasiques : étude comparée chez *Lens culinaris* et *Slavia splendens*. *Bull. Soc. Roy. Sc. Liège*, 78, 391-537.
- GASPAR Th., 1979. - Des isoperoxydases comme marqueurs de la différenciation cellulaire et du développement chez les végétaux. Xème rencontre de Méribel sur la différenciation cellulaire (Les Arcs), 175-196.
- GASPAR Th. 1986. - Integrated relationships of biochemical and physiological peroxidases activities. *Molecular and Physiological aspects of plant peroxidases*. Eds. H. GREPPIN, C. PENEL et Th. GASPAR, Université de Genève, 455-468.
- GASPAR Th, P.E. PILET et M. BASTIN, 1964. - Effecteurs auxines-oxydasiques : Définition et indices. *Physiol. Vég.*, 2, 221-231.
- GASPAR Th. et A. XHAUFFLAIRE, 1967. - Effect of kinetin on growth, auxin catabolism, peroxidase and catalase activities. *Planta*, 72, 252-257.
- GASPAR Th. et A. XHAUFFLAIRE, 1968. - Action comparée de la 6-furfurylaminopurine et de la 6-(gamma, gamma-dimethylallylamino)

- purine sur la croissance, l'activité peroxydasique et la teneur en chlorophylles et en caroténoïdes. *Physiol. Plant.*, 21, 792-799.
- GASPAR Th., J. LACOPPE et M. HOFINGER, 1969. - Influence de la nature de pH et de la force ionique du tampon d'extraction dans la mesure des activités peroxydasique et catalasique des racines de lentille. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.*, 103, 207-211.
- GASPAR Th., A.A. KHAN et D. FRIES, 1973. - Hormonal control of isoperoxidases in lentil embryonic axis. *Plant Physiol.*, 51, 146-149.
- GASPAR Th., M. BOUCHET, A.A. KHAN et D. FRIES, 1975. - Cytokinin interaction with abscissic acid and coumarin in relation to growth and isoperoxidases of lentil. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.*, 108, 5-15.
- GASPAR Th., M. DUBUCQ et R. ANTOSZEWSKI, 1975. - Auxin decarboxylation and isoperoxidases in strawberry petiole extracts. *Biol. Plantarum*, 17, 23-30.
- GASPAR Th., A. THORPE et M. TRAN THANH VAN, 1977. - Changes in isoperoxidases during differentiation of cultured tobacco epidermal layers. *Acta Horticulture*, 78, 61-73.
- GASPAR Th., WYNDAELE, M. BOUCHET et E. CEULEMANS, 1977. - Peroxidase and alpha-amylase activities in relation to germination of dormant and non-dormant wheat. *Physiol. Plant.*, 40, 11-14.
- GASPAR Th., C. PENEL, T. THORPE et H. GREPPIN, 1982. - Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Université de Genève. Centre de Botanique.
- GASPAR Th., C. PENEL, F.J. CASTILLO et H. GREPPIN, 1985. - A two step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol. Plant.*, 64, 418-423.
- GASPAR Th., C. PENEL et H. GREPPIN, 1986. - Peroxidases : structures and catalytic reactions, biosynthesis, transport and location, physiological roles. *Bull. Groupe Polyphénols (C. R. Journées internationales d'Etudes)*, Montpellier, 13, 159-174.

- GAUTHERET R.J., 1942 (a). - Le bourgeonnement des tissus végétaux en culture. *Science*, 40, 95-128.
- GAUTHERET R.J., 1942 (b). - Recherches sur le développement des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Rev. Cytol. et Biol. Végétales*, 6, 87-180.
- GAUTHERET R.J., 1959. - La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisations. Masson et Cie, Ed., Paris, 863 p.
- 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., 1966. - Phytohormones et culture de tissus. Dans : Les phytohormones et l'organogénèse" 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*. *Am. J. Bot.*, 56, 702-717.
- GEORGE P., 1953. - The chemical nature of the second hydrogen peroxide compound formed by cytochrome c peroxidase and Horseradish peroxidase 1. Titration with reducing agents. *Biochem. J.*, 55, 220-230.
- GERLOFF E., M. STAHMANN et D. SMITH, 1967. - Soluble proteins in alfafa roots as related to cold hardiness. *Plant Physiol.*, 42, 895-899.
- GIBSON K.D., W.G. LAVER et A. NEUBERGER, 1958. - Initial stages in the biosynthesis of porphyrins. 2. The formation of delta-aminolaevulic acid from glycine and succinyl-coenzyme A by particles from chicken erythrocytes. *Biochem. J.* 70, 71-81.
- GORDON S.A., 1954. - Occurrence, formation and inactivation of auxin. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 5, 341-378.
- GORDON S.A. et L.G. PALEG, 1961. - Formation of auxin from tryptophan through action of polyphenols. *Plant Physiol.*, 36, 838-845.
- GRISON R. et P.E. PILET, 1985. - Cytoplasmic and wall isoperoxidases in growing maize roots. *J. Plant Physiol.*, 118, 189-199.

- GOLBERG R., A. IMBERTY, M. LIBERMAN et R. PRAT, 1986. Relationships between peroxidatic activities and cell wall plasticity. Molecular and Physiological aspects of plant peroxidases. Eds H. GREPPIN, C. PENEL et Th. GASPAR, Université de Genève, 209-220.
- GOLBERG R., A. IMBERTY et J. CHUBA, 1986. - Development of isoperoxidase along the growth gradient in the mung bean hypocotyl. *Phytochemistry*, 25, 6, 1271-1274.
- GRAMBOW H.J. et B. LANGENBECK-SCHWICH, 1983. - The relationships between oxidase-activity, peroxidase activity, hydrogen peroxide, and phenolic compounds in the degradation of indole-3-acetic acid *in vitro*. *Planta*, 157, 131-137.
- GROSS G.G., C. JANSE et E.F. ELSTNER, 1977. - Involvement of malate, monophenols, and the superoxide radical in hydrogen peroxide formation by isolated cell walls from horseradish (*Armorica laphathifolia* Gilib.). *Planta*, 136, 271-276.
- HAARD N.F., 1973. - Upsurge of particulate peroxidase in ripening banana fruit. *Phytochemistry*, 12, 555-560.
- HAARD N. et M. MARSHALL, 1976. - Isoperoxidase changes in soluble and particulate fractions of sweet potato root resulting from cut injury, ethylene and black rot infection. *Physiol. Plant. Pathol.*, 8, 195-205.
- HALL J. et R. SEXTON, 1972. - Cytochemical localization of peroxidase activity in root cells. *Planta*, 108, 103-120.
- HALPERIN W. et S. MINOCHA, 1973. - Benzyladenine effects on cell separation and wall metabolism. *Can. J. Bot.* 51, 1347-1354.
- HARE R.C., 1964. - Indoleacetic acid oxidase. *Bot. Rev.*, 30, 129-165.
- HARRISON P.M., 1964. - Ferritin and haemosiderin. In : Iron Metabolism, an international symposium, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen Heidelberg, 40-56.
- HASEGAWA P., T. MURASHIGE et F. TAKATORI, 1973. - Propagation of asparagus through shoot apex culture. II. Light, temperature

