

50376  
1993  
354

50376  
1993  
354

N° d'ordre : 1218

# THESE

présentée à

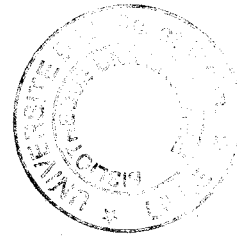
L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par

**Abdelhamid BOUAZZA**



**ETUDE DES ACTIVITES PEROXYDASIQUE ET AUXINE-OXYDASIQUE  
AU COURS DE LA MORPHOGENESE DE TISSUS DE RACINE DE  
*CICHORIUM INTYBUS* L. CULTIVES *IN VITRO*.**

**Soutenue le 16 Décembre 1993 devant la Commission d'Examen:**

M. S. RAMBOUR  
Me. R. GOLDBERG  
M. Th. GASPARD  
M. B. LEGRAND

Professeur, Université de Lille I.....Président  
Professeur, Université Paris VI.....Rapporteur  
Professeur, Université de Liège (Belgique)....Rapporteur  
Maître de conférences, Université de Lille I.....Examinateur

## AVANT PROPOS

Cette étude a été réalisée au laboratoire de Physiologie et Biologie Moléculaire Végétales sous la direction du Professeur S. RAMBOUR à qui j'adresse ma profonde gratitude de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je lui sais gré des conseils qu'il m'a portés au cours de la rédaction de ce mémoire.

Je tiens à remercier particulièrement Monsieur B. LEGRAND qui n'a jamais manqué de me prodiguer conseils et encouragements. Ses critiques et ses suggestions ont largement contribué à la réalisation de ce travail et à la mise au point définitive du texte de ce manuscrit. Je le prie de bien vouloir trouver ici le témoignage de ma reconnaissance la plus sincère.

Je suis particulièrement sensible à l'honneur que m'a fait Monsieur le Professeur Th. GASPARD (Université de Liège), qui malgré ses innombrables charges, a accepté de juger mon travail, ainsi qu'à Madame R. GOLDBERG (Université Paris VI) pour l'intérêt qu'elle a porté à ce manuscrit. Je leur exprime ma reconnaissance d'avoir accepté d'être rapporteurs.

J'adresse mes plus vifs remerciements à mon frère Abdelghani pour ses encouragements et son soutien et à tous les amis qui ont su me soutenir et m'encourager pour aboutir au terme de cette thèse.

Enfin, je ne saurais oublier le climat dans lequel j'ai pu effectuer mes travaux. Que tout les chercheurs, étudiants et personnel technique du laboratoire soient assurés de mes remerciements pour l'aide qu'ils m'ont apportée à un moment ou à un autre.

## SOMMAIRE

---

INTRODUCTION.....	1
Chapitre 1 : <i>HISTORIQUE</i> .....	3
<b>I- PRESENTATION DE LA PEROXYDASE.....</b>	<b>3</b>
<b>II- REACTION DE PEROXYDATION.....</b>	<b>6</b>
<b>III. COMPARTIMENTATION.....</b>	<b>8</b>
3.1. Choix du donneur d'électrons au cours des études ..... cytologiques et biochimiques .....	8
3.2. Localisation.....	9
<b>IV- PRINCIPAUX ROLES PHYSIOLOGIQUES .....</b>	<b>11</b>
4.1. Différenciation .....	11
4.2. Catabolisme auxinique.....	14
4.3. Biosynthèse de l'éthylène.....	17
4.4. Lignification.....	17
Chapitre 2 : <i>MATERIEL ET METHODES</i> .....	20
<b>I. MATERIEL VEGETAL .....</b>	<b>20</b>
<b>II- LA CULTURE IN VITRO .....</b>	<b>20</b>
2.1. Aseptisation du matériel.....	20
2.2. Mise en culture.....	20
2.3. Conditions de culture.....	21
<b>III- TECHNIQUES D'ANALYSE .....</b>	<b>21</b>
3.1. Extraction des protéines.....	21
3.2. Extraction des peroxydases.....	22
3.3. Mesure des activités enzymatiques.....	23
3.3.1. Mesure de l'activité peroxydasique: (AP) .....	23
3.3.2. Séparation des isoenzymes par électrophorèse.....	24
3.4. Mesure de l'activité auxine-oxydasique: (AAO). .....	25

Chapitre 3 : <i>RESULTATS</i> .....	26
<b>A- MISE AU POINT DES TECHNIQUES</b> .....	26
<b>I- ACTIVITE PEROXYDASIQUE:</b> .....	26
1.1. Recherche du volume optimal d'extrait enzymatique.....	26
<b>II- ACTIVITE AUXINE-OXYDASIQUE:</b> .....	27
2.1. Recherche du volume optimal d'extrait enzymatique pour mesurer l'AAO.....	28
<b>III- DOSAGE DES PROTEINES</b> .....	29
<b>CONCLUSION</b> .....	31
<b>B- RELATION ENTRE MORPHOGENESE ET PROFILS PEROXYDASIQUES ET ISOPEROXYDASIQUES</b> .....	32
<b>I- MORPHOGENESE ET CROISSANCE</b> .....	33
1.1. Développement des explantats .....	33
1.2. Action sur la croissance.....	33
1.2.1. Matière fraîche .....	33
1.2.2. Matière sèche.....	34
1.2.3. Teneur en protéines .....	35
<b>II- ACTIVITE ET PROFILS PEROXYDASIQUES</b> .....	36
2.1. Cinétiques d'activités peroxydasiques .....	36
2.2. Les profils isoperoxydasiques .....	37
<b>CONCLUSION</b> .....	39
<b>C- INFLUENCE DU GLUCOSE ET DES REGULATEURS DE CROISSANCE SUR LE DEVENIR DE LA MORPHOGENESE ET DES PROFILS PEROXYDASIQUES ET ISOPEROXYDASIQUES</b> .....	41
<b>I- LE GLUCOSE</b> .....	41
1.1. Influence de la concentration en glucose sur le bourgeonnement.....	41
1.2. Action du glucose sur la cinétique de l'AP .....	42
1.3. Influence du glucose sur l'activité des peroxydases solubles (E1), liées ioniquement (E2), et de façon covalente (E3).....	43

1.3.1. Activité peroxydasique des fractions E1, E2 et E3	44
1.3.2. Les isoperoxydases des différentes fractions	44
1.3.3. Activité auxine-oxydasique des différentes fractions	45
<b>CONCLUSION</b>	46
<b>II- INFLUENCE DES REGULATEURS DE CROISSANCE</b>	47
2.1. Influence sur l'organogenèse	47
2.2. Influence sur la croissance	47
2.2.1. Action de la kinétine	48
2.2.2. Action de l'acide gibbérellique (AG <sub>3</sub> )	48
2.2.3. Action de l'acide naphthyl-acétique (ANA)	48
2.3. Influence sur l'activité peroxydasique et sur les profils isoperoxydasiques	49
2.3.1. Action de la kinétine	49
2.3.2. Action de l'acide gibbérellique (AG <sub>3</sub> )	51
2.3.3. Action de l'ANA	53
2.4. Intéraction kinétine-gibbérelline et/ou auxine	55
2.4.1. Action sur l'organogenèse	55
2.4.2. Action sur l'activité peroxydasique	55
2.4.3. Action sur les profil isoperoxydasiques	56
<b>CONCLUSION</b>	57
<b>III- CAS PARTICULIER DES CYTOKININES</b>	58
3.1. Action sur la néoformation des bourgeons	58
3.2. Action sur l'activité peroxydasique	60
3.3. Action sur les profils isoperoxydasiques	61
<b>CONCLUSION</b>	62
<b>D- ENRACINEMENT DES BOURGEONS</b>	63
<b>I- Effet de la taille des bourgeons sur la néoformation de racines</b>	63
<b>II- Effet de certaines substances réputées rhizogènes sur la formation de racines.</b>	64
<b>III- Effet du prétraitement des bourgeons à l'obscurité sur la néoformation de racines.</b>	67

3.1. Effet sur le pourcentage d'enracinement .....	68
3.2. Effet sur l'activité peroxydasique .....	68
3.3. Effet sur les profils isoperoxydasiques.....	69
<b>IV- Action de la nyctipériode de durées variables sur</b>	
<b>l'enracinement des bourgeons chlorophylliens.....</b>	<b>70</b>
4.1 Effet sur le pourcentage d'enracinement .....	70
4-2 Effet sur l'activité peroxydasique .....	71
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>73</b>

<b>Chapitre 4 : DISCUSSION.....</b>	<b>75</b>
-------------------------------------	-----------

<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>88</b>
---------------------------------	-----------

<b>PLANCHES.....</b>	<b>90</b>
----------------------	-----------

<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>96</b>
---------------------------	-----------

<b>RESUME.....</b>	<b>124</b>
--------------------	------------

## ABREVIATIONS

---

ACC: acide carboxyl 1-aminocyclopropane  
AIA : acide indolylacétique  
AIB: acide indolylbutyrique  
AG<sub>3</sub>: acide gibbéréllique  
ANA: acide naphtylacétique  
AAO: activité auxine-oxydasique  
AP: activité peroxydasique  
APS: activité peroxydasique spécifique  
ARN: acide ribonucléique  
ATC: acide trichloroacétique  
BAP: benzylaminopurine  
CCP: cytochrome c-peroxydase  
DCP: 2,4 dichlorophénol  
EFE: enzyme formant l'éthylène  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peroxyde d'hydrogène  
HRP: "horseradish peroxidase" (peroxydase de raifort)  
2IP: 6 (γ-γ-dimethylallyl amino)-purine ou N<sup>6</sup> [2-isopentenyl] adénine  
Kin: kinétine  
MF: masse de matière fraîche  
MS: masse de matière sèche  
PAL: phénylalanine ammonia-lyase  
pI: point isoélectrique  
PVP: polyvinylpyrrolidone

Depuis plusieurs années, l'une des préoccupations majeures, de notre laboratoire, est la connaissance des modalités de la différenciation organogène de tissus végétaux cultivés *in vitro*. Etant donné que ses différents types de tissus possèdent de remarquables propriétés organogènes, le matériel choisi est *Cichorium intybus* L. ou chicorée de Bruxelles. Nous le considérons comme un modèle adéquat pour l'étude fondamentale de la différenciation.

Beaucoup de travaux peuvent attester de la capacité des tissus de *Cichorium intybus* à produire soit des bourgeons (LEFEBVRE, 1979) soit des racines VASSEUR et al., 1986) ou du cals (VASSEUR et SENE, 1984) *in vitro*, mais beaucoup plus rares sont ceux qui ont étudié les variations de marqueurs biochimiques au cours de cette différenciation.

L'étude des profils peroxydasiques et isoperoxydasiques nous a paru constituer la meilleure approche biochimique à entreprendre pour ce travail. En effet, par leur intervention dans le catabolisme auxinique (GASPAR et al., 1982), elles sont capables de modifier l'équilibre hormonal auxine/cytokinine qui contrôle le processus d'organogenèse (SKOOG et MILLER, 1957).

A partir de ces considérations, nous avons envisagé notre programme de recherche de la manière suivante:

Après que LEGRAND (1987) ait montré une corrélation entre activité peroxydasique et capacité de bourgeonnement des tissus de *Cichorium intybus*, il nous a paru judicieux d'élargir le domaine de recherche en analysant les variations de l'activité peroxydasique et des profils isoperoxydasiques non seulement au cours de la caulogenèse mais aussi au cours de la rhizogenèse et de la callogenèse.

- Dans un premier temps, notre but était de mesurer l'activité auxine-oxydasique d'extraits bruts obtenus à partir d'explantats racinaires de *Cichorium intybus* cultivés dans des conditions influençant le bourgeonnement et de la comparer à l'activité peroxydasique dosée dans les mêmes extraits. Cette comparaison devait nous permettre de conclure à l'intervention ou non du catabolisme auxinique dans les capacités de bourgeonnement des tissus que nous utilisons.



- Ensuite, nous avons voulu savoir si les profils cinétiques d'activités peroxydasiques et isoperoxydasiques présentaient des variations au cours de la rhizogenèse, caulogenèse et callogenèse. Ce résultat pouvant aboutir à la conclusion d'une intervention spécifique de telles variations suivant le type d'organe néoformé.

- Pour mieux cerner le problème, et sachant que le processus de différenciation est sous la dépendance du rapport auxine/cytokinine, nous avons voulu savoir quel serait l'effet de certains régulateurs de croissance sur le devenir de la morphogenèse ainsi que sur l'activité peroxydasique et les profils isoperoxydasiques.

- Enfin, nous avons cherché à trouver les facteurs physico-chimiques capables d'induire l'enracinement des bourgeons qui est une phase obligatoire pour la multiplication végétative des plantes produites *in vitro*.

Un premier chapitre de ce mémoire présente une étude bibliographique destinée à préciser les principales propriétés physico-chimiques et physiologiques des peroxydases.

Un deuxième chapitre est consacré à la présentation du matériel végétal et des méthodes expérimentales utilisées.

Nous abordons ensuite l'analyse des résultats trouvés concernant les variations des activités peroxydasique et auxine-oxydasique en relation avec la morphogenèse.

Le dernier chapitre comporte une discussion générale de l'ensemble des résultats par rapport à ceux trouvés par nos prédécesseurs.

## I- PRESENTATION DE LA PEROXYDASE

Les peroxydases sont des enzymes qui catalysent l'oxydation de nombreux donneurs d'électrons (substrats réducteurs) par le peroxyde d'hydrogène (substrat oxydant). Elles sont répertoriées, selon la nomenclature internationale, comme E.C. 1.11. 1. 7 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxydoréductase). Ces enzymes largement présentes chez les végétaux (GASPAR et al., 1982) sont parmi les plus étudiées depuis le début de l'enzymologie. Depuis, de multiples travaux ont été publiés et continuent à mériter l'attention de nombreuses équipes.

Ce sont des hémoprotéines de poids moléculaire variant entre 30000 et 45000 daltons. Il s'agit d'apoenzymes (glycoprotéines) associées à une protoporphyrine ferrique: protohématine IX (fig. 1). Celle-ci est un composé héminique qui complexe un atome de fer d'état d'oxydation +3 de l'enzyme à l'état natif appelée ferriperoxydase. Chez la peroxydase de raifort, enzyme la plus étudiée, le fer possède six positions de coordination, les quatre premières sont occupées par l'azote de la protoporphyrine, la cinquième par la glycoprotéine; la sixième est vide (DUNFORD, 1993).

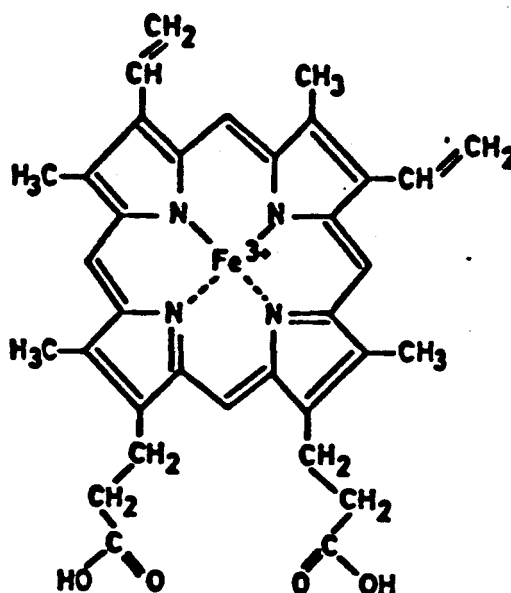
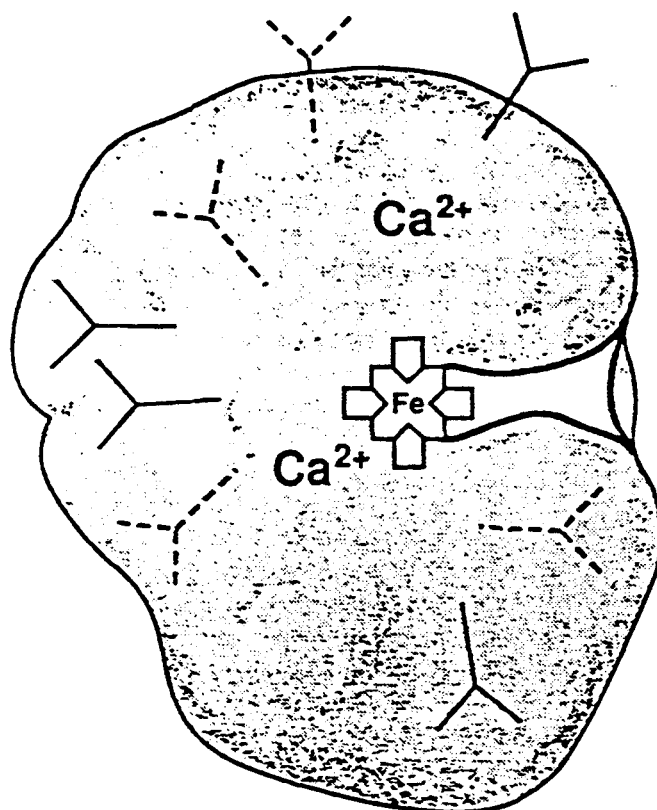


Figure 1: Structure de la protohématine IX

Les peroxydases sont généralement présentées sous différentes isoenzymes ou isoformes: les **isoperoxydases**. Si les isoenzymes sont codées par plusieurs gènes, les isoformes sont synthétisées par le même gène et peuvent subir, dans ce cas, des modifications pré- ou post-tradictionnelles. Grâce aux techniques d'électrophorèse, de

chromatographie échangeuse d'ions et d'électrofocalisation, ces isoperoxydases ont pu être séparées en deux groupes: les isoperoxydases **basiques** ou cationiques et les isoperoxydases **acides** ou anioniques. Les termes anioniques et cationiques sont liés aux mouvements des isoenzymes respectivement vers l'anode et la cathode au cours de leur séparation par un champ électrique et le nombre d'isoperoxydases dépend largement de la technique de séparation et de révélation utilisée.

TAKIO et al. (1980), en comparant la séquence complète des acides aminés de la cytochrome c-peroxydase de la levure (CCP) à celle de l'isoenzyme C de la peroxydase de Raifort (HRP C) (fig. 2) et la peroxydase du navet (TP 7), fût le premier à signaler l'homologie qui existe entre ces peroxydases végétales et la cytochrome c-peroxydase de la levure dont la structure cristalline a été établie par FINZEL et al. (1984). Depuis, les études concernant la structure tertiaire des peroxydases végétales ainsi que le mécanisme de leur réaction ont beaucoup intéressé les chercheurs. Ainsi, l'isoenzyme E<sub>5</sub> de la peroxydase de Raifort (HRP E<sub>5</sub>) est la première peroxydase végétale dont la structure tertiaire a été vraiment définie par MORITA et al. (1991). De poids moléculaire de 36000 daltons, cette isoenzyme contient 306 acides aminés, 2 glucosamines, 8 chaînes glycosidiques, une protohématine et deux ions calcium.