- requirements transplantability of plants and cyto-histological characteristics. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 98, 143-148.
- HEIDE O., 1964. - Effects of light and temperature on the regeneration ability of Begonia leaf cuttings. Physiologia Plantarum, 17, 789-804.
- HENDERSON J.H. et J.P. NITSCH, 1962. - Effect of certain phenolic acids on the elongation of avena first internodes in the presence of auxin and tryptophan. Nature, 195, 780-782.
- HELLER R., 1953. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro* Thèse Paris 223 p. et Ann. Sci. Nat. Bot., 14, 1-223.
- HELLER R., 1959. - Observations préliminaires sur l'action de l'EDTA en culture de tissus. Bull. Soc. Fr. Physiol. Veg., 5, 51-57.
- HELLER R. et M. RICHEZ, 1959. Sur l'alimentation en fer des tissus végétaux en culture. C. R. Acad. Sci. Paris, 249, 295-297.
- HEPLER P.K., D.E. FOSKET et E.H. NEWCOMB, 1970. - Lignification during secondary wall formation in Coleus : an electron microscopic study. Am. J. Bot., 57, 85-96.
- HEPLER P.K., R.M. RICE et W.A. TERRANOVA, 1972. - Cytochemical localization of peroxidase activity in wound vessel members of coleus. Can. J. Bot., 50, 977-983.
- HILDEBRANDT A.C., A.J. RIKER et B.M. DUGGAR, 1945. - Growth *in vitro* of excised tobacco and sunflower tissue with different temperatures, hydrogen ion and amounts of sugar. Amer. J. Bot., 32, 357-361.
- HILL J.M., 1970. - The oxidation of pyridoxal and related compound by pea seedlings extracts or systems containing peroxidase. Phytochemistry, 9, 725-734.
- HOYLE M.C., 1972. - Indoleacetic acid oxidase : a dual catalytic enzyme ? Plant Physiol., 50, 15-18.
- HRADILIK J., 1976. - Effects of auxin, cytokinin, ethrel and cotyledon excision on the peroxidase activity in cotylar buds of decapitated pea (*Pisum sativum* L.) plants. Biol. Plant., 18, 93-98.



- HUAULT C., D. KLEIN-EUDE, P. ROLLIN et J.P. BLONDEL, 1971. - Influence de la lumière sur l'activité PAL des cotylédons de Radis. Rôle du phytochrome et de l'âge des tissus. C. R. Acad. Sci., Paris, Série D, 273, 745-748.
- HUXTER T.J., T.A. THORPE et D.M. REID, 1981. - Shoot initiation in light and darkgrown tobacco callus : the role of ethylene. *Physiologia Plant*, 53, 319-326.
- HYDE B.B., A.T. HODGE et A. KOHN, 1963. - Studies on phytoferritin identification and isolation. *J. Ultrastruct. Res.*, 9, 248-258.
- IVANOVA T.M., B. RUBIN et I. DAVYDOVA, 1970. - On the catalytic functions of chloroplast peroxidase. *Dokl. Akad. Nauk., SSSR.*, 190, 214.
- IVANOVA N. et Y.V. PEIVE, 1973. - Nitrate reduction by higher plant peroxidase. *FEBS Letters*, 31, 229-232.
- JANSSEN M.G.H. 1970. - Indoleacetic acid oxidase, peroxidase and polyphenol oxidase of pea roots. *Acta Bot. Neerl.*, 19, 73-80.
- JENSEN W., 1955. - The histochemical localization of peroxidase in roots and its induction by indoleacetic acid. *Plant Physiol.*, 30, 426-432.
- JOSEPH C. et P. PAULET, 1975. - Contribution à l'étude vernalisante du froid sur la racine de *Cichorium intybus* L. *Physiol. vég.*, 13, 517-525.
- KAMEL M.Y. et A.M. GHAZY, 1973. - Peroxidases of *Cynara scaoymus* (global artichoke) leave : purification and properties. *Acta. Biol. Med. Germ.*, 31, 39-49.
- KAMINSKI C., 1971. - Variations des activités peroxydasique et phénoloxidasique au cours de la croissance de *Coleus blumei* Benth. var. Automne. *Planta*, 99, 63-72.
- KANNAN S. et MATHEW Th., 1970. - Effects of growth substances on the absorption and transport of iron in plants. *Plant Physiol.*, 45, 206-209.

- KATO Y., 1978. - The involvement of photosynthesis in inducing bud formation on excised leaf segments of *Heloniopsis orientalis* (Liliaceae). *Plant and Cell Physiol.*, 19, 791-799.
- KATO Y. et N. OZAWA, 1979. - Adventitious bud formation on leaf and stem segments of *Heloniopsis orientalis* grown at various temperatures. *Plant and Cell Physiol.*, 20, 491-497.
- KEFFORD N.P. et O.H. CASO, 1972. - Organ regeneration on excised roots of *Chondrilla juncea* and its chemical regulation. *Aust. J. Biol. Sci.*, 25, 691-706.
- KEILIN D. et E.F. HARTREE, 1951. - Purification of horse-radish peroxidase and comparison of its properties with those of catalase and methemoglobin. *Biochem. J.*, 49, 88-104.
- KENTEN R.H., 1955. - The oxidation of indole-3-acetic acid by waxpod bean root sap and peroxidase system. *Biochem. J.*, 59, 110-121.
- KEVERS C., M. COUMANS, W. DE GREEF, M. JACOBS et Th. GASPAR, 1981. - Organogenesis in habituated sugar beet callus. Auxin content and protectors, peroxidase pattern and inhibitors. *Z. Pflanzenphysiol.*, 101, 79-87.
- KEVERS C., M. COUMANS, W. DE GREEF, M. HOFINGER et Th. GASPAR, 1981. - Habituation in sugar beet callus : auxin content auxin protectors, peroxidase pattern and inhibitors. *Physiol. Plant.*, 51, 281-286.
- KEVERS C., M. COUMANS, M.F. COUMANS-GILLES et Th. GASPAR, 1984. - Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, 61, 69-74.
- KEVERS C. et GASPAR Th., 1985. - Soluble membrane and wall peroxidases, amonialyase and lignin changes in relation to vitrification of carnation tissues cultured *in vitro*. *J. Plant Physiol.*, 118, 41-48.
- KEVERS C., H. GREPPIN, C. PENEL et Th. GASPAR, 1985. - Short- and- long term effects of auxins on ethylene production by auxin-dependent and auxin-independent sugarbeet cell lines. *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, 93, 1339-1340.

- KIKUCHI G., A. KUMAR, P. TALMAGE et D. SHEMIN, 1958. - The enzymatic synthesis of delta-aminolevulinic acid. *J. Biol. Chem.*, 233, 1214-1219.
- KIM S.S., S.H. WENDER et E.S. SMITH, 1980. - Isolation and characterization of two isoperoxidases from tobacco tissue cultures. *Phytochemistry*, 19, 165-168.
- KLEIN R. et G. MANOS, 1960. - Use of metal chelates for plant tissue cultures. *Annals. N.Y. Acad. Sci.*, 88, 416-425.
- KNOP W., 1884. - Bereitung einer concentrirten Nährstofflösung für Pflanzen. *Landw. Versuchs-stat.*, 30, 292-294.
- KOBLITZ H. et D. KOBLITZ, 1964. - Participation of cytochrome-oxidase in lignification. *Nature*, 204, 199-200.
- KU H.S., S.F. YANG et H.K. PRATT, 1970. - Ethylene production and peroxidase activity during tomato fruit ripening. *Plant Cell. Physiol.*, 11, 241-246.
- KUBEK D.J., M.L. SHULER, 1979. - The effect of variations in carbon and nitrogen concentrations on phenolics formation in plant cell suspension cultures. *J. of Natural Products*, 43, 87-96.
- KUHN R., D.B. HAND et M. FLORKIN, 1931. - Über die Nature der Peroxidase. *Hoppe-Seylers*, 201, 255-266.
- LALORAYA M.M., K.N. GURUPRASAD et S.S. CHAUDHARY, 1980. - Peroxydase mediated oxidation of betacyanin. *Plant Biochem. J.*, 7, 101-110.
- LANCE C., 1963. - Recherches sur la croissance et le métabolisme respiratoire de tissus végétaux normaux et tumoraux cultivés *in vitro*. Thèse Fac. Sci. Paris, 157 p.
- LARSEN P., 1951. - Formation, occurrence and inactivation of growth substances. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 2, 169-198.
- LAVEE S. et A.W. GALSTON, 1968. - Structural, physiological and biochemical gradients in Tobacco pith tissue. *Plant Physiol.*, 43, 1760-1768.

- LEE T.T., 1972. - Interaction of cytokinin, auxin and gibberellin on peroxidase isozymes in Tobacco tissues cultured *in vitro*. *Canad. J. Bot.*, 50, 2471-2477.
- LEE T.T., 1973. - On extraction and quantitation of plant peroxidase isoenzymes. *Physiol. Plant.*, 2, 198-203.
- LEE T.T., 1974. - Cytokinin control in subcellular localization of indoleacetic acid oxidase and peroxidase. *Phytochemistry*, 13, 2445-2453.
- LEE T.T., 1977. - Role of phenolic inhibitors in peroxidase mediated degradation of indole-3-acetic acid. *Plant Physiol.*, 59, 372-375.
- LEE T.T., A.N. STARRATT et J.J. JEVNIKAR, 1982. - Regulation of enzymic oxidation of indole-3-acetic acid by phenols : structure activity relationships. *Phytochemistry*, 21, (3), 517-523.
- LEFEBVRE R., 1972. - Effets comparés d'un traitement anaérobie et de l'éthylène sur le bourgeonnement et la synthèse des pigments foliaires. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 275, 193-195.
- LEFEBVRE R., 1977. - Influence de l'anaérobiose sur le bourgeonnement de tissus de racine d'endive (*Cichorium intybus* L.). *Rev. Cyt. Biol. vég.*, 40, 185-291.
- LEFEBVRE R., 1978. - Action comparée de l'éthylène et de l'éthane sur le bourgeonnement. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 287, 25-27.
- LEFEBVRE R., 1979. - Influence de l'éclaircissement sur le bourgeonnement de fragments de racine d'endive (*Cichorium intybus* L.) cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 289, 271-274.
- LEGRAND B., 1969. - Répartition des catalases et peroxydases dans des fragments de racine de Carotte cultivés *in vitro*. *Rev. Gen. Bot.*, 76, 469-475.
- LEGRAND B., Th. GASPARD, C. PENEL et H. GREPPIN, 1976. - Light and hormonal control of phenolic inhibitors of peroxidase in *Cichorium intybus* L. *Plant Biochem. J.*, 3, 119-127.

- LEGRAND B. et J. VASSEUR., 1972. - Evolution de l'acide ribonucléique, des protéines et de l'activité peroxydasique au cours de la culture *in vitro* de fragments de feuilles d'endive (*Cichorium intybus* var. Witloof). C. R. Acad. Sci. Paris, 275, 357-360.
- LEGRAND B. et J. DUBOIS, 1977. - Evolution des peroxydases et auxine oxydases au cours de la croissance d'une suspension cellulaire de silène (*Silene alba* (Miller) E.H.K. Krause). C. R. Acad. Sc. Paris, 285, 661-664.
- LEGRAND B. et J. DUBOIS, 1978. - Influence des régulateurs de croissance sur la prolifération, l'activité peroxydasique et les isoperoxydases de la suspension cellulaire de *Silene alba*. Biol. Plant., 20, 107-113.
- LESHEM Y. et A.W. GALSTON, 1971. - Repression of isoperoxidase formation in excised Tobacco pith by exogenous auxin-controlled RNA. Phytochemistry, 10, 2869-2878.
- LEU K., S. WENDER et E. SMITH, 1975. - Effect of darkness on isoperoxidases in Tobacco tissue culture. Phytochemistry, 14, 25-51.
- LIEBERMAN M., A.T. KUNISHI, L.W. MAPSON et D.A. WARDALE, 1965. - Ethylene production from methionine. Biochem. J., 97, 449-461.
- LINOSSIER G., 1898. - Contribution à l'étude des ferments oxydants. Sur la peroxydase du pus. C. R. Soc. Biol., 50, 373-375.
- LIPETZ J. et A.J. GARRO, 1965. - Ionic effects on lignification and peroxidase in tissue cultures. J. of Cell. Biol., 25, 109-116.
- LIU E.M. et D.T.A LAMPORT, 1973. The pH induced modification of the electrophoretic mobilities of horseradish peroxidase isozyme. Arch. Biochem. Biophys., 158, 822-826.
- LOBARZEWSKI J. et T. WOLSKI, 1985. - The function of free carboxyl groups in the action of peroxidase and indole-3-acetic oxidase. Phytochemistry., 24, 2211-2213.
- LOWRY C., N. ROSEBOROUGH., A. FARR et R. RANDAL, 1951. - Protein measurement with the Folinphenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

- MAAB H. et D. KLAMBT, 1977. - Cytokinin effect on protein synthesis *in vivo* in higher plants. *Planta*, 133, 117-120.
- MACHACKOVA I. et Z. ZMRHAL, 1981. - Is peroxidase involved in ethylene biosynthesis ? *Physiol. Plant.* 53, 479-482.
- MACNICOL P.K., 1973. - Differential extraction of isoperoxidases from *Pisum* shoots. *Phytochemistry*, 12, 1269-1272.
- MADER M., 1975. - Änderung der peroxydase isoenzymmuster in kalluskulturen in abh angigkeit van der Differenzierung. *Planta Medica Suppl.*, 153-168.
- MADER M., 1976. - Die lokalisation der peroxidase - isoenzymgruppe GI in der Zellwand von Tabak-geweben. *Planta Berl.*, 131, 11-15.
- MADER M. et WALTER C., 1986. - De novo synthesis and release of peroxidase in cell suspension of *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, 169, 273-277.
- MAHADEVAN S., 1964. - Enzymes involved in the synthesis and breakdown of indoleacetic acid. *Modern Methoden der Pflanzenanalyse*, 7, 238-259.
- MARCELLE R., 1970. - Effets de l'acide gibbérellique et des freinants, phosphon D et CCC, sur le bourgeonnement  piphyll des *Bryophyllum tubiflorum* Harv. *Physiol. Vég.*, 8, 125-133.
- MARGARA J., 1969. - Etude des facteurs de la néoformation des bourgeons en culture *in vitro* chez le Chou-fleur (*Brassica oleracea* L. var. Botrytus). *Ann. Physiol. Vég.*, 11, 95-112.
- MARSH H.V., H.J. EVANS et G. MATRONE, 1963 (a). - Investigations of the role of iron chlorophyll metabolism. I. Effect of iron deficiency on chlorophyll and heme content and on the activities of certain enzymes in leaves. *Plant Physiol.*, 35, 632-638.
- MARSH H.V., H.J. EVANS et G. MATRONE; 1963 (b). - Investigations of the role of iron chlorophyll metabolism. II. Effect of iron deficiency on chlorophyll synthesis. *Plant Physiol.*, 35, 639-642.