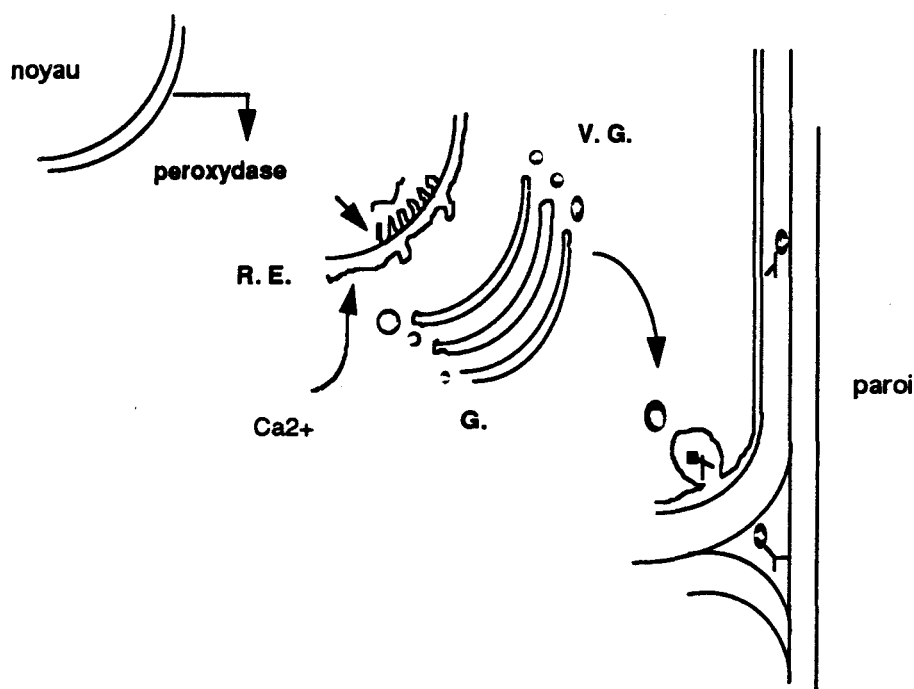


**Figure 2:** Vue schématique de la peroxydase C de raifort (HRP C). Une molécule globulaire avec un canal (une fissure) conduisant au site héminique (avec fer) qui peut être stabilisée par les ions calcium (Ca<sup>2+</sup>). Les huit chaînes glycosylées sont dispersées sur la surface (d'après VAN HUUSTEE, 1990).

Par ailleurs, les structures chimiques d'HRP E<sub>5</sub> et du CCP montrent la même configuration, ce qui a permis de les classer dans une même super famille qui contient également les peroxydases des champignons (HENRISSAT et al., 1990; TIEN et TU, 1987; WELINDER, 1991) et des bactéries (WELINDER et NORSKOV-LAURITZEN, 1986; FUJIYAMA et al., 1990; WELINDER, 1991).

Les différentes étapes de biosynthèse d'une peroxydase ont été signalées par GASPAR et al., 1982; VAN HUYSTEE, 1986. Aucune conclusion définitive n'a été apportée par les travaux concernant la synthèse de la peroxydase au niveau transcriptionnel, étant donné que la durée de vie de l'ARN messenger peut être très variable (de 1 heures 30 minutes à quelques jours).

Au cours de sa progression vers l'espace intracellulaire la synthèse de la peroxydase pourrait se faire de la manière suivante (fig. 3):



**Figure 3: Migration des peroxydases depuis leur site de synthèse jusqu'à l'espace intercellulaire. R. E. = réticulum endoplasmique, G. = appareil de Golgi, V. G. = vésicule golgienne**

La transcription se fait au niveau du nucléoplasme (stade I) puis l'ARNm se dirige vers le réticulum endoplasmique rugueux pour la traduction (stade II). A ce niveau l'hème et le calcium peuvent être ajoutés aux peptides en formation et la glycosylation peut être initiée au niveau du stade III. La glycolysation se fait dans l'appareil de Golgi (stade IV). La peroxydase mature est relâchée dans l'espace apoplastique par les vésicules de sécrétion (STAEHELIN et CHAPMAN, 1987) avant la distribution dans la paroi cellulaire et/ou l'espace intercellulaire.

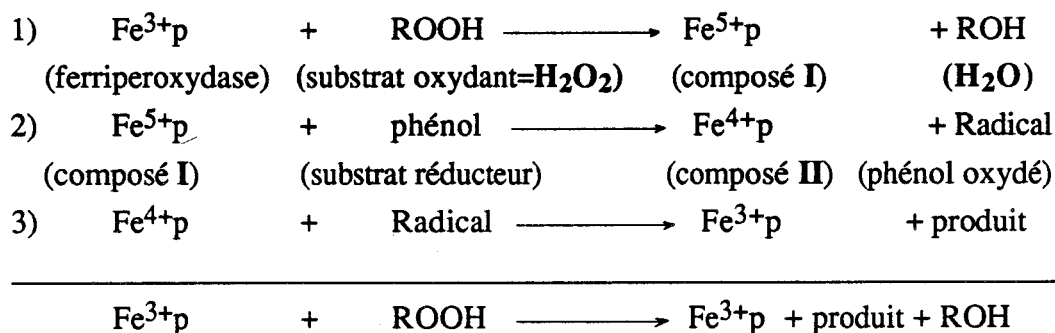
Plusieurs connections existent entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, toutefois, on peut également observer un transport direct entre les deux systèmes membranaires sans migration des vésicules (PENEL et al., 1984). Les vésicules golgiennes sont partiellement différenciées avant leur fusion avec le plasmalemma. Par cette voie, les produits de sécrétion enfermés dans les vésicules ou liés à leur membrane sont transportés vers l'extérieur de la cellule.

## II- REACTION DE PEROXYDATION

La peroxydase native ou ferriperoxydase ( $Fe^{3+p}$ ) a besoin d'une part d'un substrat (substrat oxydant), généralement un peroxyde qui en présence de l'enzyme native entraîne la formation du composé I (MORISHIMA et al., 1984; PAUL et al., 1986), d'autre part, un donneur d'électrons (substrat réducteur): un phénol serait nécessaire pour la réaction de peroxydation.

Par étude spectrométrique, il a été démontré que ce sont les modifications du niveau d'oxydation du fer qui interviennent dans la réaction. En réagissant avec les peroxydes, les peroxydases entraînent la formation de composés différents.

La réaction globale (DUNFORD, 1986) est représentée dans le schéma suivant:



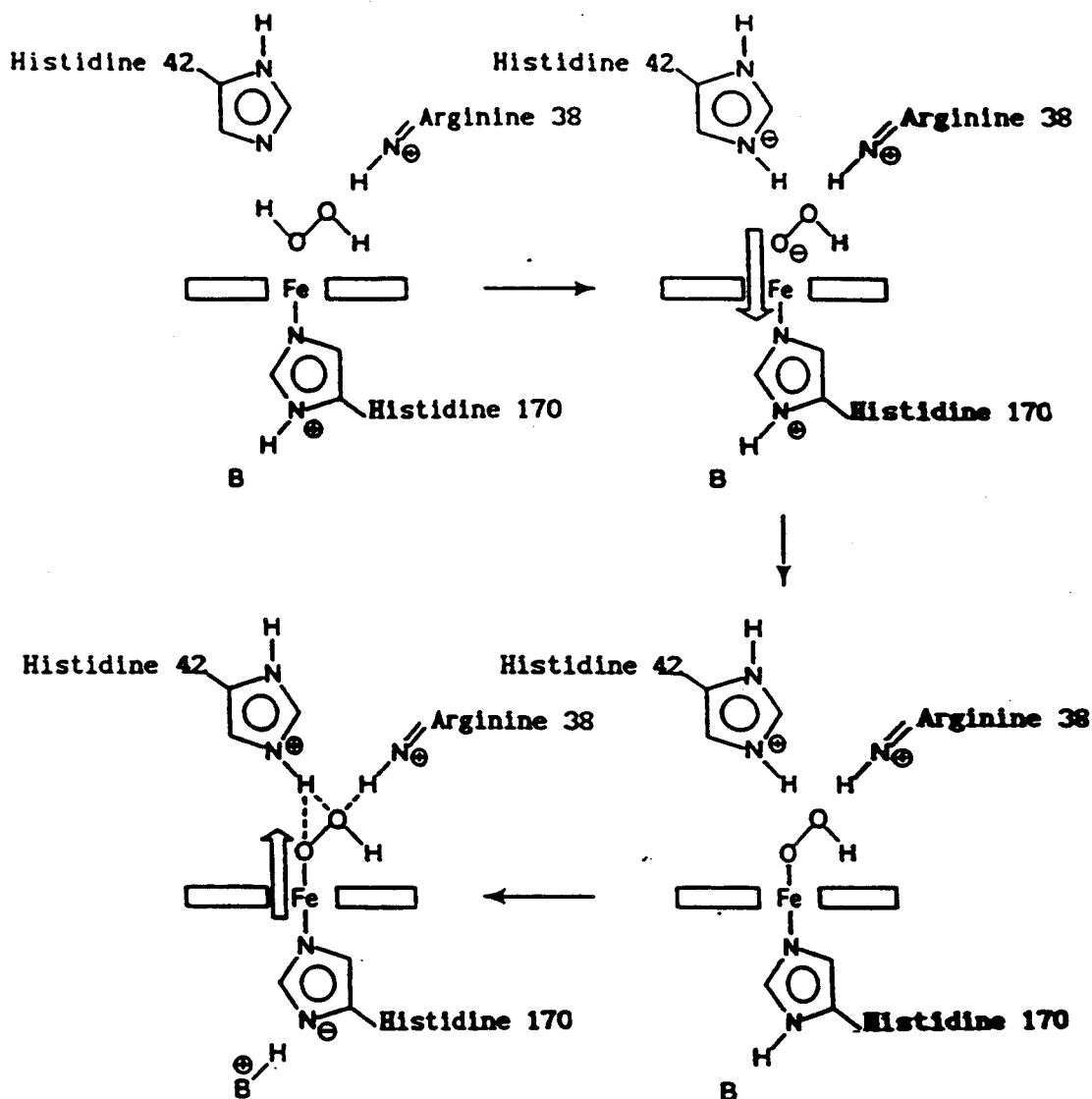
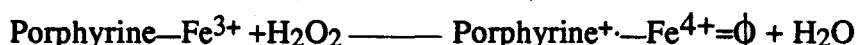


Figure 4a: Mécanisme de formation du composé I (d'après DUNFORD, 1990).

B symbolise un résidu amino-acide basique proximal, les flèches blanches représentent le flux d'électrons. La dernière étape, qui n'est pas représentée ici, est la rupture de la liaison O—O (qui est facilité par les charges positives sur les groupements distaux et la charge négative de l'histidine proximale), qui conduit à la formation de la liaison Fe=O et la libération d'une molécule d'eau.

Le peroxyde d'hydrogène réagit rapidement et de façon stoechiométrique avec la ferriperoxydase pour former un complexe enzyme substrat dont la décomposition engendre la formation du composé I et de l'eau.

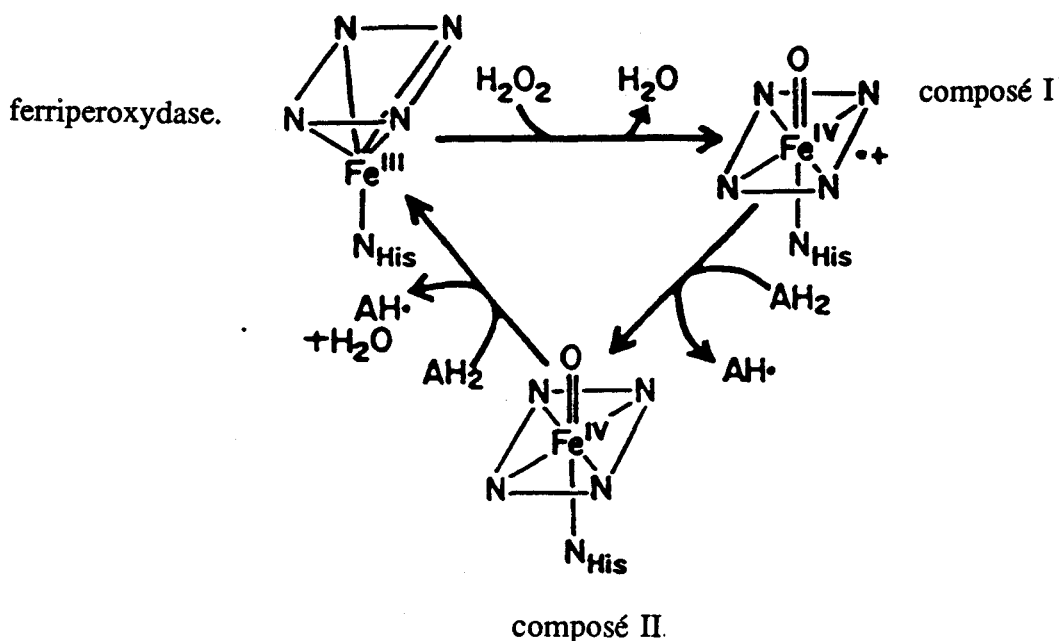
Le degré d'oxydation du fer dans le composé I formé est +4, la porphyrine se présente sous la forme d'un radical cationique (DOLPHIN et al., 1971) et la liaison fer oxygène a une structure  $Fe^{4+}=O$  (ROBERTS et HOFFMAN, 1981). La réaction de peroxydation peut donc s'écrire comme suit (DUNFORD, 1987):



Le mécanisme catalytique de formation du composé I est schématisé dans la figure 4 a (DUNFORD, 1990).

La réduction du composé I par un électron et un proton donne le composé II. MAKINO et al. (1986) et DAWSON (1988) ont montré que ce composé possède également une structure  $Fe=O$ . Le composé II est ensuite réduit par un électron et un proton pour régénérer la ferriperoxydase (réaction 3).

La figure 4 b schématise la succession des réactions 1 à 3 (DAWSON, 1988).



**Figure 4 b :** Représentation schématique du cycle catalytique de la peroxydase de la rai (d'après DAWSON, 1988).

La protoporphyrine IX est représentée sous forme d'un parallélogramme aux angles duquel se trouvent les quatre atomes d'azote qui occupent quatre des positions de coordination du fer, la cinquième est occupée par l'azote de l'histidine proximale (N<sub>His</sub>).

Généralement, les composé I et II se forment, par oxydation, en présence d'une faible quantité d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , alors qu'en présence d'un excès de peroxyde, la réaction entre le composé II et l' $\text{H}_2\text{O}_2$  entraînerait la formation du composé III (KELIN et HARTREE, 1951; GEORGE, 1953). Les deux premiers composés sont considérés comme des enzymes intermédiaires obligatoires pour la régénération de l'enzyme native qui est la ferriperoxydase. La transformation de la peroxydase passe donc par plusieurs niveaux d'oxydations et de réductions, ce qui explique la présence de plusieurs composés.

Au cours de l'oxydation de l'acide indolyl acétique, la peroxydase peut présenter d'autres états d'oxydation. En effet, la ferriperoxydase est réduite pour donner l'oxyferriperoxydase qui est le composé III. Ce dernier semble être une forme hétéromérique entre les complexes ferriperoxydase-oxygène et ferriperoxydase-anionsuperoxyde. En présence de donneurs ou d'accepteurs d'électrons, le composé III disparaît pour régénérer la ferriperoxydase:



ou



### III. COMPARTIMENTATION

#### 3.1. Choix du donneur d'électrons au cours des études cytologiques et biochimiques

Les peroxydases étant capables d'oxyder, *in vitro*, un grand nombre de donneurs d'électrons, le choix de ces derniers pour les études cytologiques et biochimiques interfère sur les résultats obtenus.

En cytologie, par exemple, la présence d'autres protéines héminiques (catalase, phénol-oxydase, cytochrome c) peut conduire à l'oxydation des donneurs d'électrons. Les plus couramment utilisés sont la diaminobenzidine, paraphénylenediamine pyrocatechol, la tetraméthylbenzidine (IMBERT ' et al., 1984). Plus récemment, la syringaldazine permet de mettre en évidence une syringaldazine peroxydase, notamment au niveau des parois cellulaires qui se lignifient. Cette syringaldazine peroxydase acceptant par ailleurs comme co-substrat le syringol, l'acide ferulique et synapique ( GOLDBERG et al., 1991).



Par ailleurs, il semble bien que l'affinité pour le donneur d'électrons peut varier selon le tissu considéré ou le stade de développement (FERRER et al., 1990).

Ces différences se traduisent aussi au cours des études biochimiques et notamment lors de la révélation des gels d'électrophorèse. Le nombre d'isoperoxydases étant dépendant, d'une part de la technique utilisée: gel d'amidon, de polyacrylamide et d'isofocalisation et d'autre part du co-substrat retenu comme révélateur de l'expression des isoperoxydases. Ce qui laisse supposer qu'*in vivo*, certaines isoperoxydases pourraient avoir des fonctions bien définies et spécifiques, par exemple les cationiques interviennent dans le catabolisme auxinique (HAZELL et MURRAY, 1982) et les anioniques dans la biosynthèse de la lignine (BOYER et al., 1983; GASPAR, 1986), alors qu'*in vitro*, elles perdent cette spécificité (GRISON et PILET, 1985; ROS BARCELO et al., 1987; PANG et al., 1989; FORCHETTI et TIGIER, 1990).

### 3.2. Localisation

Grâce aux études histologiques, l'activité peroxydasique a pu être localisée. Les peroxydases sont généralement présentes dans tous les tissus des plantes, mais en général, chaque tissu ou organe possède une composition isoperoxydasique propre (SCANDALIOS, 1974). La localisation cellulaire des peroxydases est sujette à controverses liées aux méthodes d'études utilisées (GASPAR et al., 1982).