- MAST C.A. (Van der), 1970. - The presence of membrane-bound IAA degrading protein-complexes in homogenates of pea roots and the manner of attachment to these membranes. *Acta. Bot. Neerl.* 19, 553-566.
- MATSUNO H. et I. URITANI, 1972. - Physiological behaviour of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or blackrot. *Plant and Cell Physiol.* 13, 1091-1101.
- MATSUSHITA S. et F. IBUKI, 1960. - Peroxidase activity found in the ribonucleoprotein particles from pea seedlings and rabbit-liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 40, 540-542.
- MATTOO K. et V. MODI., 1969. - Ethylene and ripening of Mangoes. *Plant Physiol.*, 44, 308-310.
- MATTOO A.K. et M. LIEBERMAN, 1977. - Localization of the ethylene-synthesizing system in apple tissue. *Plant Physiol.*, 60, 794-799.
- MAZZA G., J. RICHARD et M. BOUCHET, 1970. - Potentiels de demi-réduction et activités "auxine-oxydasique" de peroxydase de Navet (*Brassica napus* h.) *C. R. Acad. Sci. Paris*, 270, 2492-2494.
- MAZZA G. et K.G. WELINDER, 1980. - Covalent structure of turnip peroxidase 7. Cyanogen bromide fragments, complete structure, and comparison to horseradish peroxidase. *Eur. J. Biochem.*, 108, 481-489.
- Mc COWN B., R.C. Mc LEESTER, G. BECK et T. HALL., 1969 (a). - Environment-induced changes in peroxidase zymograms in the stems of deciduous and evergreen plants. *Cryobiology*, 5, 410-412.
- Mc COWN B., T. HALL et G. BECK, 1969 (b). - Plant leaf and stem proteins. II. Isozymes and environmental changes. *Plant Physiol.*, 44, 210-216.
- Mc COWN B., D. Mc COWN, G. BECK et T. HALL, 1970. - Isoenzyme complement of *Dianthus callus* cultures : Influence of light and temperature. *Am. J. Bot.*, 57, 148-152.
- MENNES A.M., H. OOSTROM et F. TREURNIET, 1973. - Light and electron microscopic localization of peroxidase during the development of root

- nodules of *Pisum sativum* L. Proc. 8 th. Tockio Intern. Conf. Plant growth Substances, 655-662.
- MEUDT W.J., 1964. - Studies on the oxidation of indole-3-acetic acid in plants. Dissert. Absstr., U.S.A., 25, 219.
- MEUDT W.J. et K.J. STECHER, 1972. - Promotion of peroxidase activity in the cell wall of Nicotiana. Plant Physiol., 50, 157-160.
- MORGAN P. et J.L. FOWLER., 1972. - Ethylene : modification of peroxidase activity and isozyme complement in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.); Plant and Cell Physiol., 13, 727-736.
- MORISHIMA I., Y. TAKAMUKI et Y. SHIRO, 1984. - Nuclear magnetic resonance studies of metalloporphyrin pi-cation radical as models for compound I peroxidases. J. Am. Chem. Soc., 106, 7666-7672.
- MORITA Y., 1977. - Studies on structures and functions of plant enzymes and proteins. J. Agric. Chem. Soc. Japan, 51, R65.
- MORITA Y., C. YOSHIDA et Y. MAEDA, 1971. - Properties and structures of peroxidase isoenzymes of Japanese radish. Agr. Biol. Chem., 35, 1074-1091.
- MURASHIGE T., 1964. - Analysis of the inhibition of organ formation in Tobacco tissue culture by gibberellin. Physiol. Plant., 17, 636-643.
- MURASHIGE T., 1974. - Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant. Physiol., 25, 135-166.
- MURASHIGE T. et F. SKOOG, 1962. - A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15, 473-497.
- NANDI D.L. et D. SHEMIN 1968. - Delta-aminolevulinic acid dehydratase of *Rhodopseudomonas spheroides*. III. Mechanism of porphobilinogen synthesis. J. Biol. Chem., 243, 1236-1242.
- NARI J. et P. PENON, 1968. - Nature des composés hématiniques chez les végétaux. Physiol. Vég., 6, 47-66.

- NEGRUTIU T., M. JACOBS et Th. GASPAR, 1979. Leaf formation and peroxidases from *Arobidopsis* callus. *Z. Pflanzenphysiol.*, 91, 119-126
- NITSCH J.P. 1968. -. Studies on the mode of actions of auxins,, cytokinins and gibberellins at the subcellular level. In : WIGHTMAN F. et SETTERFIEL G. "Biochemistry and physiology of plant growth substances". Proc of the 6th intern. Conf on Plant growth Substances. Ottawa the Runge Press. Ltd ed. 563-580.
- NITSCH J.P., 1970. - Hormonal factors in growth and development. In : The biochemistry of fruits and their products. HULME A.C. ed. Academic Press Londres Vol. I, 427-472.
- NITSCH C. et 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.
- NOVACKY A. et E. HAMPTON, 1968. - Peroxydase isozymes in virus infected plant. *Phytopath.*, 58, 301-305.
- OCKERSE R., B. SIEGEL et A.W. GALSTON, 1966- Hormone-induced repression of a peroxidase isozyme in plant tissue. *Science*, 151, 452-453.
- OGAWA S, Y. SHIRO et I. MORISHIMA, 1979. - Calcium binding by horseradish peroxidase C and the heme environmental structure. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 90, 674-678.
- OSBORNE D.J., 1978 - Ethylene : In : Phytohormone and related compounds. A comprehensive treatise vol. 1 LETHAM D.S., GOODWIN P.B. et HIGGINS T.J., Eds Amsterdam 265 p.
- PARISH R.W., 1968. - Studies on senescing Tobacco leaf disks with special reference to peroxidase. I. The effects of cutting and of inhibition of nucleic acid and protein synthesis. *Planta*, 82, 1-3.
- PARISH R.W., 1969. - The effects of light in peroxidase synthesis and indoleacetic acid oxidase inhibitors in coleoptiles and first leaves of wheat. *Z. Pflanzenphysiol.*, 60, 90-97.

- PARISH R.W., 1972. - The intracellular location of phenol oxidases, peroxidase and phosphatases in the leaves of Spinach beet (*Beta vulgaris* L. *Subspecis vulgaris*). Eur. J. Biochem., 31, 446-452.
- PARISH R.W., 1975. - The lysosome-concept in plants. I. Peroxidases associated with subcellular and wall fractions of maize root tips : implications for vacuole development. Planta, 123, 1-13.
- PARISH R.W. et F.L. MILLER, 1969. - The uptake and effects of calcium and phosphate on maturity, lignification and peroxidase activity of wheat internodes. Austral. J. Biol. Sc., 22, 77-85.
- PAUL K.G., P.I. OHLSSON et S. WOLD. - 1986. - The formation of peroxidase compound I with alkylhydro-peroxides-multiple regression or pattern recognition analysis. Molecular and physiological aspects of plant peroxidases. Eds H. GREPPIN, C. PENEL et Th. GASPAR, Université de Genève, 25-41.
- 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. et J.P. NITSCH, 1959. - Stimulation chimique du bourgeonnement chez *Cardamine pratensis* L. Bull. Soc. Bot. Fr., 106, 425-441.
- PAULET P. et 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.
- PEAUD-LENOEL C., J.P. JOUANNEAU et N. TANDEAU de MARSAC, 1972. - Bases moléculaires de l'activité des cytokinines. Bull. Soc. Bot. France, Mémoires (Coll. Morphologie), 161-172.
- PENEL C., 1986. - The role of calcium in the control of peroxidase activity. Molecular and physiological aspects of plant peroxidases. Eds. H. GREPPIN, C. PENEL, Th. GASPAR, Université de Genève, 155-164.
- PENEL C. et H. GREPPIN, 1979. - Effect of calcium on subcellular distribution of peroxidases. Phytochemistry, 18, 29-33.

- PENEL C., E. DARIMONT, B. LEGRAND, Th. GASPAR et H. GREPPIN, 1977. - Influence des traitements subis par les extraits végétaux sur le nombre et l'activité des isoperoxydases. C. R. Acad. Sci., Paris, 284, 679-682.
- PENEL C., E. DARIMONT, H. HREPPIN et Th. GASPAR, 1979. - Rôle du calcium dans l'association de peroxidases à des membranes de racines de Lentille. C. R. Acad. Sc. Paris, 289, 529-532.
- PENEL C., Th. GASPAR et H. GREPPIN, 1984. - Hormonal control of enzyme secretion by plant cells. In : ss. Purohit, ed. Hormonal regulation of Plant Growth and Development. Agro. Bot. Publi. India, 145-168.
- PENON P., J.P. CECCHINI, R. MIASSOD, J. RICARD, M. TEISSERE et M. PINNA, 1970. - Peroxidases associated with Lentil root ribosomes. Phytochemistry, 9-73.
- PILET P.E., 1957. - Dosage photolorimétrique de l'acide beta-indolylic-acétique : application à l'étude des auxines-oxydases. Rev. Gén. Bot., 64, 106-122.
- PILET P.E., 1961. - Le catabolisme auxinique. Bull. Soc. Franc. Physiol. Vég., 6, 119-137.
- PILET P.E. et Th. GASPAR., 1968. - Le catabolisme auxinique. Monographie de Physiologie végétale n° 1, (Masson éd.), 148 p.
- PLESNICAR M., W.D. BONNER et T. STOREY, 1967. - Peroxidase associated with higher plant mitochondria. Plant Physiol., 42, 366-370.
- POOVAIAH B.W. et H.P. RASMUSSEN, 1973. - Peroxidase activity in the abscission zone of bean leaves during abscission. Plant Physiol., 52, 263-267.
- POUX N., 1972. - Localisation d'activités enzymatiques dans le méristème radulaire de *Cucumis sativus* L. IV. Réactions avec la diaminobenzidine. Mise en évidence de peroxysomes. Journal de Microscopie., 14, 183-218.

- POWELL B.L., J.W. PICKERING, S.H. WENDER et E.C. SMITH, 1975. - Isoperoxidases from Tobacco tissue cultures. *Phytochemistry*, 14, 1715-1717.
- PRATT H.K. et J.D. GOESCHL, 1969. - Physiological roles of ethylene in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 20, 541-583.
- PREVOT P., 1939. - La néoformation des bourgeons chez les végétaux. *Mém. Soc. Roy. Belg.*, 3, 175-342.
- PREVOT P. et A. CHLYAH, 1968. - L'acide gibbérellique, inhibiteur des corrélations de néoformation. *C. R. Acad. Agric.*, 54, 1290-1293.
- QUOIRIN M., P. BOXUS et TH. GASPAR, 1974. - Root initiation and isoperoxydases of stem tip cutting from mature Prunus plants. *Physiol. Veg.*, 12, 165-174.
- RAA J., 1973. - Cytochemical localization of peroxidase in plant cells. *Physiol. Plant.*, 28, 132-133.
- RABIN R.S. et R.M. KLEIN, 1957. - Chlorogenic acid as a competitive inhibitor of indole acetic acid oxidase. *Arch. Bioch. and Biophys.*, 70, 11-15.
- RATHMELL W.G. et D.S. BENDALL, 1972. - The peroxidase catalysed oxidation of a chalcone and its possible physiological significance. *Biochem. J.*, 127, 125-132.
- RATHMELL W.G. et L. SEQUEIRA, 1974. - Soluble peroxidase in fluid from the intercellular spaces of tobacco leaves. *Plant Physiol.*, 53, 317-318.
- RAY P.M., 1958. - Destruction of auxin. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 9, 81-118.
- REINERT J. et J. BESEMER, 1967. - Gibberellinsäure, ein inhibitor morphogenetischer Prozesse *Wiss. Z. Univ. Rostock Math. Naturwiss.*, 16, 599-604.
- RIBEREAU-GAYON, P., 1968. - Les composés phénoliques des végétaux. Dunod ed. Paris, 254 p.

- RICARD J., 1969. - Les peroxydases des végétaux supérieurs. Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég., 15, 331-362.
- RICARD J. et J. NARI, 1966. - Contribution à l'étude des mécanismes de la dégradation de l'acide Beta-indolylacétique par la peroxydase de Raifort. Biochem. Biophys. Acta., 113, 57-70.
- RICARD J. et J. NARI 1967. - The formation and reactivity of peroxidase compound III. Biochim. Biophys. Acta, 132, 321-329.
- RIDGE I. et D. OSBORNE, 1970. - Hydroxyproline and peroxidases in cell walls of *Pisum sativum*: regulation by ethylene. J. Exp. Bot., 21, 843-856.
- RITZERT R.W. et B.A. TURIN, 1970. - Formation of peroxidase in response to indole-3-acetic acid in cultured Tobacco cells. Phytochemistry, 9, 1701-1705.
- ROBERTS P.W., 1969. - A comparison of the peroxidase isozymes of wheat plants grown at 6°C and 20°C. Can. J. Bot., 47, 263-265;
- ROBERTS L. et A.R. MILLER, 1982. - Ethylene and xylem differentiation. Whats new in Plant Physiol., 13, 13-16.
- RUCKER W. et B.J. RADOLA., 1971. - Isoelectric patterns of peroxidase isoenzymes from tobacco tissue cultures. Planta, 99, 192-198.
- SABATER F., M. ACOSTA, J. SANCHEZ-BRAVO, J. CUELLO et J.A. DEL RIO, 1983. Indole-3-methanol as an intermediate in the oxidation of indole-3-acetic acid by peroxidase. Physiol. plant. 57, 75-78.
- SAIJO R. et T. TAKEO, 1974. - Induction of peroxidase activity by ethylene and indole-3-acetic acid in tea shoots. Agric. Biol. Chem. Jap. , 38, 2283-2284.
- SAUNDERS B.C., A. HOLMES-SIEDLE et B. STARK, 1964. - Peroxidase. Butterworths, Washington, 271 p.
- SCANDALIOS J.G., 1974. - Isozymes in development and differentiation. Ann. Rev. Plant Physiol., 25, 225-258.

- SCHLOSS P., C. WALTER et M. MADER, 1987. - Basic peroxidases in isolated vacuoles of *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, 170, 225-229.
- SCHRAUDOLF H. et J. REINERT, 1959. - Interaction of plant growth regulators in regenerated processe. *Nature*, 184, 465-466.
- SCHUBERT J., 1964. - The chemical basis of chelation. In. Iron metabolism an international symposium Springer-Verlag, Berlin, Gottingen Heidelberg, 467-496.
- SCOPES R.K., 1968. - Methods of starch gel electrophoresis of sarcoplasmic proteins. *Biochem. J.*, 107, 139-150.
- SEABROOK J. et G. CUMMING., 1982. - *In vitro* morphogenesis and growth of Narcissus in response to temperature. *Scientia Horticulture*, 16, 185-199.
- SEIBERT M., 1973. - The effects of wavelenght and intensity on growth and shoot initiation in Tobacco callus. *In vitro*, 8, 435.
- SEIBERT M., P.J. WETHERBEE et D.D. JOB, 1975. - The effects of light intensity and spectral quality on growth and shoot initiation in Tobacco callus. *Plant Physiol.*, 56, 130-139
- SEQUEIRA L. et L. MINEO, 1966. - Partial purification and kinetics of indoleacetic acid oxidase from Tobacco roots. *Plant Physiol.*, 41, 1200-1205.
- SHAH R.R. et A.R. METHA, 1978. - Influence of phenolic acids on growth and production of phenolic compounds in *Crotalaria* callus culture. *Bengladesh J. Bot.*, 7 (1), 51-57.
- SHANNON L.M., E. KAY et J.Y. LEW, 1966. - Peroxidase isoenzymes from horseradish root. *J. Biol. Chem.*, 241, 2166-2172.
- SHIBATA H. et M. OCHIAI, 1976. - Aminolevulinic acid dehydratase in radish cotyledons during chloroplast development. *Plant and Cell Physiol.*, 17, 281-288.