Toutefois, en plus de la parois cellulaires, (RIDGE et OSBORNE, 1970; MEUDT et STECHER, 1972; DARIMONT et al., 1973; PARISH, 1975; PENEL et GREPPIN, 1979; CATESSON (1980); CATESSON et al., 1986; ROS BARCELOT et al., 1988; HU et al., 1989; PERREY et al., 1989; HENDRIKS et VAN LOON, 1990; MADER, 1992), l'activité peroxydasique a été également localisée dans vacuoles (HALL et SIXTON, 1972; PARISH, 1975; GROB et MATILE, 1980; GASPAR et al., 1982; MADER et WALTER., 1986; SCHLOSS et al., 1987; PERREY et al., 1989). A l'intérieur de la cellule, les peroxydases se trouvent également dans les dictyosomes (GASPAR et al., 1982; GRIFFING et FOWKE, 1985) les vésicules golgiennes (GASPAR et al., 1982; GRIFFING et FOWKE, 1985, CATESSON et al., 1986, CHIBBAR et VAN H'JYSTEE, 1986; FERRER et al., 1991) et le réticulum endoplasmique (GASPAR et al., 1982; CATESSON et al., 1986; FERRER et al., 1991). Les chloroplastes, par contre peuvent contenir d'autres peroxydases qui utilisent l'acide ascorbique comme donneur d'électrons (NAKANO et ASADA, 1980; 1981; 1987; GILLHAM et DODGE, 1986; CHEN et ASADA, 1989).

Au cours de l'extraction, les différentes isoperoxydases acides ou basiques peuvent s'associer, par des forces électrostatiques, à des composés cellulaires différents. En effet, les peroxydases basiques sont généralement localisées dans les vacuoles (SCHLOSS et al., 1987; PERREY et al., 1989; MADER, 1992). Toutefois, des isoperoxydases basiques associées à la paroi ont été mise en évidence par SCHLOSS et al. (1987), HU et al. (1989), McDOUGALL et al (1992). Les peroxydases acides sont liées à la paroi (MADER et al., 1980; GOLDBERG et al., 1983, IMBERTY et al., 1985; DE JAEGHER et al., 1985; CATESSON et al., 1986; PERREY et al., 1989, LAGRIMINI et al., 1990; MOHAN et KOLATTUBUDY, 1990; FERRER et al., 1991; MADER, 1992).

D'un point de vue technique, les peroxydases ont été classées en différents groupes suivant leur degré de liaison avec les éléments cellulaires. Ainsi on peut distinguer:

**1- des peroxydases solubles regroupant :**

□ les peroxydases pariétales libres mises en évidence par (ABELES et LEATHER, 1971; RATHMEL et SEQUEIRA, 1974; CASTILLO et al., 1984). Elles sont recueillies par infiltration sous vide d'eau ou de solution tamponnées dans les tissus puis centrifugation des tissus sans broyage préalable.

□ les peroxydases protoplasmiques extraites après broyage des tissus dans une solution tamponnée à faible force ionique.

**2- les peroxydases liées ioniquement aux membranes et aux parois** qui sont extraites par un tampon de force ionique plus élevée.

**3- les peroxydases liées de façon covalente.** Celles-ci sont pariétales (RIDGE et OSBORNE, 1971) et ne sont libérées que par digestion enzymatique de la paroi.

## IV- PRINCIPAUX ROLES PHYSIOLOGIQUES

Les peroxydases ont la particularité de catalyser *in vitro* un grand nombre de réactions (GASPAR et al., 1982). Chaque réaction peroxydasique aurait un rôle spécifique dans le maintien ou l'adaptation des structures et des fonctions des cellules végétales dans leur environnement. Globalement, des travaux récents ont montré l'implication des peroxydases dans de nombreux niveaux du développement des plantes: croissance et différenciation, floraison, pollinisation et mécanismes d'adaptation au stress (GREPPIN et al., 1986). Leurs interventions dans la régulation des teneurs d'auxine (acide indole-3-acétique), l'éventuel contrôle de la dernière étape de la biosynthèse d'éthylène, la participation dans les réactions rédox de la membrane plasmique et dans la formation d'eau oxygénée et enfin la construction, la rigidité et la lignification ou subérisation des parois végétales, sont également le plus souvent citées.

### 4.1. Peroxydases et différenciation

Les peroxydases sont, depuis plusieurs années, considérées comme des enzymes impliquées dans le processus de différenciation des tissus végétaux et peuvent être utilisées comme indicateurs précoces voire comme marqueurs biochimiques au cours de l'organogenèse. En effet, les peroxydases peuvent avoir un rôle physiologique durant le processus de différenciation selon deux voies suivantes:

- 1) la régulation de la teneur endogène d'auxine pendant les périodes précoces de différenciation.
- 2) la lignification durant les dernières étapes.

Au cours de l'**enracinement**, des fluctuations significatives de l'activité peroxydasique ont été notées chez *Prunus* (SCHELL et al., 1973; QUOIRIN et al., 1974), *Asparagus* (VAN HOOFF et GASPAR, 1976), *Nicotiana* (GASPAR et al., 1977 b; THORPE et al., 1978), *Pinus* (GASPAR et al., 1977 a), *Malus* (DRUART et al., 1982), *Cynara* (MONCOUSIN, 1982; MONCOUSIN et GASPAR, 1983), *Vitis* (MONCOUSIN, 1986, a, b; 1987), *Populus* (BHATTACHARYA et al., 1975; PYTHOULD et BUCHALA, 1989) et au cours de la néoformation de racines chez *Cichorium intybus* (BOUAZZA et al., 1993).

Parfois, l'analyse de ces fluctuations a été couplée à une analyse des variations du profil isoenzymatique (GASPAR et al., 1975; BHATTACHARYA et al., 1978; MONCOUSIN, 1982; MONCOUSIN et GASPAR, 1983). Une évolution distincte des peroxydases anioniques et des peroxydases cationiques au cours de l'enracinement a été

observée. Ainsi GASPAR (1981), GASPAR et al. (1982), MONCOUSIN et GASPAR (1983) et MONCOUSIN (1987) ont pu séparer le processus d'enracinement en deux phases: une phase d'induction, durant laquelle l'activité peroxydasique atteint un maximum, et une phase d'initiation, durant laquelle l'activité peroxydasique décroît. L'émergence des racines coïncide toujours avec la diminution de l'activité peroxydasique due surtout à la diminution des peroxydases cationiques; c'est pourquoi les auteurs qualifient les peroxydases de marqueurs biochimiques de la formation de racines.

Dans certains cas, les boutures sembleraient déjà induites, étant donnée qu'une diminution de l'activité peroxydasique dès le moment du bouturage a été observée (QOIRIN et al., 1974; GASPAR et VAN HOOFF, 1976) alors que dans les autres cas les deux phases sont décelées.

De plus, il a été suggéré que l'augmentation continue de l'activité et du nombre des isoperoxydases les plus acides, durant les deux phases d'induction et d'initiation des racines, serait associée au processus de lignification continue inhérent à la différenciation des cellules du xylème dans les nouvelles racines (THORPE et al., 1978, GASPAR et al., 1979). Par contre, l'activité peroxydasique basique qui augmente pendant la phase d'induction et qui diminue après, est associée, respectivement, à une diminution puis une augmentation du taux d'auxine endogène (GASPAR et al., 1977 a).

Si dans la plupart des cas, l'étude de l'évolution de l'activité peroxydasique a été couplée à celle des variations du profil isoenzymatique, dans certains cas, seules des variations dans le nombre ou l'activité des isoperoxydases ont été notées: NANDA et al. (1973 a) chez *Impatiens*, CHANDRA et al. (1973), GURUMIRTI et NANDA (1974), CHIBBAR et al. (1979) chez *Phaseolus mungo*, NANDA et al. (1973 b), BHATTACHARIA et al. (1975) chez *Populus nigra*, BHATTACHARIA et al. (1978) chez *Salix tetrasperma* et ONO et al. (1980) chez *Nicotiana*.

Selon SMITH et THORPE (1977), GASPAR et al. (1977 a), GASPAR et al. (1981), la phase d'induction ne manifeste aucune modification histologique alors que la phase d'initiation est caractérisée par l'apparition de divisions cellulaires au niveau des sites de néoformation et se termine par l'émergence des racines .

Il a été également observé que:

- la précocité et l'intensité de l'enracinement adventif dépendent de la rapidité des changements de l'activité peroxydasique précédant et suivant le maximum d'activité peroxydasique. En effet, l'apport de certaines substances chimiques (généralement des auxines synthétiques, phénols et vitamines) susceptibles de stimuler ou d'inhiber l'activité peroxydasique

pendant l'une des deux phases se répercute directement sur l'enracinement (SMITH et THORPE, 1977; MONCOUSIN, 1982; MONCOUSIN et GASPARD, 1983). Des facteurs physiques tels que l'obscurité peuvent également moduler l'activité peroxydasique et agir par conséquent sur la néoformation de racines (DRUART et al., 1982; MONCOUSIN, 1982, 1986 a).

- au moment de leur séparation du pied mère, les boutures peuvent se trouver dans une situation telle qu'elles ont à subir les phases d'induction et d'initiation (CHIBBAR et al., 1979; MONCOUSIN et GASPARD, 1983) ou uniquement la phase d'initiation avant que la formation des racines ne soit visible (QUOIRIN et al., 1974, GASPARD et VAN HOOFF, 1976).

Au cours de la **néoformation de bourgeons végétatifs**, les variations des profils peroxydasique et isoperoxydasique semblent être différentes de celles citées précédemment, au cours de la néoformation des racines. En effet, la néoformation de bourgeons est souvent caractérisée par une augmentation préalable de l'activité peroxydasique suivie d'un plateau. Cette évolution d'activité peroxydasique a été trouvée par GASPARD et al. (1977 b), THORPE et al. (1978), THORPE et GASPARD, 1978 et KAY et BASILE (1987) chez le tabac; LEGRAND (1987); NEGRUTIU et al., 1979 chez l'*Arabidopsis*; KEVERS et al., (1981) chez la betterave à sucre; VON ARNOLD et GRONROOS (1986) chez *Picea abies* et LEGRAND et BOUAZZA (1991) chez la chicorée.

L'augmentation de l'activité peroxydasique favorise la formation de bourgeons et la présence de ce plateau semble être caractéristique de ce type d'organogénèse.

Récemment, McDOUGALL et al. (1993) ont montré que la période d'induction de pousses chez *Linum* est caractérisée par une augmentation des isoperoxydases cationiques et la période d'initiation par une augmentation abondante des isoenzymes anioniques. Parallèlement à l'augmentation continue des isoperoxydases anioniques, de nouveaux éléments du xylème peuvent être formés.

L'activité ainsi que les profils isoperoxydasiques ont été également considérés comme marqueurs d'**embryogénèse somatique** par JOERSBO et al. (1989a) chez la carotte et KRSNIK-RASOL (1986 et 1991) chez le potiron. WOCHOK et BURLESON (1974) et KRINSKI-RASOL et al. (1982) ont montré que, chez la

carotte, l'apparition des embryons est précédée par une augmentation de l'activité peroxydasique et que certaines isoperoxydases cationiques peuvent être considérées comme des indicateurs précoces de l'embryogenèse somatique. Ainsi, JOERSBO et al., 1989 (b) ont signalé la présence d'une isoperoxydase basique pendant les premiers stades de l'embryogenèse. Celle-ci ne s'exprime pas chez les lignées embryogènes mises en culture dans des conditions non embryogènes. Ceci confirme les résultats de KOCHBA et al. (1977) qui ont montré que, dans les cals embryogènes d'orange, le potentiel embryogène est associé à une augmentation importante d'activité peroxydasique et à l'apparition d'isoenzymes cationiques supplémentaires spécifiques.

Par ailleurs, ANDERSEN et al. (1986) ont montré que, chez la carotte, l'activité peroxydasique est nettement plus élevée dans une culture en différenciation comparée à une autre non différenciée, de plus des isoperoxydases spécifiques ont été trouvées à partir des cellules poussant dans des conditions de différenciation en accord avec d'autres observations (KRSNIK-RASOL et al., 1982). De plus, CORDWENER et al. (1991) ont montré récemment, que la sécrétion d'isoperoxydases cationiques spécifiques est nécessaire pour le processus d'embryogenèse somatique chez la carotte.

Considérant que les peroxydases sont aussi AIA-oxydases (GRAMBOW, 1986), la diminution des teneurs endogènes en auxine serait nécessaire pour le développement embryogène et par conséquent une forte activité peroxydasique semble être un des marqueurs positifs du potentiel embryogène.

Malgré que les travaux concernant l'étude des relations existantes entre activité peroxydasique et différenciation soient peu nombreux, ils montrent tous que l'activité peroxydasique totale aussi bien que les profils isoperoxydasiques peuvent être corrélés à la différenciation et peuvent donc être considérés comme des marqueurs spécifiques au cours de la néoformation de racines, de bourgeons ou d'embryons.

## 2. Catabolisme auxinique

L'implication des peroxydases en général, et de certaines isoenzymes en particulier, est largement admise dans le contrôle de la teneur endogène d'auxine et dans les processus qui en dépendent (ENDO, 1968; SRIVASTAVA et VAN HUYSTEE, 1973; MACHACKOVA et al., 1975; GASPAR et al., 1977b; 1985).

WENT (1928) est probablement l'un des premiers chercheurs à avoir soupçonné l'existence d'enzymes capables de détruire les auxines, depuis de nombreux travaux (LARSEN, 1951; KENTEN, 1955; RAY 1958; GALSTON et HILMAN, 1961;

GASPAR, 1965; RICARD et JOB, 1974; GASPAR et al., 1982; GRAMBOW et LANGENBECK, 1983; PILET et GASPAR, 1968; VAN HUYSTEE, 1986; ACOSTA et al., 1988; GRAMBOW, 1986; GRAMBOW, 1988; SANCHEZ-BRAVO et al., 1989; GARCIA-FLORENCIANO, 1991a) ont été publiés et montrent combien les études relatives au catabolisme auxinique ont intéressé les chercheurs.

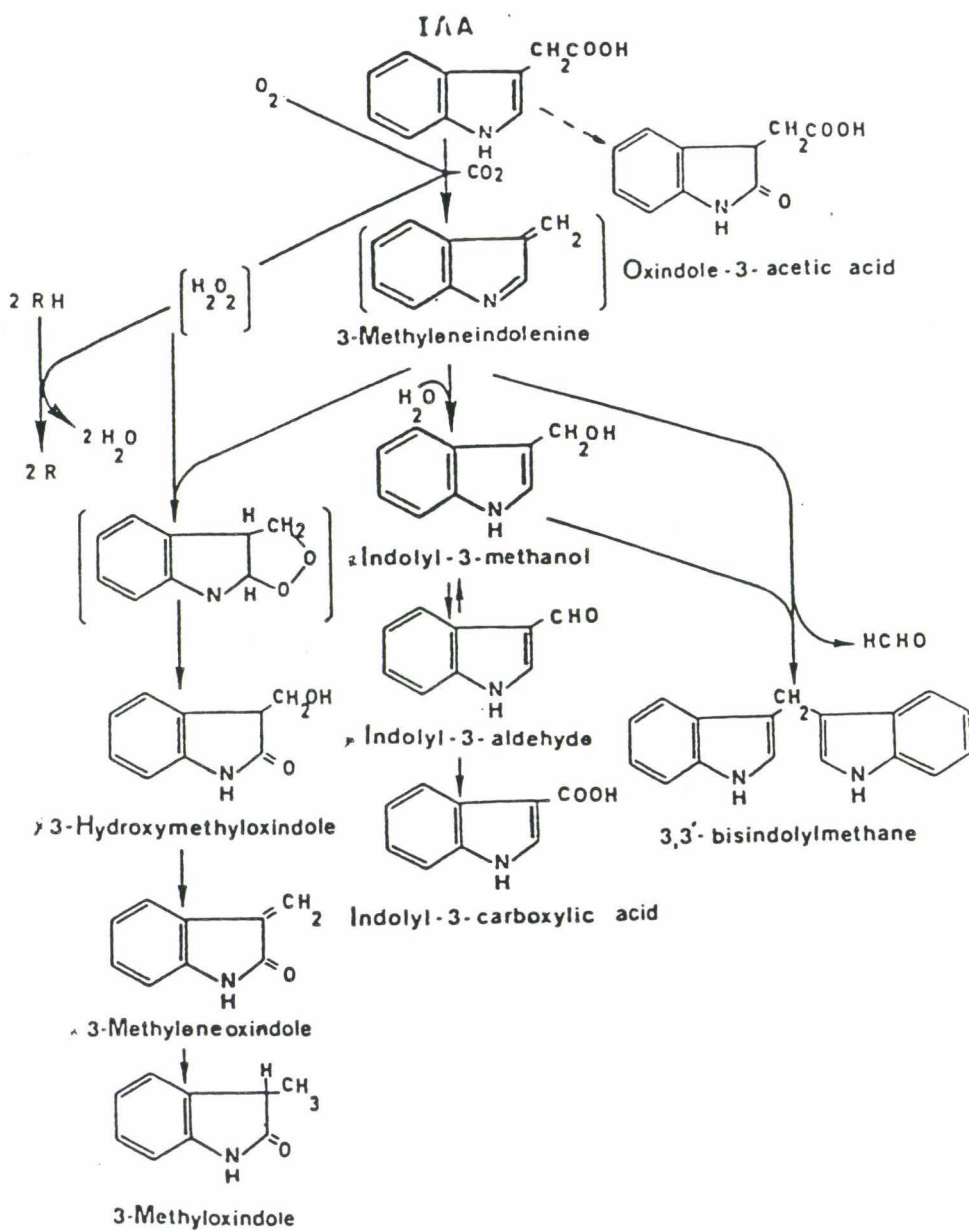
La mise en évidence des relations entre peroxydases et auxines est basée sur des constatations indirectes faites à la suite d'apports d'effecteurs positifs ( $Mn^{2+}$ , phénols monosubstitués) ou négatifs (polyphénols) des AIA-oxydases, ou déduites des variations de la teneur en ces effecteurs au cours de phases particulière de phénomènes physiologiques tels que l'enracinement adventif (GASPAR et al., 1982). Toutefois, la nature de l'enzyme catalysant la dégradation de l'AIA a souvent été débattue. SRIVASTAVA et VAN HUYSTEE (1977a) ont résumé les trois hypothèses émises:

- la fonction AIA-oxydase n'est pas assurée par les peroxydases,
- les mêmes molécules exercent les deux fonctions mais à des sites actifs différents,
- seulement quelques isoperoxydases ont une activité AIA-oxydase.

Dans la majorité des cas, la deuxième hypothèse est retenue (ENDO, 1968; SRIVASTAVA et VAN HUYSTEE, 1973; MACHACKOVA et al., 1975; DENCHEVA et KLISURSKA, 1982), mais MAZZA et al. (1970) et RICARD et JOB (1974) ont montré que les isoperoxydases les plus basiques ont un très fort potentiel d'oxydoréduction à l'égard de l'AIA et donc sont les plus aptes à détruire l'AIA.