- SHIBATA H. et M. OCHIAI, 1977. - Purification and properties of delta-amino levulinic acid deshydrate from radish cotyledons. *Plant and Cell Physiol.*, 18, 421-429.
- SIEGEL S.M., 1956. - The chemistry and physiology of lignin formation. *Quart. Rev. Biol.*, 31, 1-18.
- SIEGEL S.M., 1957. - Non-enzymic macromolecules as matrices in biological synthesis : the rôle of polysaccharides in peroxidase catalyzed lignin polymer formation from eugenol. *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 1628-1638.
- SINGH R. et D. SINGH, 1975. - Isoenzymes of peroxidase, polyphenol oxidase and catalase during germination and early plant development of dark and light growth wheat (*Triticum aestivum* L.). *Indian J. Exper. Biol. India*, 13, 581-582.
- SIRJU G. et L. WILSON, 1974. - I.A.A. oxidase preparations from fresh and aged *Ipomea batatas* tuber discs. *Phytochemistry*, 13, 111-117.
- 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. et 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.
- SMITHIES O., 1955. - Zone electrophoresis in starch gel : Group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.* 61, 629-641.
- SOMERS I.I. et J.W. SHIVE, 1942. - The iron manganese relation in plant nutrition. *Plant Physiol.*, 17, 582-602.

- STAHMANN, M.A., B.G. CLARE et W. WOODBURY, 1966. - Increase disease resistance and enzyme activity induced by ethylene production by blackrot infected sweet potato tissue. *Plant Physiol.*, 41, 1505-1512.
- STEWART F.C., M.O. MAPES et K. MEARS, 1958. - Growth and organized development cultured cells. *Amer. J. Bot.*, 45, 705-708.
- STRAUS J. et W.A. CAMPBELL; 1963. - Release of enzymes by plant tissue cultures. *Life Sci.*, 1, 50-62.
- TANG Y.W. et J. BONNER, 1947. - The enzymatic inactivation of indoleacetic acid. I. Some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings. *Arch. Biochem.* 13, 11-18.
- THEORELL H., 1942. - The preparation and some properties of crystalline Horseradish peroxidase. *Ark. Kemi-Mineral Geol.*, 16, 1-11.
- THORPE T.A. et D.D. MEIER, 1973. - Effects of gibberellic acid and abscissic acid on shoot formation in Tobacco callus cultures. *Physiol. Plant.*, 29, 121-124.
- THORPE T.A. et Th. GASPAR, 1978. - Changes in isoperoxidases during shoot formation in Tobacco callus. *In vitro*, 14, 522-526
- THORPE T.A., M. TRAN THANH VAN et Th. GASPAR, 1978. - Isoperoxidases in epidermal layers of Tobacco and changes during organ formation *in vitro* *Physiol. Plant.*, 44, 388-394.
- TOMASEWSKI M. et K.V. THIMANN., 1966. - Interactions of phenolic acids, metallic ions and chelating agents on auxin-induced growth. *Plant Physiol.* 41, 1443-1454.
- TORRECILLAS A., LEON D., F. DEL AMOR et M.C. MARTINEZ-MOMPEAUM, 1985. - A rapid chromometric assay of peroxidase activity in citrus leaf discs. *Sci. Hortic.*, 26, 273-277.
- TRAN THANH VAN K. et H. TRINH, 1978. - Morphogenesis in thin cell layers : concepts, methodology and results. In. *Frontiers of Plant Tissue Culture*, 1978; T.A. Thorpe ed. Univ. Calgary offset Printing Services, 37-48.

- VANCE C., J. ANDERSON et R. SHERWOOD, 1976. - Soluble and cell wall peroxidases in Reed canarygrass in relation to disease resistance and localized lignin formation. *Plant Physiol.*, 57, 920-922.
- VAN DUIJN P., 1955. - An improved histochemical benzidine-blue peroxidase method and a note on the composition of the blue reaction product. *Rec. Trav. Chim.*, 74, 771-778.
- VAN FLEET D.S., 1959. - Analysis of the histochemical localization of peroxydase related to the differentiation of plant tissues. *Canad. J. of Bot.*, 37, 449-458.
- VAN HOOFF P. et Th. GASPAR, 1976. - Peroxidase and isoperoxidase changes in relation to root initiation of *Asparagus* cultured *in vitro*. *Sci. Horticult.*, 4, 27-31.
- VAN HUUSTEE R.B., 1977. - Porphyrin and peroxidase synthesis in cultured peanut cells. *Can. J. Bot.*, 55, 1340-1344.
- VAN HUUSTEE R.B., 1986. - Biosynthesis of peroxydase, a hemo-as well as a glycoprotein. In: H. GREPPIN, C. PENEL, Th. GASPAR Eds. *Molecular and Physiological aspects of Plant Peroxidases* Université de Genève, 125-129.
- VAN HUUSTEE R.B. et G. TURGON, 1973. - Rapid release of peroxidase by peanut cells in suspension culture. *Can. J. Bot.*, 51, 1169-1175.
- VARDJAN M. et J.P. NITSCH, 1961. - La régénération chez *Cichorium endivia* L. : étude des auxines et des kinétines endogènes. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 108, 363-374.
- VASSEUR J., 1965. - Sur les conditions de culture *in vitro* des tissus de feuilles d'endive. *Bull. Soc. Bot. Nord Fr.*, 18, 205-212.
- VASSEUR J., 1979. - Etude du bourgeonnement de fragments de feuilles étiolées d'endive (*Cichorium intybus* L.) en fonction des caractéristiques physiologiques et biochimiques. Thèse Lille et *Rev. Gen. Bot.*, 86, 35-110 et 113-190.

- VASSEUR J. et B. LEGRAND, 1972. - Répartition de 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., R. LEFEBVRE et E. BACKOULA, 1986. - Sur la variabilité de la capacité rhizogène d'explantats racinaires de *Cichorium intybus* (var. Witloof) cultivés *in vitro* : influence de la dimension des explantats initiaux et de la durée de conservation des racines au froid. Can. J. Bot., 64 (1) : 242-246.
- VASSEUR J. et ROGER V., 1983. - Synthèses d'acides nucléiques et de protéines au cours de l'initiation de bourgeons adventifs sur des explantats de *Cichorium intybus* L. cultivés *in vitro*. Physiol. Plant., 57, 485-491.
- VENVERLOO G., 1976. - The formation of adventitious organs. III. A comparison of root and shoot formation on Nautilocalyx explants. Z. Pflanzenphysiol., 80: 310-322.
- VON ARNOL S. et R. GRONNROOS, 1986. - Anatomical changes and peroxidase activity after cytokinin treatments inducing adventitious bud formation on embryos of *Picea abies*. Bot. Gaz., 147, 425-431.
- WALLACE J.M., 1957. - The influence of high nutrient-levels of Co, Cu and Mn on leaf catalase and root peroxidase activity in soybean plants grown with different levels of iron. Dissert. Abst., 17, 2398.
- WARDLAW C.W., 1968. - Morphogenesis in plants. Methuen London.
- WARDROP A.B. et D.E. BLAND, 1958. - The process of lignification in woody plants. In. Proc. 4th Int. Congr. Biochem. Vienna, Vol. 2, Ed Kratzl et Billel, 92-116.
- WARFIELD D., R. NILAN et R. WITTERS, 1975. - The effect of ethylene and ionizing radiation of Saint Paulia peroxidase activity. Radiat. Bot., 15, 423-429.