Les voies d'oxydations non décarboxylatives et décarboxylatives sont les principaux processus contrôlant le taux d'AIA libre (SEMBDNER et al, 1980; BANDURSKI et al., 1988; GRAMBOW, 1988). GASPAR et al., 1982 ont signalé que la décarboxylation oxydative de l'AIA est catalysée par les peroxydases et est considérée comme la principale voie de dégradation d'AIA chez les végétaux. Par contre l'oxydation non décarboxylative de l'AIA observée chez plusieurs espèces végétales (REINECKE et BANDURSKI, 1988) n'est pas catalysée par les peroxydases.

Suivant les conditions physiques et biochimiques, la dégradation de l'AIA peut se faire par différentes voies conduisant à la formation de 3-méthylène oxindole ou l'indole-3-aldehyde (GRAMBOW et LANGENBECK-SCHWICH, 1983; ROS



**Figure 5:** Schéma des voies de la dégradation (per)oxydasique de l'IAA.  
 (Les substances entre parenthèse n'ont pas été identifiés directement).  
 D'après GASPARD et HOFINGER (1988).



BARCELO et al., 1990 a; SANDBERG et al., 1990; McDOUGALL, 1992). D'après GASPAR et HOFFINGER (1988), le méthylène-indolénine est probablement un intermédiaire commun de la formation de l'indole-3-méthanol et du 3-hydroxyméthylloxindole (fig. 5). En absence ou en présence de faibles concentrations de phénols, l'eau oxygénée est consommée par la réaction qui, avec le 3-méthylèneindolénine comme intermédiaire, conduit à la formation du 3-hydroxyméthylloxindole et du 3-méthylène-oxindole qui peut être lui même réduit en 3-méthylloxindole par l'enzyme 3-méthylène-oxindole réductase (GRAMBOW et LANGENBECK-SCHWICH, 1983). Par contre, l'indole-3-méthanol est le seul produit du catabolisme auxinique si de l'eau oxygénée est consommée par les peroxydases en présence de composés phénoliques. Ce composé peut être oxydé de manière irréversible en indole-3-aldéhyde, qui lui même peut être oxydé en acide indolyl-3-carboxylique.

Si les peroxydases peuvent oxyder des phénols pour produire, entre autres, des quinones (PICKERING et al., 1973; YOUNG et STEELINK, 1973), les composés phénoliques régulent à leur tour l'activité AIA-oxydasique des peroxydases. Les monophénols, en particulier, favorisent la dégradation de l'AIA, d'autres composés tels que les O-diphénols inhibent cette activité (LEE et al., 1982). Certains dérivés du catabolisme auxinique paraissent avoir une action du même type que l'AIA lui même. En effet, il a été montré que le méthylène oxindole, par exemple, peut avoir une activité cent fois plus élevées que celle de l'acide indole acétique sur l'enracinement de boutures de *Pinus radiata* (SMITH et THORPE, 1976). De même HOFINGER et al. (1980) ont constaté qu'un apport exogène de méthylène oxindole peut inhiber la croissance des racines en augmentant la production d'éthylène.

Il n'y a pas de doute que les peroxydases peuvent décarboxyler l'AIA *in vitro* grâce à divers mécanismes possibles (GASPAR et al., 1982; GRAMBOW et LANGENBECK, 1983; ACOSTA et al., 1988) mais qu'elles agissent ainsi *in vivo* (RICARD et JOB, 1974; GRAMBOW, 1986; GRAMBOW, 1988; SANCHEZ-BRAVO et al., 1989) n'est pas encore bien admis.

Le catabolisme auxinique est généralement catalysé par les peroxydases basiques (BREDEMEIJER et BLAAS, 1983; AKASAWA et YONEI, 1985; BERTHON et al., 1990; ROS BARCELO et al., 1990 b; FERRER et al., 1991 b) probablement solubles sans spécificité de leur localisation ou associées à la paroi (GASPAR et al., 1982; JACOB et BOPP, 1990). En effet, il a été fréquemment observé que les variations des peroxydases basiques sont concomitantes des variations inverses des concentrations en AIA endogène (GASPAR et al., 1985), ce qui n'est pas le cas des peroxydases acides. La dégradation de l'AIA, *in vitro*, par les isoperoxydases acides a été également signalée par CHIBBAR et VAN HUYSTEE (1984) chez l'arachide et PRESSEY (1990) chez la

tomate. Les isoperoxydases liées à la membrane plasmique sont également capables de convertir le tryptophane en indol-3-acétaldéhyde, précurseur éventuel de l'auxine (LUDWIG-MULLER et al., 1990).

### 3. Biosynthèse de l'éthylène

Suite aux relations établies entre les variations de l'activité peroxydasique et la transformation de l'acide carboxyl 1-aminocyclopropane (ACC) en éthylène, on a longtemps considéré que la peroxydase intervenait dans la dernière étape de la biosynthèse de l'éthylène (MACHACKOVA et ZMERHAL, 1981; ROHWER et MADER, 1981; VIOQUE et al., 1981; GASPAR et al., 1985; ABELES et al., 1988). Mais cette hypothèse n'est plus retenue depuis la découverte de l'enzyme formant l'éthylène (EFE) qui a la propriété de convertir l'ACC en éthylène (YANG et HOFFMAN, 1984).

A cause de son instabilité (YANG et HOFFMAN, 1984; KENDE, 1989) l'activité de cette enzyme n'a été mesurée, *in vitro*, qu'en 1991 par VERVERIDIS et JOHN chez le melon. Sa nature reste inconnue (McKEON et YANG, 1988) mais elle présente une grande homologie avec la flavanone 3-hydroxylase (HAMILTON et al., 1990; VERVERIDIS et JOHN, 1991).

Récemment, KEVERS et al. (1992) ont signalé une relation entre l'activité ascorbate-peroxydase et la capacité de convertir l'ACC en éthylène. Par ailleurs, puisque l'activité ascorbate peroxydase est associée aux mitochondries (BOUZAYEN et al., 1987) et aux fluides périplasmiques et intercellulaires (CASTILLO et al., 1986; KEVERS et al., 1989), où l'activité de l'EFE a été également localisée, certaines peroxydases telles que l'ascorbate-peroxydase pourraient avoir un rôle direct ou indirect dans le système EFE.

### 4. Lignification

La participation des peroxydases dans la construction de la paroi cellulaire a été largement étudiée (BORCHERT, 1978; ESPELIE et KOLATTUKUDY, 1985; DE JAEGER et al., 1985; CATESSON et al., 1986; ESPELIE et al., 1986; FRY, 1986; FRY, 1988; ROBERT et al., 1988; ROBERT et ROLAND, 1989; ROBERT et KOLATTUKUDY, 1989; FRY, 1990). En effet, il existe plusieurs étapes dans la voie de biosynthèse de la lignine dont l'une d'entre elles serait contrôlée par la peroxydase.

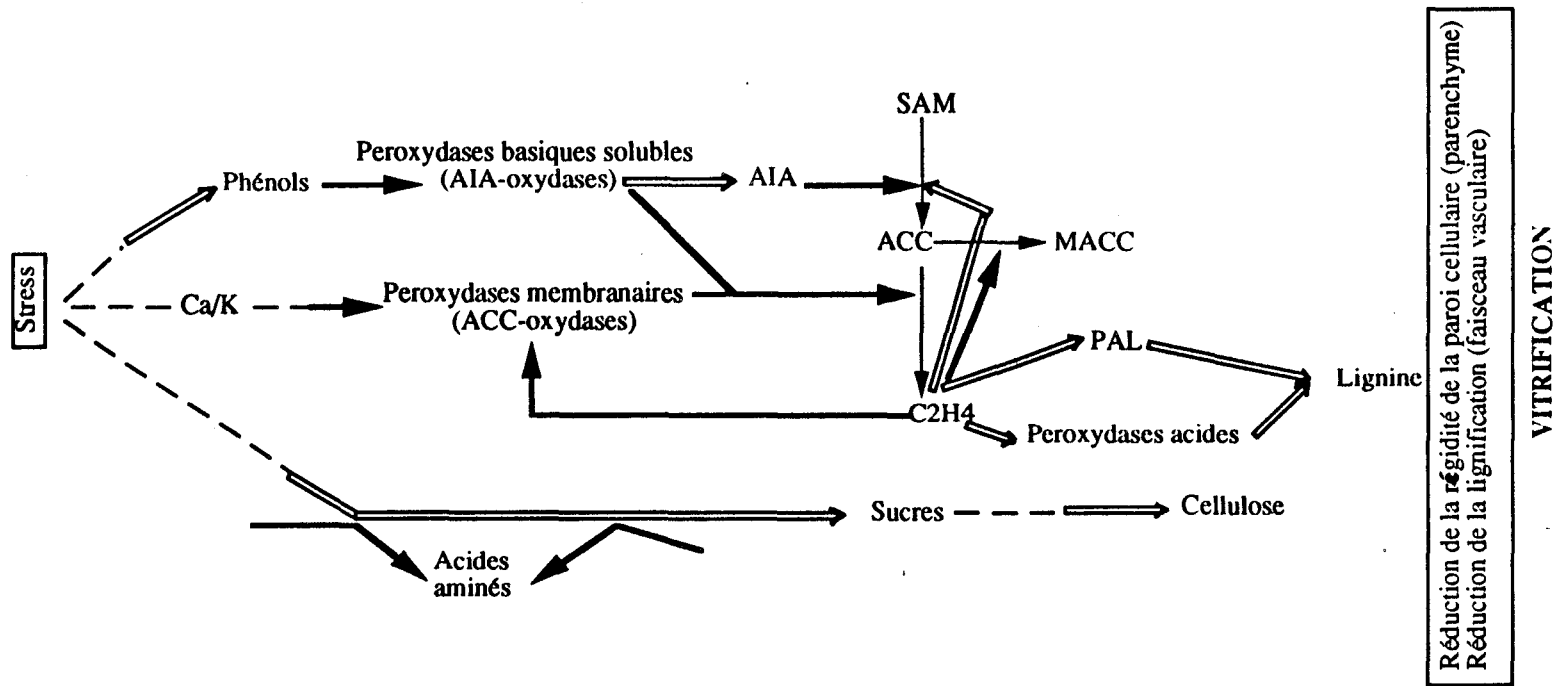
La lignine est synthétisée à partir des L-phenylalanine et L-tyrosine par l'intermédiaire des acides cinnamiques et hydroxycinnamiques correspondant (cinnamique, para-coumarique) (GASPAR et al., 1991). Ces derniers en tant que tels ou glycosylés sont sécrétés à partir du cytoplasme vers la paroi où les glycosides sont stockés comme précurseurs monomériques de la lignine alors que les formes libres sont directement déhydrogénés par la peroxydase (+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dans les radicaux mésomériques libres (phenoxy) (GASPAR et al., 1991).

La peroxydase interviendrait uniquement dans les toutes dernières étapes de la biosynthèse de la lignine en catalysant la polymérisation oxydative des alcools para-coumaryliques coniféryliques et synapyliques. Cette polymérisation nécessite la synthèse d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (HARKIN et OBST, 1973) elle même induite par les peroxydases (GROSS et al., 1977; MADER et al., 1980).

Les peroxydases catalysent aussi la formation de l'acide diférulique, à partir de l'acide férulique, liant les hémicellulose (MARKWALDER et NEUKOM, 1976) et aussi la formation de pont diphényl entre les chaînes de polysaccharides ou les protéines de la paroi (WHITMORE, 1978 a et b), contribuant ainsi à l'augmentation de la rigidité de la matrice cellulosique (ROLAND, 1982). De même, la formation de liaisons croisées, catalysées par les peroxydases, a été suggérée entre phénols pariétaux (FRY, 1979, 1982).

Les peroxydases liées aux parois cellulaires en cours de lignification ont la particularité de manifester *in vitro* une grande affinité pour la syringaldazine (CATESSON et al., 1978; FLEURIET et DELOIRE, 1982; GOLDBERG et al., 1983; GOLDBERG et al., 1985; DE JAEGHER, et al., 1985). Il s'agit dans ce cas, d'une syringaldazine-peroxydase puisque cette réaction n'est décelée que dans les tissus qui se lignifient.

Bien que TIGIER et al. (1991) aient montré qu'une activité syringaldazine-oxydase a été trouvée aussi bien dans les isoenzymes anioniques que cationiques, la lignification est généralement accompagnée par une augmentation de l'activité des isoperoxydases anioniques (VAN HOOFF et GASPAR, 1976; GASPAR et al., 1982) qui peuvent également, intervenir dans les processus de cicatrisation par subérisation des tissus suite à une blessure (GASPAR, 1986; KOLATTUKUDY, 1987; ROBERT et al., 1988; MOHAN et KOLATTUKUDY, 1990). En fait, souvent à la suite d'une blessure, d'une attaque de pathogènes sur la plante ou d'un stimulus mécanique, l'activité peroxydasique augmente et des isoperoxydases apparaissent (GRISON et al., 1975; VANCE et SHERWOOD, 1976; BOYER et al., 1979; DESBIEZ et al., 1981; GASPAR et al., 1982). Chez des tomates cerises, FLEURIET (1982) a montré que cette augmentation est due d'abord, aux peroxydases dites solubles puis, vers le sixième jour,



**Figure 6:** Séquence hypothétique des réactions conduisant à la vitrification (d'après GASPAR, 1986).

- Stimulation de l'activité ou augmentation de synthèse.
- ⇒ inhibition de l'activité ou diminution du niveau
- voie biochimique

l'activité des peroxydases pariétales inexistantes chez le fruit non blessé, augmente à son tour avec l'apparition de nouvelles isoenzymes. Ceci se traduit par la lignification des tissus blessés, ce qui est un mécanisme de résistance de la plante (VANACE et al., 1976). De plus, une nouvelle forme d'isoperoxydase sur des tubercules de pomme de terre blessés a été observée par ESPELIE et al. (1986) et serait responsable de la subérisation ultérieure des tissus blessés.

Des études cytochimiques montrent que les isoperoxydases impliquées dans la lignification sont localisées au niveau de la paroi secondaire et peuvent être des isoenzymes extracellulaires (WESTERMARK, 1982). L'activité peroxydasique dans ces parois est temporaire et cesse à la fin de la lignification (PANG, 1990).

L'intervention des peroxydases dans le processus de lignification a été étudiée en détail au cours du phénomène de vitrification des tissus cultivés *in vitro* (KEVERS et al., 1984; KEVERS et GASPARD, 1985 a; KEVERS et GASPARD, 1985 b; GASPARD et al., 1986) (fig. 6).

La vitrification est considérée comme une réponse morphologique aux conditions de stress. Elle se caractérise par une lignification défectueuse des vaisseaux et des trachéides. Une diminution de l'activité des peroxydases acides et de la phénylalanine-ammonia-lyase (PAL) a été observée, elle serait le résultat d'une diminution de la production d'éthylène et ceci pourrait expliquer la rigidité et la lignification faible chez les plantes vitrifiées.

A la lumière de ces fonctions peroxydasiques, l'objectif de notre travail était d'étudier l'activité peroxydasique et les profils isoperoxydasiques au cours de la morphogenèse de chicorée de Bruxelles.

---

## I- MATÉRIEL VÉGÉTAL

Le matériel végétal utilisé provient de racines tubérisées, non forcées, de la chicorée de Bruxelles *Cichorium intybus* L. var. Witloof cultivar Flash largement répandue dans le nord de la France, la Belgique et les Pays-Bas.

C'est une Astéracée bisannuelle dont les racines tubérisées sont récoltées en automne et conservées au laboratoire en chambre froide à 4 °C. Elle sont connues pour leur remarquable capacité organogène.

Pour chaque essai, nous avons sélectionné des échantillons de même provenance et ayant subi les mêmes conditions de conservation.

## II- LA CULTURE *IN VITRO*

### 2.1. Aseptisation du matériel

Les racines, épluchées, sont immergées pendant 30 minutes dans une solution filtrée d'hypochlorite de calcium (210° chlorométrique) à 70 g l<sup>-1</sup> puis rincées 3 fois à l'eau distillée stérile pendant 5, 10 et 15 minutes respectivement. Le but de cette opération est de détruire les micro-organismes (bactéries et champignons) qui infectent fréquemment la zone corticale superficielle sans que la zone génératrice (libéroligneuse) ne soit atteinte.

### 2.2 Mise en culture:

A l'aide d'un emporte-pièce cylindrique, des tronçons de 6 mm de diamètre sont prélevés au niveau de l'assise génératrice des racines. Ils sont ensuite débités en fragments de 2 mm d'épaisseur et déposés au contact du milieu nutritif à raison de vingt explants par boîte de Pétri. Le milieu de culture préalablement stérilisé par un passage à l'autoclave pendant 20 min à 110 °C (0,5 bars), comprend dans sa composition de base les macro et les microéléments de la solution de HELLER (1953) et de la gélose à 0,6%. Au cours de nos expériences nous avons parfois modifié la composition de ce milieu. Ces modifications seront spécifiées ultérieurement.

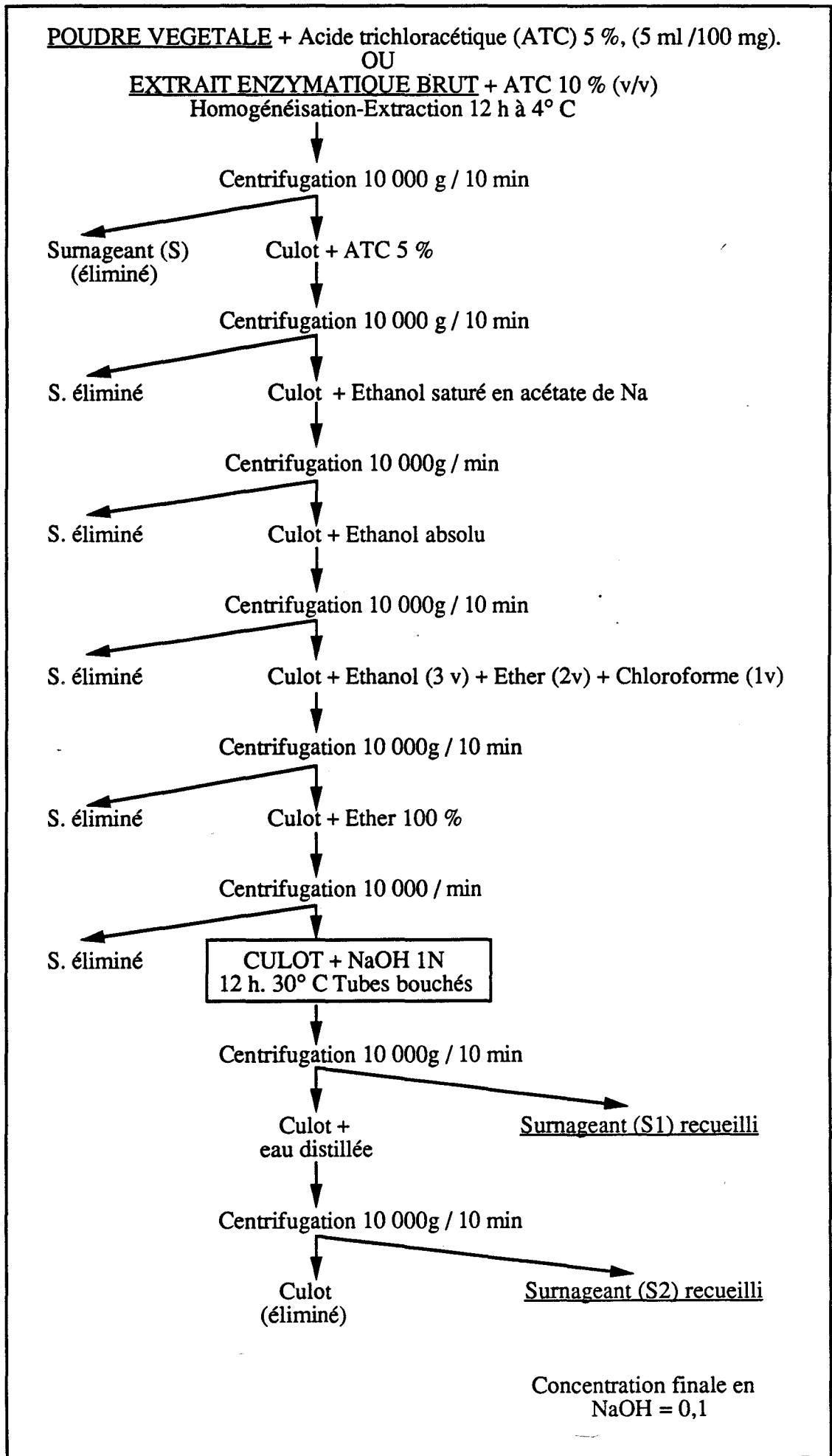


Figure 7: Protocole d'extraction des protéines (D'après LEGRAND, 1987).

### 2.3. Conditions de culture:

Les cultures sont entreposées dans des pièces dont la température constante est réglée à  $22^{\circ} \pm 1^{\circ}$  C. Elles sont soit éclairées 24 H/24, soit maintenues à l'obscurité dans des boîtes étanches à la lumière.

Les explantats sont prélevés à des temps différents de culture, congelés brutalement à l'azote liquide et conservés à  $-20^{\circ}$  C jusqu'à l'analyse des peroxydases. Les prélèvements sont toujours effectués avant l'apparition de tout organe.

Les effets des traitements sur l'organogenèse sont mesurés après 25 jours de culture. Les bourgeons et les racines sont alors bien développés et il est possible de les dénombrer.

La croissance des explantats est exprimée soit par rapport à la masse de matière fraîche (MF) ou de matière sèche (MS) soit par rapport à la teneur en protéines. La masse de matière sèche est obtenue après congélation dans l'azote liquide et lyophilisation des explantat pendant 48 heures. Le pourcentage en eau (%) est déterminé d'après la formule :  $\% \text{ eau} = (MF - MS / MF) \times 100$ .

Chaque essai a été répété au moins deux fois. Mais puisque le pouvoir morphogénétique des tissus varie au cours de l'année, nos résultats sont parfois discutés dans le cadre de chaque série d'essais. Il est possible de réduire les variations en distribuant de façon aléatoire les explantats dans les différents lots.

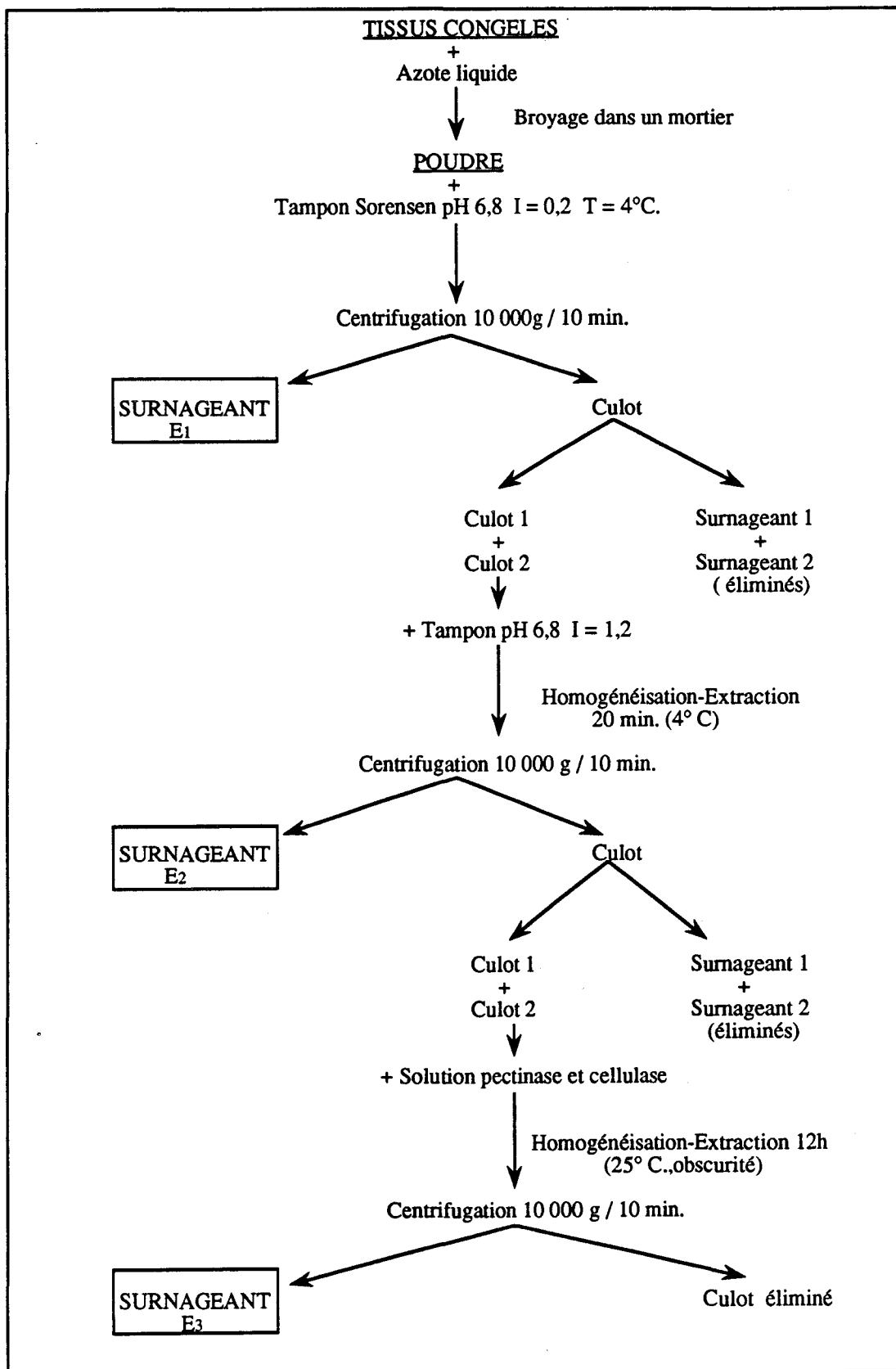
## III- TECHNIQUES D'ANALYSE

### 3.1. Extraction des protéines

Les tissus lyophilisés sont broyés dans un mortier et à partir de la poudre obtenue les protéines sont extraites selon la méthode de LEGRAND (1987) (fig. 7). Elle consiste en une précipitation de 12 heures à  $4^{\circ}$  C par l'acide trichloroacétique (ATC). Après centrifugation le culot est soumis à une série de lavages par l'ATC, l'éthanol saturé en acétate de Na, l'éthanol absolu et le mélange éther-chloroforme-éthanol. Le culot est ensuite lavé à l'éther pour permettre un séchage rapide. Les protéines sont ensuite solubilisées dans de la soude 0,1N.

La teneur en protéines des extraits est dosée par la méthode de BRADFORD (1976) qui a été comparée à celle de LOWRY et al (1951).





**Figure 8:** Protocole d'extraction des peroxydases solubles (E<sub>1</sub>), liées de façon ionique (E<sub>2</sub>) et de façon covalente (E<sub>3</sub>) (D'après LEGRAND et DUBOIS, 1977).

### 3.2. Extraction des peroxydases

La distribution cellulaire de la peroxydase implique que sa solubilité varie selon le degré de liaison avec les différents constituants cellulaires (LEE, 1973). Pour nos extractions, nous avons suivi la méthode déjà décrite par LEGRAND et DUBOIS (1977) permettant d'extraire le plus complètement possible les peroxydases dans les tissus de *Cichorium intybus* L. (fig. 8).

Les explantats racinaires sont donc congelés dans de l'azote liquide et broyés dans un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.

Afin d'extraire les peroxydases solubles ( $E_1$ ), une quantité connue de la poudre est mise en suspension dans la solution tamponnée de phosphate monopotassique et dissodique à 1/15 molaire (tampon de SORENSEN). Sa force ionique est de l'ordre de 0,264 calculée selon la formule suivante:

$$I=1/2 \sum^i (C_i \times V_i^2).$$

où  $C_i$  représente la concentration molaire et  $V_i$  la valence de l'ion considéré.

L'ensemble est homogénéisé pendant 30 secondes puis abandonné 20 minutes à 4°C pour extraction, les peroxydases solubles sont ainsi recueillies dans le surnageant après centrifugation. Le culot est alors remis en suspension dans le même tampon, homogénéisé puis 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 et elle est pratiquement nulle après le deuxième.

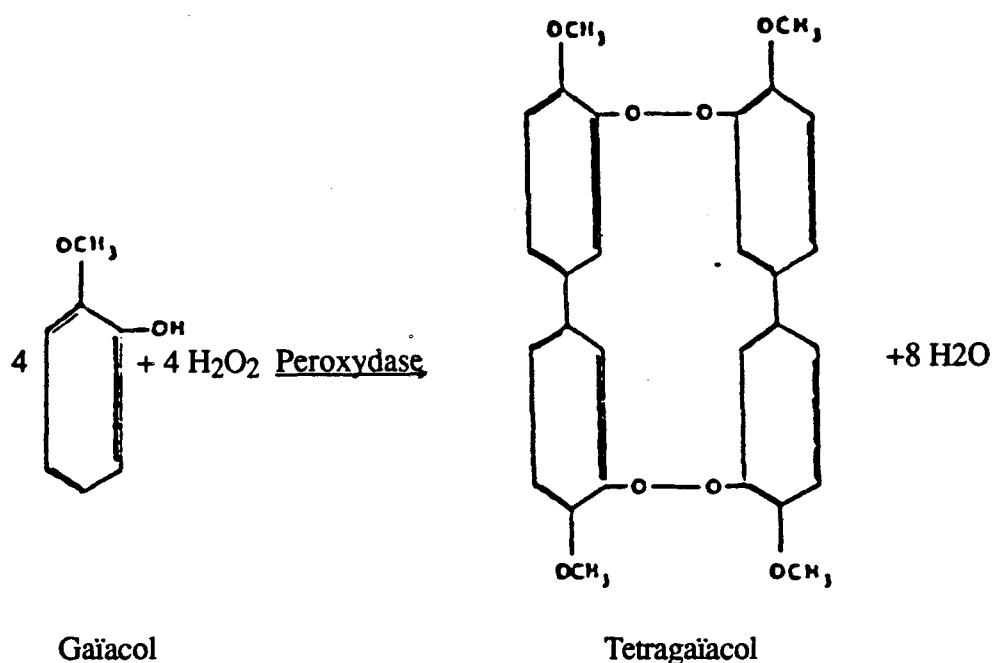
Ensuite, les peroxydases liées ioniquement ( $E_2$ ) sont extraites en ajoutant du chlorure de sodium 1 M à la solution tamponnée précédente, ce qui augmente sa force ionique à 1,2 M.

Après extraction des peroxydases solubles et liées ioniquement, des lavages à l'eau distillée permettant l'élimination du NaCl sont nécessaires. Nous avons vérifié que les surnageants recueillis ne présentaient plus d'activité peroxydasique. Par contre, le culot de centrifugation en présence de peroxyde d'hydrogène et de gaïacol, donne une coloration brune caractéristique de la formation de tetragaïacol. Il existe donc des peroxydases dans le culot. Celles-ci ne sont extraites que par macération de ce dernier dans une solution contenant 0,5 % de cellulase et 2,5 % de pectinase (P/V) dissoutes dans un tampon acétate (pH 4,5). Ces deux types d'enzymes vont donc digérer les parois et libérer les peroxydases liées de façon covalente ( $E_3$ ) qui sont recueillies dans le surnageant après centrifugation.

### 3.3. Mesure des activités enzymatiques

#### 3.3.1. Mesure de l'activité peroxydasique (AP)

L'activité peroxydasique est mesurée par spectrophotométrie à 25° C à partir d'un mélange contenant le peroxyde d'hydrogène à 0,2 % comme substrat, du gaïacol à 1 % comme donneur d'électrons et du tampon phosphate K-Na (pH 6,1) à 1/15 molaire. L'activité est déterminée en suivant la formation, par l'extrait enzymatique, du tétragaïacol selon la réaction suivante:



L'activité peroxydasique est exprimée par la variation de la densité optique, lue à 420 nm après 5 minutes d'incubation. Elle est rapportée à différents paramètres : la masse de la matière fraîche, sèche ou la teneur en protéines des extraits. Il s'agit, dans ce dernier cas d'activité peroxydasique spécifique (APS).

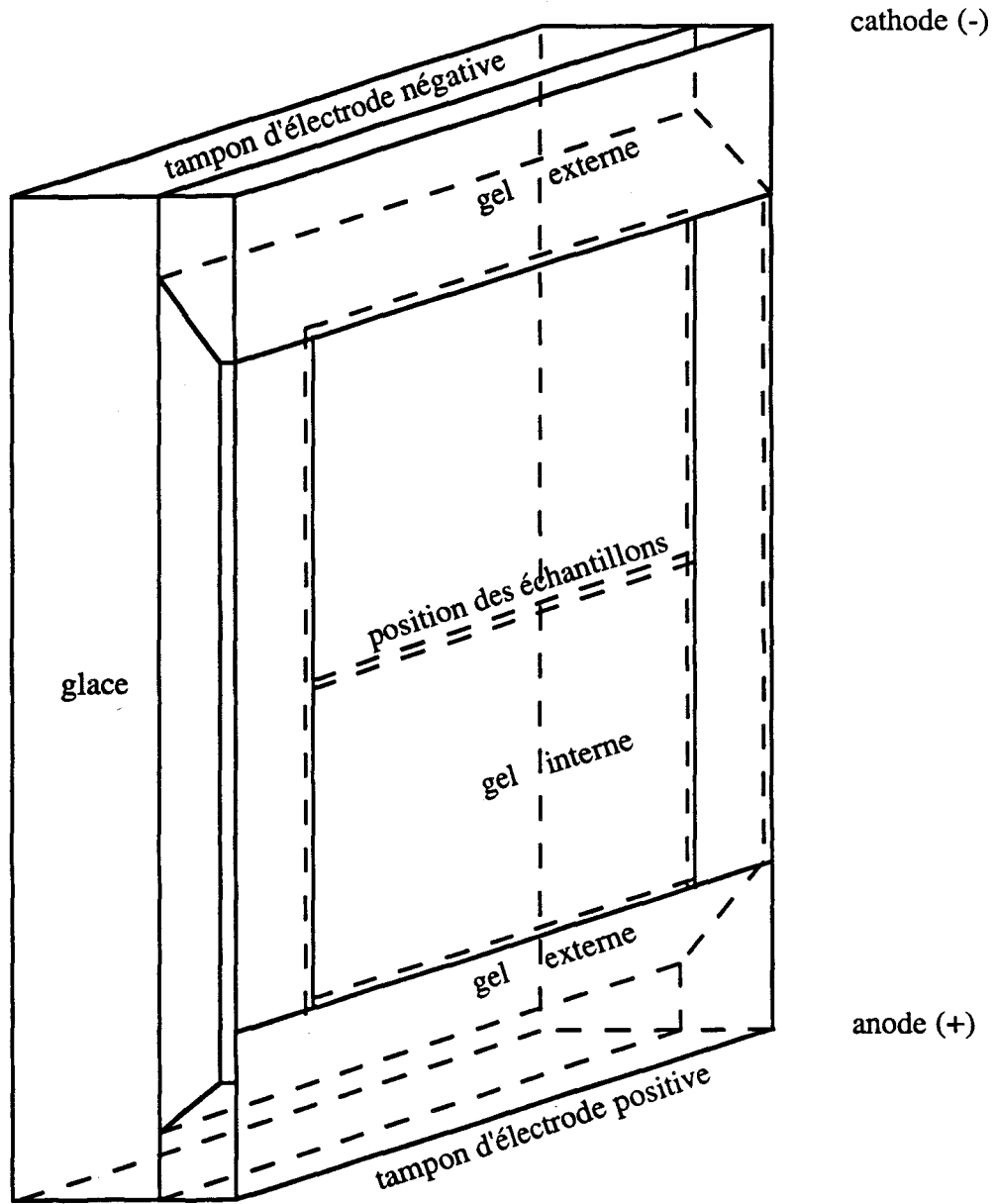


Figure 9 : Schéma du système utilisé pour l'électrophorèse verticale.

### 3.3.2. Séparation des isoenzymes par électrophorèse

Le gel que nous avons utilisé pour nos expériences est le gel d'amidon selon la technique d'électrophorèse mise au point par SMITHIE (1955). La dénaturation des protéines y est minimale.

La séparation des isoperoxydases s'inspire de la technique de SCOPES (1968) adaptée par DARIMONT et GASPAR (1972).

Le gel d'amidon est constitué du gel externe contenant 33 g d'amidon pour électrophorèse (Starch Hydrolysed BDH) dans 300 ml de tampon C (tableau 1) et du gel interne contenant 25,3 g d'amidon et 9,3 g d'urée dans 200 ml de tampon D. L'urée donne au gel une plus grande consistance. Employée à cette concentration elle n'altère pas la migration des protéines.

La composition des différentes solutions tamponnées est donnée dans le tableau 1.