- WARMKE H.E. et G.L. WARMKE, 1950, The role of auxin in the differentiation of root and shoot primordia from root cuttings of *Taraxacum* and *Cichorium*. *Am. J. Bot.*, 37, 272-280.
- WEISS J.S. et M. JAFFE, 1969. - Photoenhancement by blue light organogenesis in Tobacco pith cultures. *Physiol. Plant*, 22, 171-176.
- WELINDER K.G., 1979. - Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. Amino acid carboxyl termini, cyanogen bromide and tryptic fragments the complete sequence and some structural characteristics of horseradish peroxidase. *C. Eur. J. Biochem.*, 96, 483-502.
- WELINDER K.G., 1985. - Plant peroxidases. Their primary, secondary and tertiary structures and relation to cytochrome c peroxidase. *Eur. J. Biochem.*, 151, 497-504.
- WHITMORE F.W., 1971. - Effect of indoleacetic acid and hydroxyprolin peroxidase in Wheat Coleoptiles. *Plant Physiol.*, 47, 169-171.
- WILLSTATER R. et A. STOLL. 1918. - Ueber peroxidase. *Liebig's Ann. der Chem.*, 416, 21-64.
- WISE B. et M. MORRISON, 1971. - Localisation of isozyme forms of peroxidase in the cotton plant. *Phytochemistry*, 10, 2355-2359.
- YAMAZAKI I., K. YOKOTA et R. NAKAJIMA, 1965. - A mechanism and model of peroxidase-oxidase reaction. In: T.E. KING, H.S. MASON and M. MORRISON, eds., *oxidases and related Redox Systems Vol. 1*; John Wiley et SONS, New York, 485-513.
- YANG S.F., 1967. - Biosynthesis of ethylene : ethylene formation from methional. *Arch. Biochem. Biophys.*, 122, 481-487.
- YANG S.F., 1968. - Biosynthesis of ethylene. In: *Biochemistry and Physiology of plant growth substances*. WIGHTMAN and G. SETTERFIELD Eds., Runge Press, Ottawa, 1217-1228.
- YANG S.F., H.E. KU et H.K. PRATT, 1967. - Photochemical production of ethylene from methionine and its analogues in the presence of flavin mononucleotide. *J. Biol. Chem.*, 242, 5274-5280.

YANG S.F. et N.E. HOFFMAN, 1984. - Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 35, 155-189.

YOKOTA K. et I. YAMAZAKI, 1965. - Reaction of peroxidase with reduced nicotinamide-adenine dinucleotide and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate. *Biochem. Biophys. Acta*, 105, 301-312.

ZUCKER M., 1963. - The influence of light on synthesis of protein and chlorogenic acid in potato tuber tissue. *Plant Physiol.*, 66, 281-285.

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION.....	1
HISTORIQUE.....	4
I - LE BOURGEONNEMENT.....	5
II - LES PEROXYDASES.....	6
La dégradation de l'acide indolyl acétique.....	12
La biosynthèse de l'éthylène.....	15
Le processus de lignification.....	16
MATERIEL ET TECHNIQUES.....	23
I - LE MATERIEL VEGETAL.....	24
II - LA CULTURE IN VITRO.....	24
II.1. - La mise en culture.....	24
II.2. - Conditions expérimentales.....	25
III - CRITERES DE CROISSANCE ET ÉVALUATION DU BOURGEONNEMENT.....	26
IV - TECHNIQUES D'ANALYSES.....	27
IV.1. - Analyse des protéines et dosage de l'azote.....	27
IV.1.1.-- Extraction et dosage des protéines.....	28
IV.1.2. - Dosage de l'azote.....	29
IV.2. - Mesures des activités enzymatiques.....	30
IV.2.1. - Extraction des enzymes.....	30
IV.2.2. - Mesure de l'activité peroxyda- sique.....	31
IV.2.3. - Electrophorèse pour la sépara- tion des isoperoxydases.....	32
IV.2.4. - Mesure de l'activité auxine- oxydasique.....	36
IV.2.5. - Mesure de l'activité catalasi- que.....	37

	Page
IV.3. - Dosage et analyse qualitative des phénols.....	37
IV.3.1. - Extraction des composés phénoliques.....	37
IV.3.2. - Chromatographie et dosage.....	38
IV.4. - Dosage des pigments chlorophylliens...	39
RESULTATS.....	40
<i>ANALYSE PREALABLE DU MATERIEL VEGETAL ET ADAPTATION DES TECHNIQUES.....</i>	41
I - CRITERES BIOCHIMIQUES EN FONCTION DU LIEU DE PRELEVEMENT DES TISSUS.....	43
I.1. - Le lieu de prélèvement des tissus.....	43
I.2. - Matière fraîche, Matière sèche et Azote protéique.....	44
I.3. - Activités enzymatiques.....	45
I.3.1. - Mise au point technique.....	45
I.3.2. - Activités enzymatiques selon le lieu de prélèvement.....	46
II - LA COMPARTIMENTATION DES PEROXYDASES.....	47
II.1. - Les peroxydases solubles et liées ioniquement.....	48
II.2. - Les peroxydases liées de façon covalente.....	52
II.3. - Proportions relatives des peroxydases des différentes fractions.....	54
III - LES ISOPEROXYDASES.....	56
III.1. - Les isoperoxydases des différentes fractions.....	56
III.2. - Rôle du NaCl dans la migration des isoperoxydases.....	58
IV - LES COMPOSES PHENOLIQUES.....	61
V - DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	62
<i>RELATIONS ENTRE LE BOURGEONNEMENT ET LES PEROXYDASES.</i>	66
A - ETAPES HISTOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DU DEVELOPPEMENT "IN VITRO" DES TISSUS DE FEUILLE ETIOLÉE.....	67
B - ACTION DES FACTEURS PHYSIQUES SUR LE BOURGEONNEMENT ET SUR L'ACTIVITÉ PEROXYDASIQUE.....	73

	Page
I - ACTION DE LA TEMPERATURE.....	75
I.1. - Cinétique d'apparition des cals et des bourgeons.....	75
I.2. - Variations du poids de M.F., M.S. et % en eau.....	77
I.3. - Influence sur la formation des bourgeons	77
I.4. - Influence sur l'activité peroxydasique..	78
II - ACTION DE LA LUMIERE.....	79
II.1. - Influence de l'intensité de l'éclaircissement.....	79
II.2. - Influence de photopériodes variées.....	80
II.2.1. - Sur la néoformation des bourgeons.....	80
II.2.2. - Sur l'activité peroxydasique...	83
II.2.2.1. - Mise au point technique...	83
II.2.2.2. - Evolution des activités peroxydasiques de tissus maintenus à l'obscurité, éclairés continuellement ou douze heures par jour..	84
II.2.2.3. - Activités peroxydasiques et isoperoxydasiques des fractions E1, E2 et E3....	88
II.2.2.4. - Activités peroxydasiques et isoperoxydases dans les néoformations et dans les tissus primaires après 40 jours de culture.....	90
II.3. - Influence de la durée d'éclaircissement....	93
II.3.1. - Action d'hémériopériodes ou de nyctipériodes de durée variable.....	93
II.3.2. - Influence du moment d'application de périodes lumineuses ou obscures d'égale durée.....	96
II.3.2.1. - Influence sur la croissance.....	96
II.3.2.2. - Influence sur la néoformation des bourgeons.....	97
II.3.2.3. - Influence sur l'activité peroxydasique.....	99
II.4. - Influence de la qualité de la lumière..	101
II.4.1. - Variations du poids de matière sèche.....	103
II.4.2. - Influence sur la néoformation des bourgeons.....	103
II.4.3. - Influence sur l'activité peroxydasique.....	105