Tampon cathodique pH 8,4 (A)	Tampon anionique pH 8,4 (B)	Tampon du gel externe pH8,4 (C)	Tampon du gel interne pH 8,4 (D)
- 0,2 M ac. borique - 0,05 M NaOH - 0,05 M NaCl	- 0,1 M Tris - 0,25 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	- 0,1 M acide borique - 0,6 M Tris	- 0,1 mM Na <sub>2</sub> EDTA - 3 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> - 15 mM Tris

**Tableau 1:** Composition des différentes solutions pour l'électrophorèse sur gel d'amidon.

Après avoir mélangé les produits à la solution tamponnée, on obtient une suspension blanchâtre qui est ensuite chauffée sous agitation jusqu'à obtention d'un mélange fluide et translucide. Ce mélange est dégazé sous vide pendant une minute puis rapidement coulé dans les compartiments correspondants de la cuve à électrophorèse (fig. 9). Immédiatement après, on place au milieu du gel interne un "peigne" à 10 lames métalliques destinées à faire des puits qui peuvent recevoir jusqu'à 30 µl d'échantillon. Dans un de ces puits, on ajoute du vert de bromocrésol à 1 % qui migre avec le front d'électrophorèse vers l'anode. Il se divise en deux tâches et lorsque la plus anodique atteint l'extrémité du gel interne l'électrophorèse est arrêtée.

Au cours de l'électrophorèse, les molécules protéiques de l'échantillon sont réparties dans le gel sous l'effet du champ électrique. L'intensité du courant est de 25 mA au moment de l'application de 450 V au système.

L'avantage de ce système d'électrophorèse est la séparation sur un même gel des peroxydases anioniques et cationiques.

Après migration, le gel est découpé en deux dans le sens de l'épaisseur. L'un est révélé par le mélange gâïacol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'autre par le mélange benzidine-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. On obtient ainsi des électrophorégrammes dont l'intensité des bandes est conventionnellement représentée par le schéma suivant :



Dans cette gamme arbitraire, plus l'intensité des bandes augmente, plus l'activité des isoperoxydases est grande.

### 3.4.. Mesure de l'activité auxine-oxydasique : AAO

La technique utilisée s'inspire de celle décrite par PILET (1957). L'AAO est mesurée à 25° C et la réaction est déclenchée après addition de 2 ml d'une solution aqueuse d'acide indolyl-acétique à 175 µg ml<sup>-1</sup> au mélange réactionnel comprenant:

- (6-x) ml de tampon phosphate pH 6,1
- 1 ml de 2,4 dichlorophénol (DCP) 10<sup>-3</sup> M
- 1 ml de MnCl<sub>2</sub> 10<sup>-3</sup> M

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

Après 30 secondes, 1 h et 2 h d'incubation, 2 ml du mélange sont prélevés et ajoutés à 8 ml de réactif de SALKOWSKI préparé selon PILET (1957). Ce réactif va réagir avec l'auxine non oxydée pour donner une coloration rouge qui ne sera stable, donc mesurée, qu'après 7 minutes au photocolorimètre à 535 nm.

Les résultats sont exprimés en µg d'auxine oxydée pour 100 mg de la masse de matière fraîche après une incubation de 2 heures. Elle est calculée selon la formule:

$$[AIA]_i - \frac{[AIA]_x \cdot D.O.t_1}{D.O. t_0}$$

[AIA]<sub>i</sub> = concentration initiale d'AIA

D.O. t<sub>0</sub> = D.O. initiale

D.O. t<sub>1</sub> = D.O. finale

---

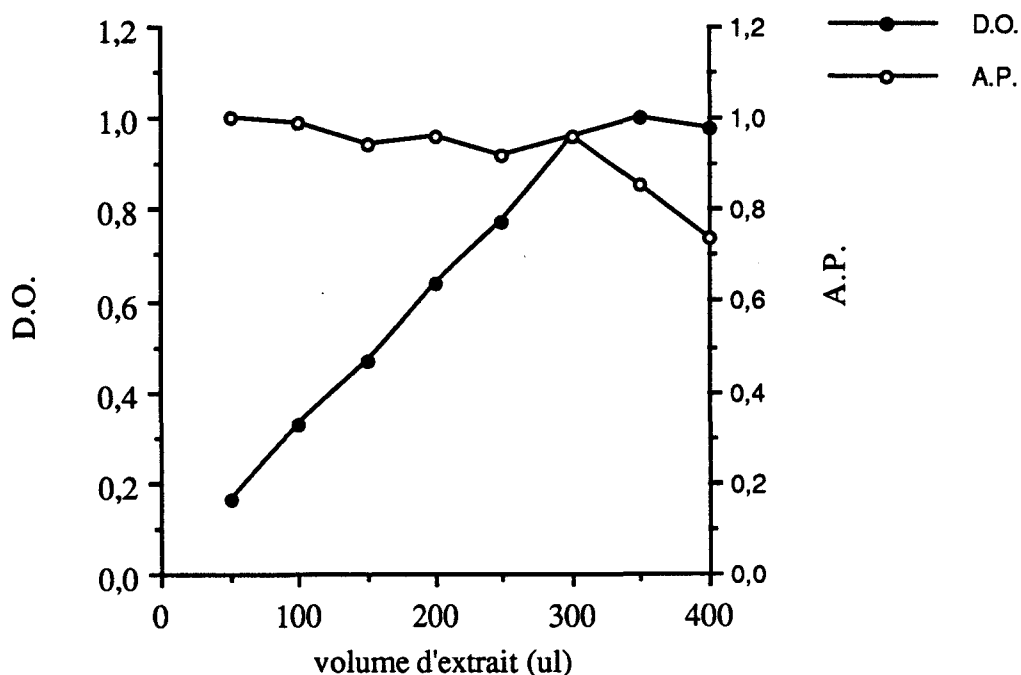
## A- MISE AU POINT DES TECHNIQUES

LEGRAND (1987) a montré qu'une connaissance approfondie du matériel utilisé était nécessaire et qu'une technique appliquée sur un matériel donné ne convenait pas systématiquement à la plante que nous utilisons, c'est pourquoi nous avons procédé à quelques mises au point des techniques pour les adapter à notre matériel.

### I- ACTIVITE PEROXYDASIQUE : AP

#### 1.1. Recherche du volume optimal d'extrait enzymatique

Pour doser l'activité peroxydasique, nous avons fait varier le volume d'extrait. L'examen des résultats de la figure 10 montre que la vitesse d'oxydation du gaiacol est proportionnelle pour des volumes d'extrait compris entre 50 et 300  $\mu$ l, ce qui correspond à un apport plus important d'enzyme quand le volume d'extrait augmente. Pour des volumes supérieurs à 300  $\mu$ l, l'oxydation du gaiacol est ralentie et l'activité peroxydasique ramenée à 100 mg de poids frais diminue. Il n'y a donc plus de rapport entre volume d'extrait et activité peroxydasique.



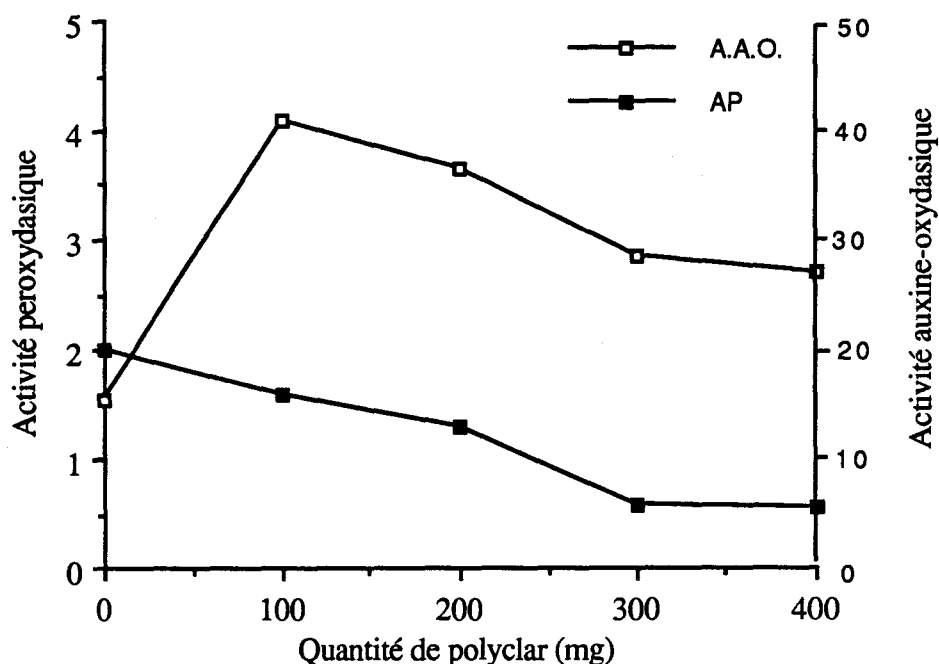
**Figure 10:** Influence du volume d'extrait enzymatique sur l'activité peroxydasique.

A la suite de ces résultats, nous avons d'une part utilisé des volumes ne dépassant pas 300  $\mu$ l et d'autre part pour les différents échantillons d'une même expérience, nous avons utilisé le même volume d'extrait pour doser l'AP

## II- ACTIVITE AUXINE-OXYDASIQUE : AAO

Dans les extraits bruts de tissus de racine avant leur mise en culture, nous avons pu mettre en évidence une faible activité auxine-oxydasique. Celle-ci n'est plus ou peu décelée après 6 jours de culture. Nous savons que cette activité est très sensible à la présence d'inhibiteurs et notamment de composés phénoliques (GALSTON et al. 1953; RAY 1958; GASPAR 1965; GASPAR et al., 1964). LOOMIS et BATAILLE (1966) ont montré que, lors de l'extraction, ces composés phénoliques oxydés peuvent former des liaisons covalentes avec les protéines. Nous avons donc pensé à utiliser le polyvinylpyrrolidone insoluble (PVP: Polyclar insoluble) qui est capable de fixer tout ou partie des phénols.

Nous avons donc à partir de tissus de racines réalisé des extraits enzymatiques en mélangeant à 1 gramme de poudre végétale des quantités variant de 100 à 400 mg de Polyclar, pour 3 ml de tampon d'extraction (fig. 11).



**Figure 11:** Influence de la quantité de polyclar ajoutée au cours de l'extraction, sur les activités auxine-oxydasique et peroxydasique d'explantats racinaires avant leur mise en culture.



L'activité auxine-oxydasique des extraits obtenus en présence de 100 mg de polyclar est deux fois plus importante que celle dosée à partir de l'extrait ne contenant pas de polyclar. Des quantités supérieures diminuent faiblement cette activité, qui reste toujours supérieure à celle mesurée sans polyclar.

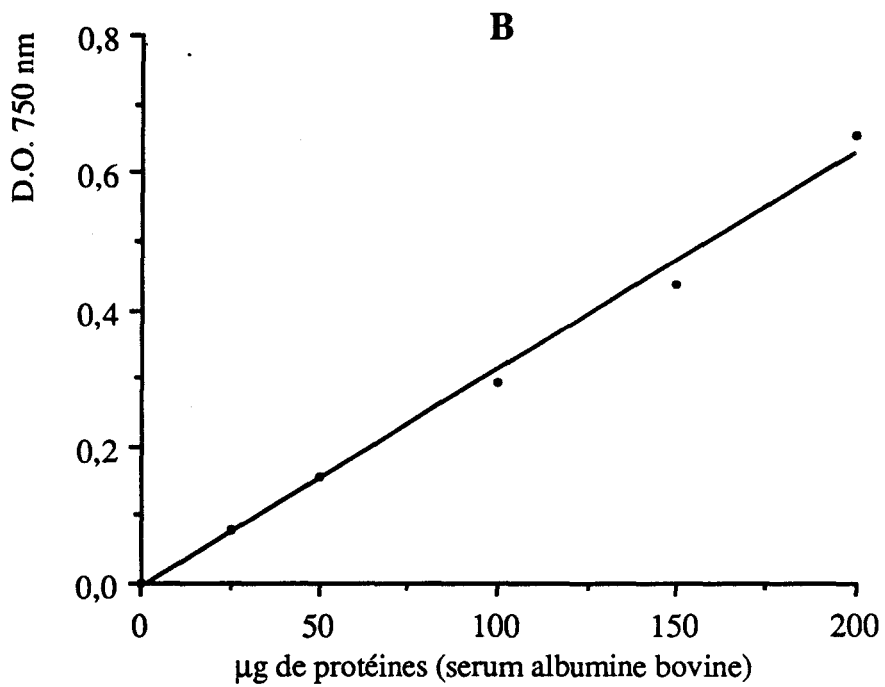
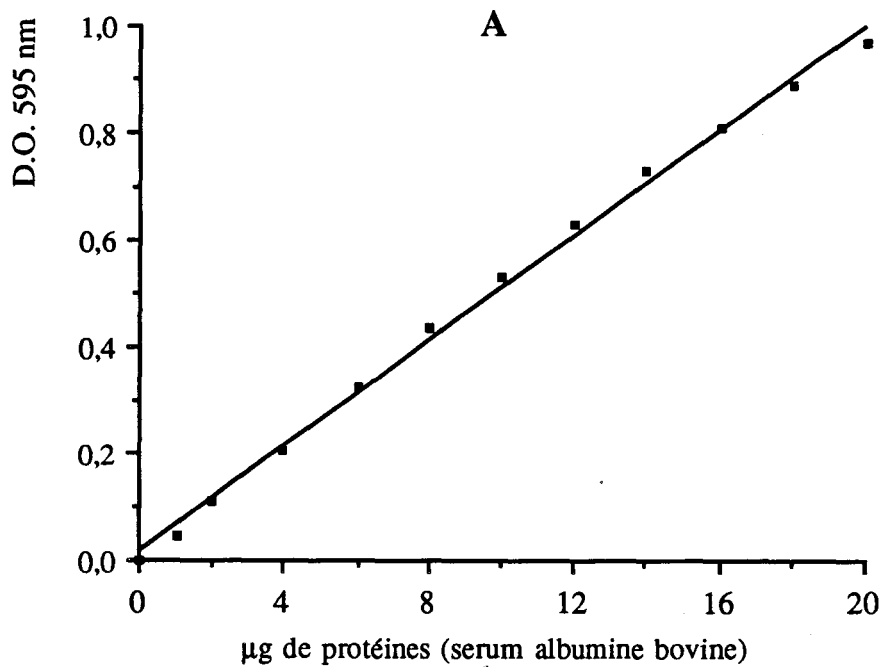
Par ailleurs, plus la quantité de polyclar est grande moins l'activité peroxydasique est forte. Cette diminution d'activité est relativement faible pour 100 mg de polyclar. Par conséquent, puisque nous voulions mesurer simultanément l'AP et l'AAO nous avons choisi le protocole d'extraction suivant :

- 1 g de poudre végétale
- 100 mg de polyclar
- 3 ml de tampon K-Na pH 6,8 1/15 M.

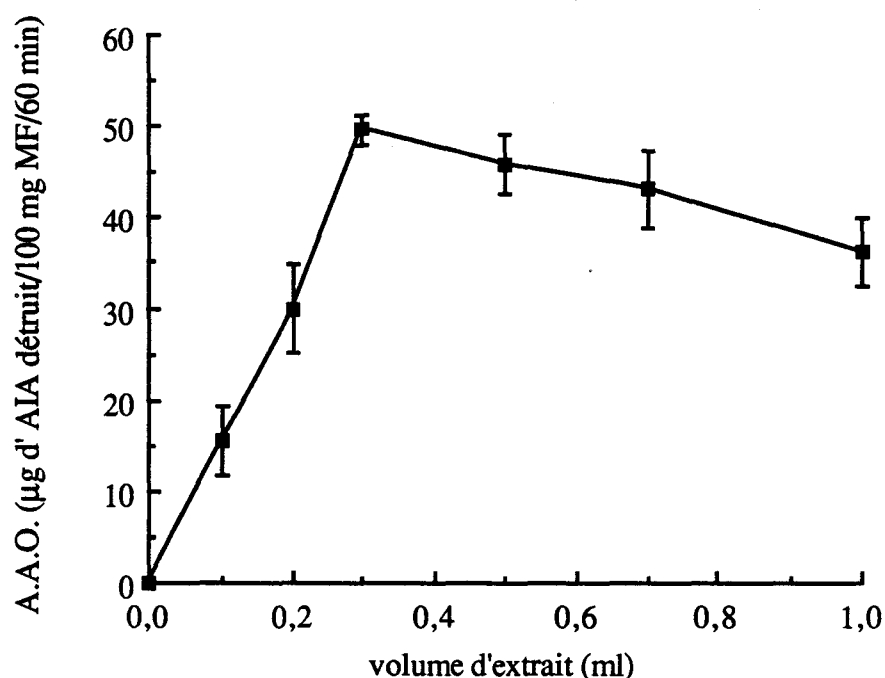
### **2.1. Recherche du volume optimal d'extrait enzymatique pour mesurer l'AAO**

A partir d'explants de feuille d'endive, VASSEUR et LEGRAND (1972), LEGRAND (1976) ont montré l'importance du volume d'extrait sur la mesure de l'activité auxine-oxydasique. En effet ces tissus de feuilles sont riches en composés phénoliques, qui suivant leur concentration dans le mélange d'incubation sont capables de diminuer, voir de bloquer l'activité auxine-oxydasique.

L'examen des résultats de la figure 12 montre qu'il y a proportionnalité entre la quantité d'AIA détruite et les volumes d'extrait compris entre 0,1 et 0,3 ml mais pour des volumes supérieures, nous constatons une diminution de l'activité auxine-oxydasique de plus en plus prononcée. Cette diminution par les extraits trop concentrés pourrait s'expliquer par la présence de composés phénoliques, dont la concentration dans le mélange d'incubation deviendrait alors inhibitrice.



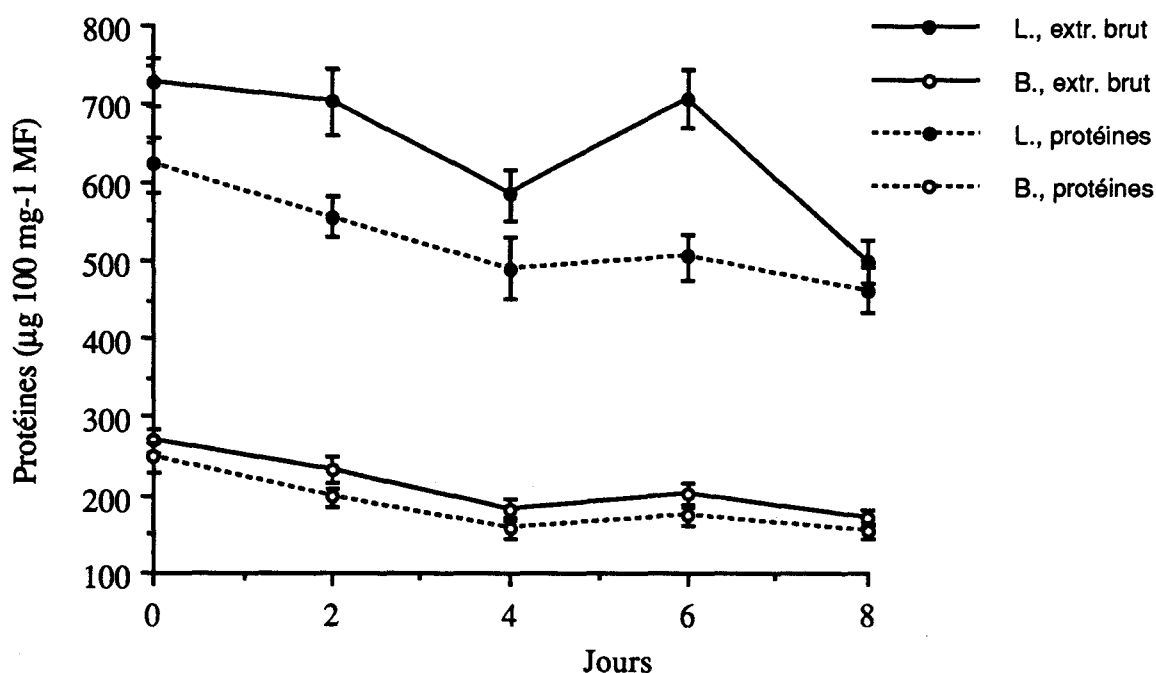
**Figure 13:** Courbe d'étalonnage en fonction de la concentration en sérum albumine bovine dans le mélange réactionnel. Le dosage des protéines est fait selon la méthode de BRADFORD (1976) (A) ou de LOWRY (1951) (B).



**Figure 12:** Influence du volume d'extrait sur l'activité auxine-oxydasique. La moyenne et les écart-types ont été calculés sur 3 extraits enzymatiques.

### III- DOSAGE DES PROTEINES

Afin d'exprimer les activités enzymatiques par rapport aux protéines contenues dans l'extrait (APS) nous avons utilisé deux méthodes d'extraction et de mesure. La première consistait à extraire les protéines selon la technique citée précédemment (fig. 7) et la deuxième consistait à doser les protéines directement à partir des extraits bruts obtenus selon la méthode décrite dans la figure 8. La teneur en protéines est ensuite mesurée selon la méthode de LOWRY et al. (1951) ou celle de BRADFORD (1976) puis évaluée par référence aux courbes étalons correspondantes établies avec le sérum albumine bovine (fig. 13).



**Figure 13'**: Variation de la teneur en protéines mesurée selon la méthode de LOWRY (L.) ou de BRADFORD (B.) à partir d'un extrait brut (extr. brut) ou après extraction des protéines (protéines). La moyenne et les écart-types ont été calculés sur 3 extraits enzymatiques.

Les résultats obtenus (fig. 13') montrent d'une part, que quelle que soit la méthode de dosage utilisée, la teneur en protéine est plus faible dans les extraits obtenus après extraction des protéines que celle dosée directement à partir des extraits bruts, d'autre part elle est plus forte lorsqu'on procède à un dosage par la méthode de LOWRY que lorsque celui-ci est effectué par la technique de BRADFORD. Les différences observées entre les deux techniques sont probablement dues aux interférences entre les composés phénoliques et le réactif dans le cas du dosage classique de LOWRY.

Etant donné qu'il y a une même évolution de la teneur en protéines, quelle que soit la méthode d'extraction et de mesure utilisée, nous avons préféré l'utilisation de la technique de BRADFORD en partant directement de l'extrait enzymatique brut.

## CONCLUSION

L'adaptation des mises au point des techniques à notre matériel nous a permis de mettre en évidence la nécessité d'établir des protocoles expérimentaux rigoureux aussi bien pour l'extraction que pour les dosages. Le respect des conditions expérimentales, température, rapport poids-volume pour l'extraction, utilisation de volumes identiques d'extraits enzymatiques pour chaque échantillon lors du dosage et le choix de la méthode d'extraction et de dosage des protéines nous ont permis d'obtenir des résultats fiables et comparables.

Au cours de nos expériences nous avons constaté qu'il est impossible de doser une activité auxine-oxydasique à partir d'un extrait brut. Il était donc nécessaire d'ajouter au cours de l'extraction du polyvinylpyrrolidone insoluble (polyclar) qui nous a permis de démasquer l'AAO en évitant la fixation des composés phénoliques sur les protéines, mais en même temps une diminution de l'activité peroxydasique a été constatée. Ces résultats mettent donc, en évidence que des effecteurs, c'est-à-dire des composés phénoliques capables d'intervenir sur les activités enzymatiques n'ont pas le même rôle suivant la fonction catalytique envisagée : un inhibiteur de l'activité auxine-oxydasique pourrait être activateur de l'activité peroxydasique.

Lors du dosage des protéines dans les extraits, nous avons constaté d'une part, que lorsque l'on utilise les extraits bruts, la teneur en protéines est toujours plus élevée que lorsque l'on procède à une extraction préalable des protéines des extraits, d'autre part que les quantités de protéines mesurées par la méthode de LOWRY sont supérieures à celles trouvées par celle de BIORAD. Ceci laisse supposer qu'il y a plus d'interférences des composés phénoliques avec la méthode de LOWRY comparée à celle de BRADFORD surtout quand il s'agit d'un extrait brut. Par conséquent, le choix a été porté sur la méthode de BRADFORD car, en plus de sa facilité d'utilisation elle présente plusieurs avantages par rapport à celle de LOWRY :

- elle demande un seul réactif et se fait après 5 min (au lieu de 3 réactifs dans le cas du dosage de LOWRY qui demande 60 min).
- l'absorbance de la coloration des protéines complexées est stable.
- elle est sensible même pour de très faibles quantités de protéines.
- il n'y a pas ou peu d'interférences avec les composés phénoliques, contrairement à la méthode de LOWRY.

## B- RELATION ENTRE MORPHOGENESE ET PROFILS PEROXYDASIQUES ET ISOPEROXYDASIQUES

La morphogénèse des explantats racinaires de *Cichorium intybus* peut être influencée par modification de la composition du milieu de culture. C'est ainsi qu'au laboratoire, la prolifération de cals indifférenciés (VASSEUR et SENE, 1984) et/ou la différenciation soit de racines (VASSEUR et al. 1986) soit de bourgeons (LEFEBVRE, 1979) ont été obtenues, en photopériode 12/12.

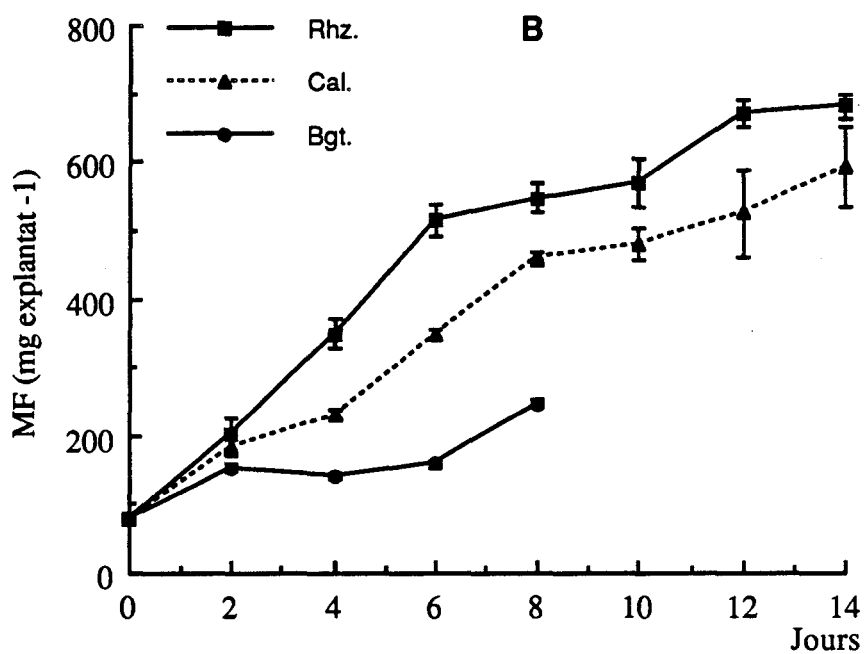
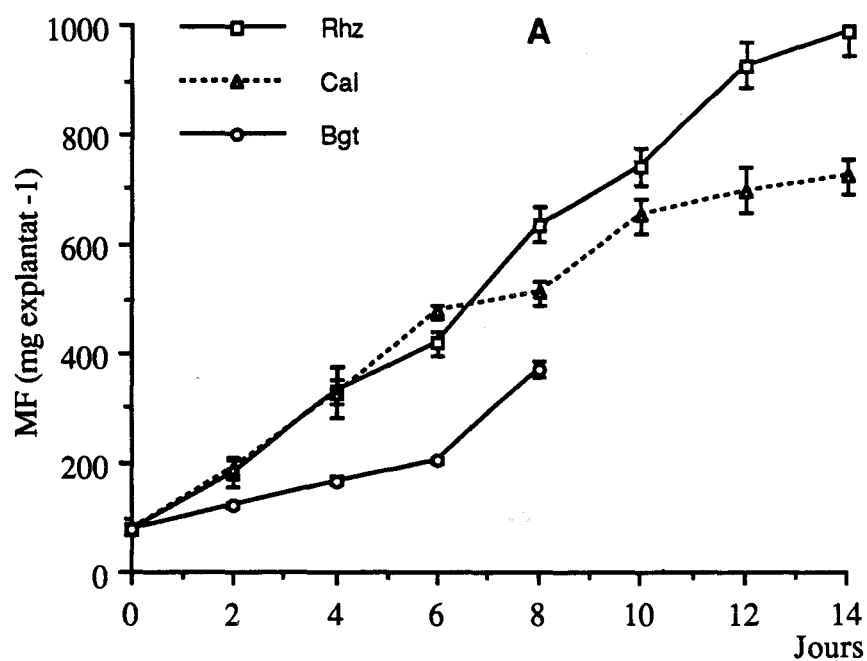
Par ailleurs, TRAN THANH VAN (1981) a montré que la morphogénèse des tissus de plantes supérieures cultivés *in vitro* était sous le contrôle de l'interaction entre les phytohormones exogènes et endogènes. Dans ce contexte, par sa participation dans la dégradation de l'AIA et donc son implication dans la régulation de la balance hormonale, la peroxydase est une enzyme d'un intérêt particulier qui peut moduler la morphogénèse des plantes.

C'est pourquoi nous avons entrepris d'étudier le développement, l'activité peroxydasique et l'équipement isoperoxydasique d'explantats cultivés sur les milieux de culture, légèrement modifiés, des auteurs précités (tableau 2). Ces modifications portent sur l'ajout du chlorure ferrique non chélaté à  $4 \cdot 10^{-2}$  M dans les différents milieux et l'absence de cytokinine pour le milieu de bourgeonnement.

Pour ces expériences nous avons par ailleurs choisi de cultiver les explantats soit en lumière continue, soit à l'obscurité totale. LEGRAND (1987) a en effet montré que le moment de prélèvement des explantats après le passage nuit-jour avait une grande influence sur les variations de l'activité peroxydasique, l'eupériode est donc un bon moyen de supprimer cet écueil.

	Milieu callogène	Milieu rhizogène	Milieu caulogène
Milieu de base	Heller	Heller	Heller
Glucose (M)	-	$5,5 \cdot 10^{-2}$	$10^{-2}$
Kinéline (M)	$10^{-7}$	$10^{-7}$	-
ANA (M)	$5 \cdot 10^{-5}$	$10^{-6}$	-
AG3 (M)	-	$10^{-5}$	-
Inositol (mg l <sup>-1</sup> )	100	-	-
Glutamine (mg l <sup>-1</sup> )	250	-	-
Vitamines de MS (ml l <sup>-1</sup> )	10	-	-
Gélose (g l <sup>-1</sup> )	6	6	6

**Tableau 2:** Composition des milieux callogène (VASSEUR et SENE, 1984), rhizogène (VASSEUR et al., 1986) et caulogène (LEFEBVRE, 1979). MS= MURASHIGE et SKOOG (1962).



**Figure 14:** Variations de la masse de matière fraîche (MF) d'explantats racinaires de *Cichorium intybus* cultivés à la lumière (A) ou à l'obscurité (B) sur le milieu de rhizogénèse (Rhz.), de callogénèse (Cal.) ou de bourgeonnement (Bgt.).

## I- MORPHOGENESE ET CROISSANCE

### 1.1. Développement des explantats

Après 4 jours de culture, les cals commencent à apparaître et ceci quelle que soit la composition du milieu de culture.

L'émergence des organes sur les milieux induisant l'organogenèse est visible entre le dixième et le douzième jour pour les bourgeons et à partir du seizième jour pour les racines.

Après 25 jours de culture, sur le milieu de bourgeonnement, les cals sont compacts et petits. Ils sont verts à la lumière mais blancs à l'obscurité (planche 1). La capacité de bourgeonnement est de 100 % quand les explantats sont cultivés en lumière continue par contre à l'obscurité, on n'a que 70 % d'explantats présentant au moins un bourgeon.

Dans les conditions rhizogènes, les cals sont bien développés et mous. Quand ils sont éclairés, ils sont vert-jaunes par contre à l'obscurité ils sont de couleur blanche (planche 1). Le pourcentage d'explantats rhizogènes atteint 64 % et 58 % respectivement à la lumière et à l'obscurité.

Sur le milieu callogène, les cals sont de même consistance et de même couleur que ceux cultivés sur le milieu rhizogène. Sur ce milieu on n'observe qu'une prolifération cellulaire sans aucun organe différencié (planche 1).

### 1.2- Action sur la croissance

Trois critères ont été utilisés pour exprimer la croissance : la masse de la matière fraîche (MF), la masse de la matière sèche (MS) et la teneur en protéines.

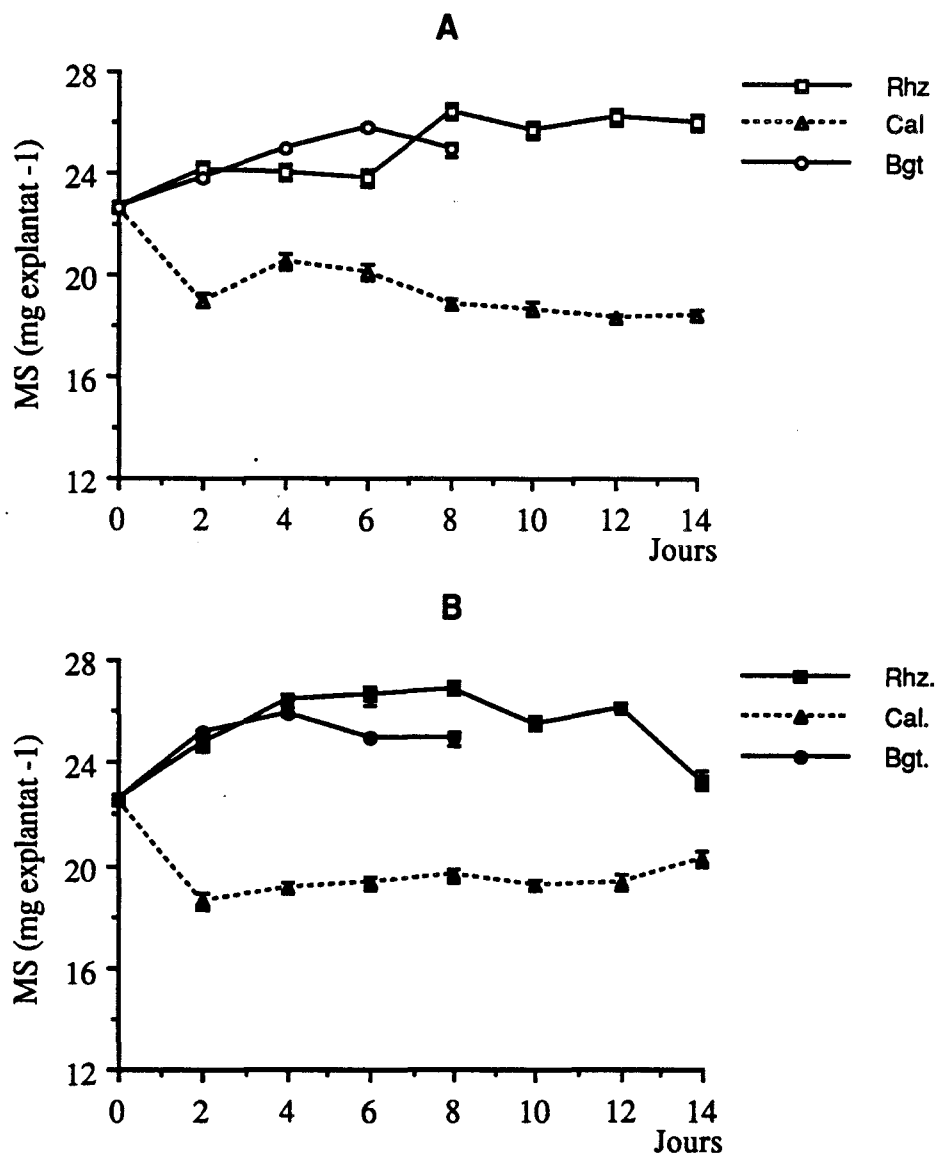
#### 1.2.1. Matière fraîche

Quel que soit le milieu de culture utilisé, la masse de la matière fraîche augmente régulièrement pendant toute la durée de culture (fig. 14). Faible sur le milieu caulogène, cette augmentation est considérable pour les deux autres milieux de culture. Enfin, les explantats éclairés (fig. 14 A) présentent une biomasse plus importante que ceux placés à l'obscurité (fig. 14 B).