	Page
III - CONCLUSIONS.....	105
C - ACTION DES FACTEURS CHIMIQUES SUR LE BOURGEON- NEMENT ET SUR L'ACTIVITÉ PEROXYDASIQUE.....	107
I - ROLE DU FER.....	109
I.1. - Action de l'acide éthylène diamine tétra- acétique disodique (EDTA).....	109
I.1.1. - Influence sur la néoformation des bourgeons.....	109
I.1.2. - Influence sur l'activité peroxy- dasique.....	110
I.2. - Action des sels de fer.....	111
I.2.1. - Action sur le bourgeonnement.....	112
I.2.1.1. - Du sulfate ferreux.....	112
I.2.1.2. - Du chlorure ferreux.....	113
I.2.1.3. - Du chlorure ferrique.....	114
I.2.2. - Action sur la teneur en chloro- phylle.....	114
I.2.3. - Action sur l'activité peroxyda- sique.....	116
I.3. - Apports de fer pendant des périodes de courte durée.....	116
II - ROLE DE L'ACIDE Δ-AMINOLÉVULINIQUE ET DE L'ACIDE LEVULINIQUE.....	120
II.1. - Action sur la néoformation des bour- geons.....	120
II.1.1. - Action de l'acide Δ-aminolévuli- nique.....	120
II.1.2. - Action conjuguée de l'ALA et du Fer.....	122
II.1.3. - Action de l'acide lévulinique...	122
II.2. - Action sur l'activité peroxydasique....	123
III - ACTION DES RÉGULATEURS DE CROISSANCE.....	126
III.1. - Action sur la néoformation des bour- geons.....	126
III.1.1. - Action conjuguée de la kinétine et du fer.....	126
III.1.2. - Action conjuguée de l'acide indolylacétique et du fer.....	127
III.1.3. - Action de l'éthylène.....	128
III.2. - Action sur l'activité peroxydasique...	129
III.2.1. - Action de la kinétine et de l'a- cide indolylacétique.....	129
III.2.2. - Action de l'éthylène.....	131

IV - CONCLUSIONS.....	135
<i>RELATIONS ENTRE ACTIVITE PEROXYDASIQUE ET TENEUR EN COMPOSES PHENOLIQUES.....</i>	137
I - RECHERCHE D'EFFECTEURS.....	138
II - TAMISAGE MOLECULAIRE.....	140
II.1. - Fractionnement d'un extrait brut.....	140
II.2. - Séparation des inhibiteurs.....	142
III - ACTION "IN VITRO" DES ACIDES CHLOROGENIQUES ET CAFEIQUES SUR L'OXYDATION DU GAIACOL PAR UNE PEROXYDASE PURIFIÉE (HRP).....	144
IV - VARIATIONS DE LA TENEUR EN PHENOLS TOTAUX.....	146
IV.1. - Influence des conditions d'éclairement....	146
IV.2. - Influence de la qualité de la lumière.....	149
IV.3. - Influence de l'éthylène.....	153
IV.4. - Influence du glucose.....	155
IV.4.1. - Influence sur la croissance des explantats et sur le nombre de bourgeons néoformés.....	155
IV.4.2. - Influence sur l'activité peroxydasique et sur la teneur en phénols totaux...	158
V - L'ELECTROFOCALISATION.....	160
VI - CONCLUSIONS.....	161
CONSIDERATIONS GENERALES ET CONCLUSION.....	163
BIBLIOGRAPHIE.....	185

RESUME

Les variations de l'activité peroxydasique (AP) et de l'équipement isoperoxydasique ont été analysées au cours du bourgeonnement des tissus de *Cichorium intybus* cultivés *in vitro*.

L'évolution de l'AP qui se traduit par une augmentation suivie d'un palier est caractéristique du processus de bourgeonnement ; par contre, aucune isoperoxydase ne peut servir de marqueur biochimique du phénomène.

Toute stimulation de l'AP par des facteurs tels que l'obscurité, les radiations vertes, le fer, la kinétine ou l'éthylène, durant les six premiers jours de culture, c'est-à-dire pendant l'initiation des nodules méristématiques, est suivie d'une augmentation du nombre de bourgeons formés. Au contraire, une diminution de l'AP par la lumière, les radiations bleues, l'EDTA ou le glucose entraîne une baisse du bourgeonnement. Les modifications précoces de l'AP sont donc corrélatives des capacités néoformatrices de bourgeons de tissus.

Les variations rapides de l'AP paraissent davantage liées à l'activation d'enzymes constitutives qu'à une synthèse *de novo* des peroxydases. Dans les extraits bruts existent des inhibiteurs de l'AP, ils sont de nature phénolique et ont été identifiés aux acides chlorogénique et caféique, composés bien représentés dans les tissus de *Cichorium intybus*. Ces substances phénoliques endogènes pourraient réguler l'AP dans les tissus. Cette hypothèse se vérifie par exemple lors du passage des explantats de la lumière à l'obscurité qui provoque une diminution de la teneur en phénols concomitante d'une augmentation de l'AP, inversement le passage de l'obscurité à la lumière entraîne les effets contraires. Il existe donc une relation inverse entre niveau d'AP et teneur en composés phénoliques des tissus.

Une relation est établie entre les peroxydases dont l'activité serait régulée par les composés phénoliques endogènes, et les capacités néoformatrices de bourgeons des tissus de *Cichorium intybus*. L'augmentation indirecte de l'AP, consécutive à la diminution de la teneur en phénols, conditionne un catabolisme auxinique accentué d'où un niveau auxinique endogène abaissé et par conséquent un rapport auxine/cytokinine favorable au bourgeonnement.



SUMMARY

Peroxidases were investigated to study the biochemical modifications occurring during vegetative bud formation from tissues of *Cichorium intybus* cultured *in vitro*.

The evolution of peroxidase activity (PA) showing an increase followed by a plateau is characteristic of the bud forming process, but the isoperoxidase pattern cannot be considered as a biochemical marker of vegetative bud differentiation.

Stimulation of PA by stimuli such as darkness, green radiations, iron, kinetin or ethylene, i.e during the six first days of culture, during meristematic nodules initiation, is followed by an enhancement of the number of buds formed. On the contrary, if PA is decreased by light, blue radiations, EDTA or glucose, the formation of buds is diminished. Thus the early influence of the treatment on PA induces nodulation in the bud forming capacities of tissues.

The rapid increase of PA does not seem to result from *de novo* protein synthesis but from activation of preexisting enzymes. Inhibitors of PA are found in crude extracts. They are phenolic compounds and are identified as chlorogenic and caffeic acids which are well represented in *Cichorium intybus* tissues. These endogenous substances can regulate the PA in tissues. This hypothesis is checked for example by transfers of explants from light to darkness which provoke a decrease of the phenolic content and at the same time an increase of PA, inversely transfers from darkness to light cause opposite effects. There is an inverse relationship between level of PA and amount of phenolic compounds in tissues.

A relationship between peroxidases, activity of which would be regulated by endogenous phenolic is draw up. Indirect increase of PA, bounded to a decrease of phenolic content, enhances the auxinic catabolism thus diminishes the endogenous auxin level leading to an auxin/cytokinin ratio favourable to bud formation.