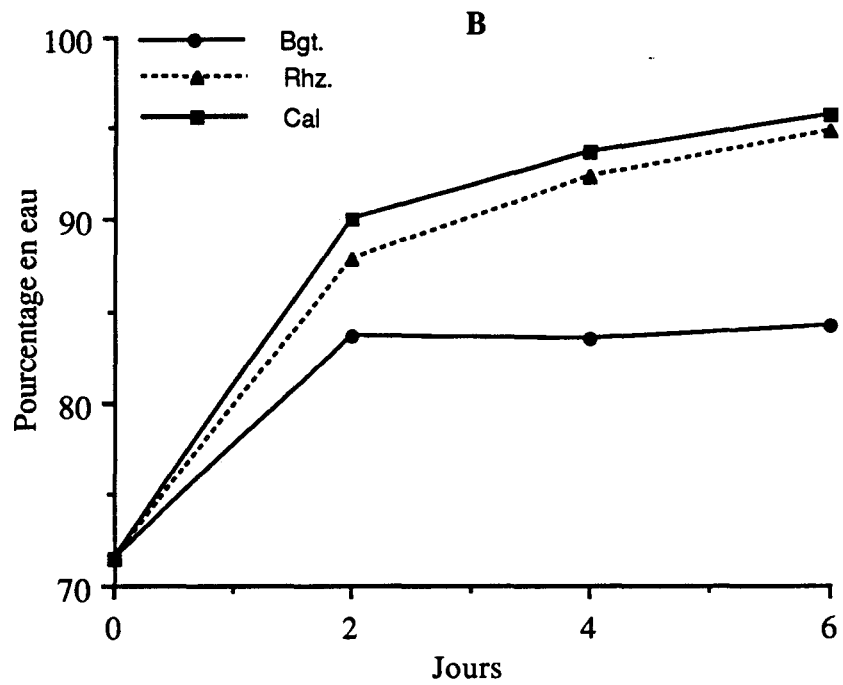
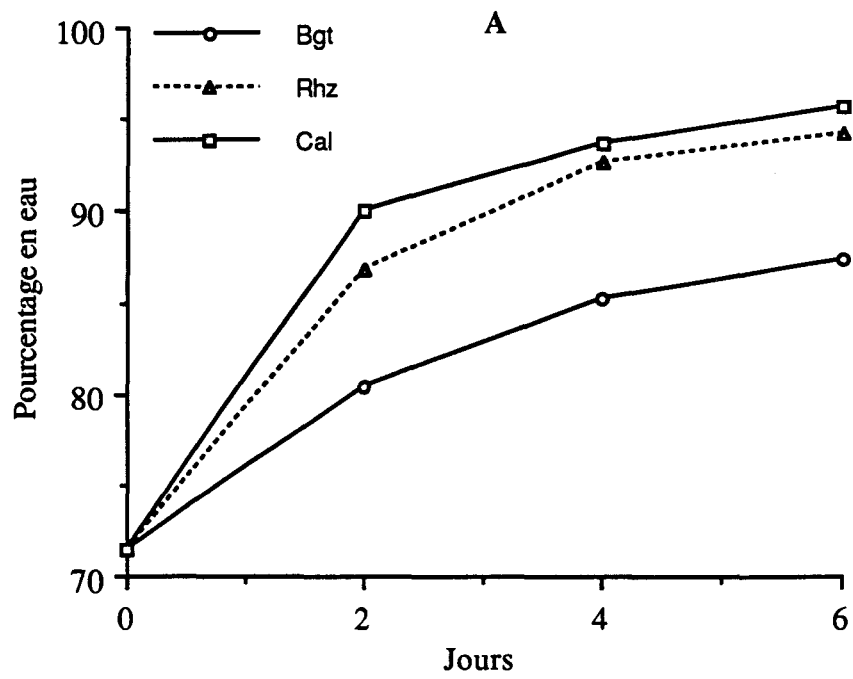
### 1.2.2. Matière sèche

Les variations de la masse de la matière sèche sont très différentes suivant les milieux de culture utilisés (fig. 15)



**Figure 15:** Variations de la masse de la matière sèche (MS) d'explantats racinaires de *Cichorium intybus* cultivés à la lumière (A) ou à l'obscurité (B) sur le milieu de rhizogenèse (Rhz.), de callogénèse (Cal.) ou de bourgeonnement (Bgt.).

Sur le milieu caulogène, une augmentation faible et progressive jusqu'au sixième jour, à la lumière (fig. 15 A) et au quatrième jour de culture, à l'obscurité (fig. 15 B) suivie d'une diminution peu importante est constatée.



**Figure 16:** Variation du pourcentage en eau d'explantats racinaires de *Cichorium intybus* cultivés à la lumière (A) ou à l'obscurité (B).

Une faible augmentation rapidement stabilisée est observée sur le milieu de rhizogénèse. Par contre sur le milieu callogène, on constate une faible et longue diminution de la masse de la matière sèche.

Quel que soit le milieu de culture utilisé, le pourcentage en eau augmente au cours de la culture (fig. 16). Cette augmentation est rapide en début de culture et s'affaiblit entre le deuxième et le sixième jour et quelles que soient les conditions d'éclairage, elle est plus importante dans les explantats cultivés sur le milieu de callogénèse et rhizogénèse que dans ceux cultivés sur le milieu de bourgeonnement. Ainsi, avant la mise en culture, la teneur en eau des explants est de 71,4 % du poids frais. Au sixième jour la prise en eau atteint environ 20 % dans les explantats cultivés sur le milieu de callogénèse et de rhizogénèse et seulement 10 % sur le milieu de bourgeonnement (fig. 16). Ce qui explique les variations de l'augmentation de la masse de la matière fraîche.

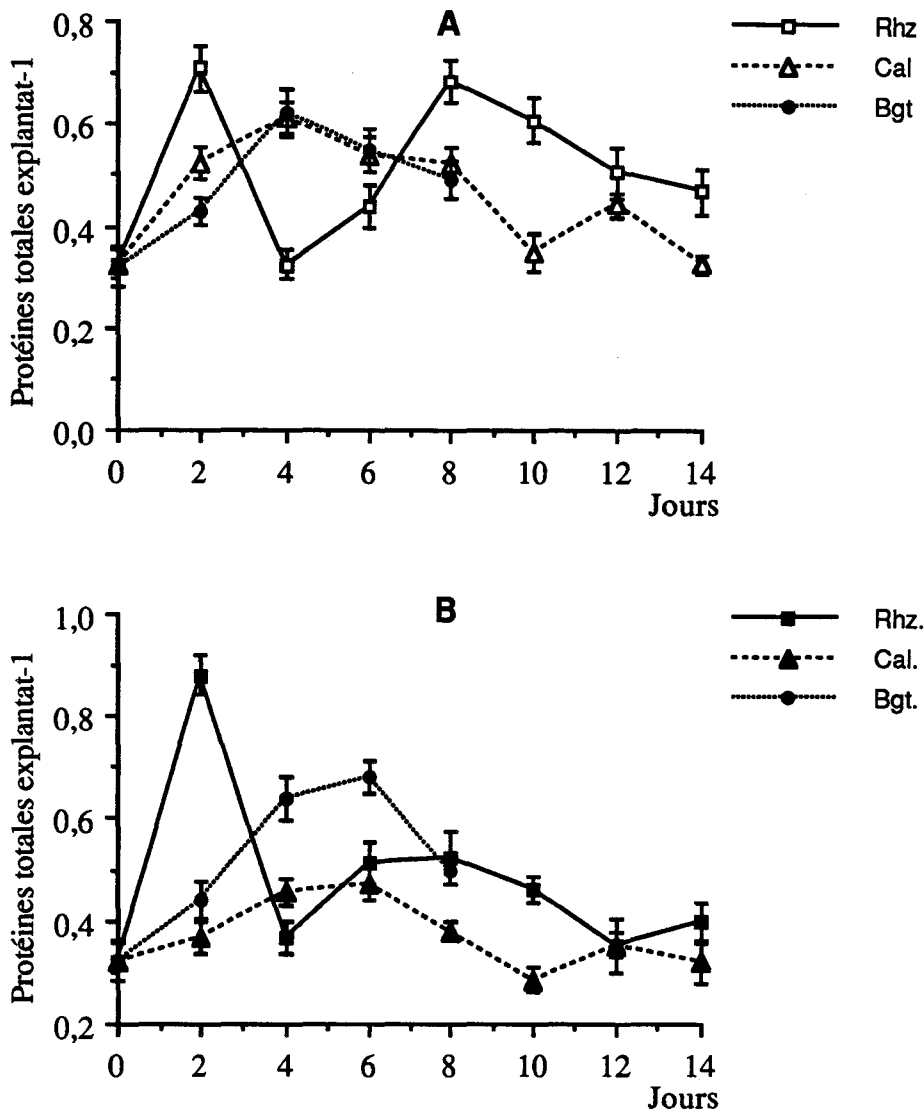
### 1.2.3. Teneur en protéines

La teneur en protéines varie selon que les explantats racinaires sont cultivés sur le milieu caulogène, rhizogène ou callogène (fig. 17).

Sur le milieu de bourgeonnement, la teneur en protéines augmente jusqu'à atteindre son maximum au quatrième et au sixième jour de culture dans les explantats cultivés respectivement à la lumière ou à l'obscurité.

Dans la condition rhizogénèse, la variation de la teneur en protéines est caractérisée à la fois à la lumière et à l'obscurité par deux pics, le premier après deux jours de culture, plus important dans les explantats cultivés à l'obscurité que dans ceux éclairés et le second après huit jours de culture plus aigu à la lumière qu'à l'obscurité.

Sur le milieu de callogénèse, une augmentation de la teneur en protéines durant les quatre et les six premiers jours suivie d'une diminution a été mesurée lorsque les explantats sont cultivés, respectivement, en lumière continue (fig. 17 A) ou à l'obscurité totale (fig. 17 B). Durant toute la durée de culture, la teneur en protéines est plus importante dans les explantats éclairés que dans ceux maintenus à l'obscurité.

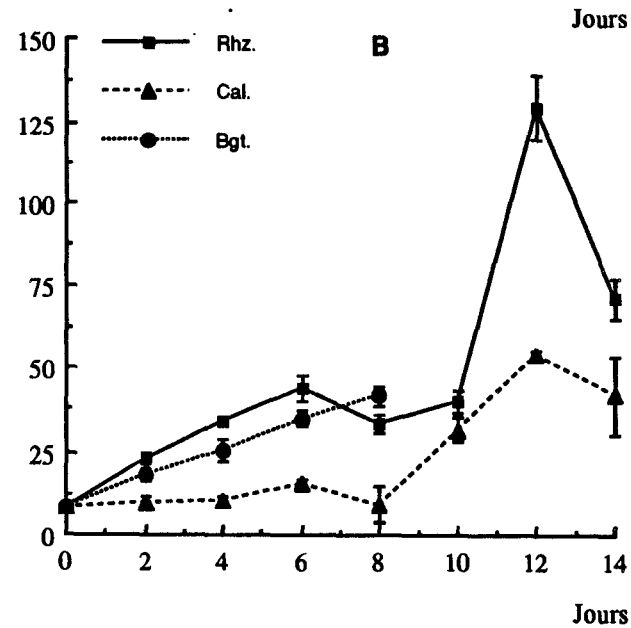
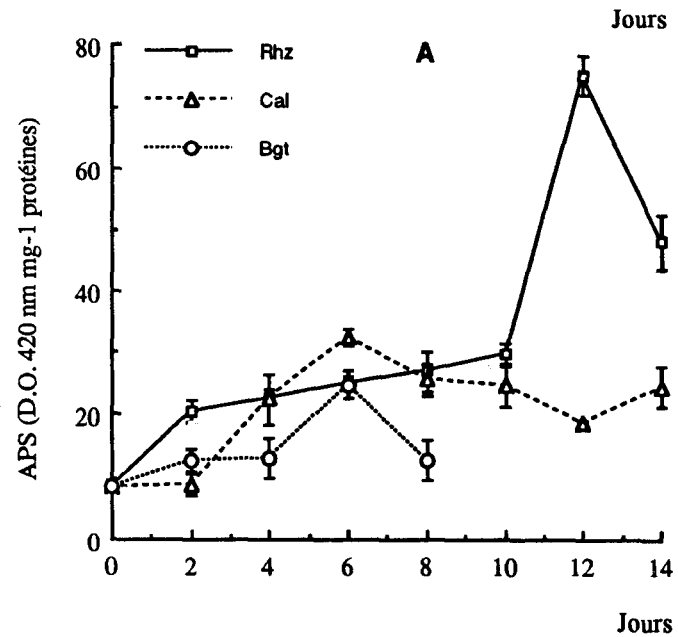
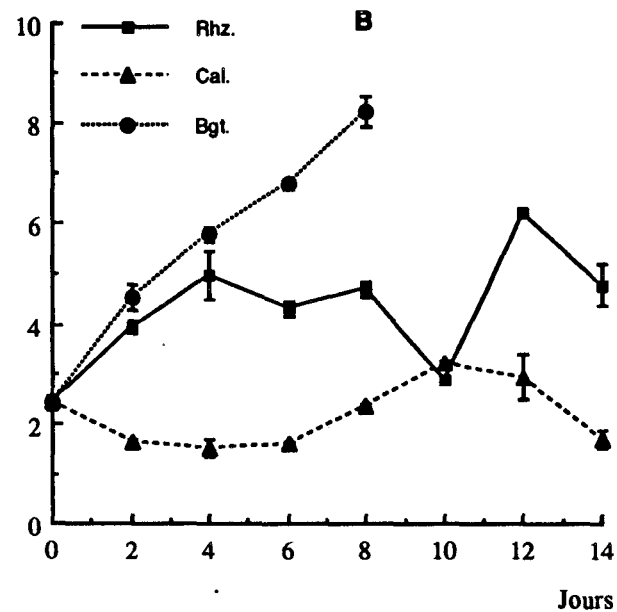
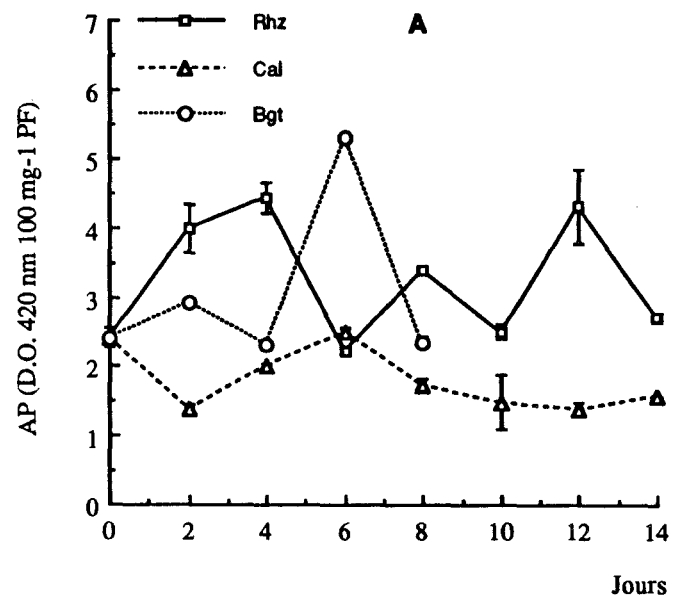


**Figure 17:** Évolution de la teneur en protéines par explantat de *Cichorium intybus* cultivés à la lumière (A) ou à l'obscurité (B) sur le milieu de rhizogenèse (Rhz.), de callogenèse (Cal.) ou de bourgeonnement (Bgt.). La moyenne et les écart-types ont été calculés sur 3 extraits.

## II- ACTIVITE ET PROFILS PEROXYDASIQUES

### 2.1. Cinétiques d'activités peroxydasiques

Les variations cinétiques des activités peroxydasiques sur les différents milieux de culture ont été rapportées à 100 mg de poids frais (AP) ou à l'unité



**Figure 18:** Variations des activités peroxydasiques d'explantats racinaires de *Cichorium intybus* cultivés à la lumière (A) ou à l'obscurité (B) sur le milieu de rhizogénèse (Rhz), de callogénèse (Cal) ou de bourgeonnement (Bgt).

de protéines de l'extrait (APS). Généralement, quel que soit le critère d'expression, les courbes d'activité peroxydasique obtenues sont similaires (fig. 18).

L'activité peroxydasique des explantats cultivés sur le milieu de bourgeonnement augmente continuellement pendant les 8 jours de culture quand les explantats sont privés de lumière (fig. 18 B). Si les explantats sont éclairés (fig. 18 A), l'AP augmente jusqu'au sixième jour et diminue ensuite rapidement. L'APS présente les mêmes variations.

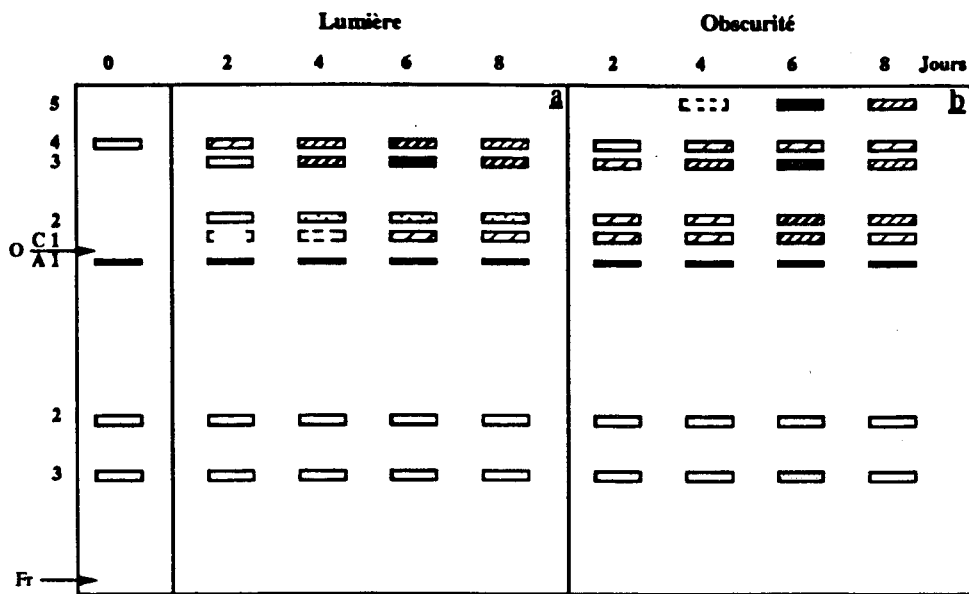
Quand les explantats sont cultivés sur le milieu rhizogène, quelles que soient les conditions d'éclairage, l'activité peroxydasique augmente rapidement durant les 4 premiers jours, diminue ensuite en fluctuant jusqu'au dixième jour pour augmenter brutalement au douzième jour. Deux pics l'un au quatrième et l'autre au douzième jour semblent caractéristiques de l'évolution de l'activité peroxydasique rapportée au poids de matière fraîche. Par contre, si nous nous intéressons à l'APS, le pic du quatrième jour n'est plus décelé alors que celui du douzième jour est exalté par ce mode d'expression.

L'AP ou l'APS des explantats cultivés sur le milieu callogène diminue pendant les deux premiers jours de culture et augmente faiblement jusqu'au sixième jour pour diminuer progressivement jusqu'au quatorzième jour de culture à la lumière. Par contre si les explantats sont cultivés à l'obscurité, l'activité peroxydasique diminue dès la mise en culture jusqu'au sixième jour et augmente faiblement pour atteindre son maximum au dixième jour.

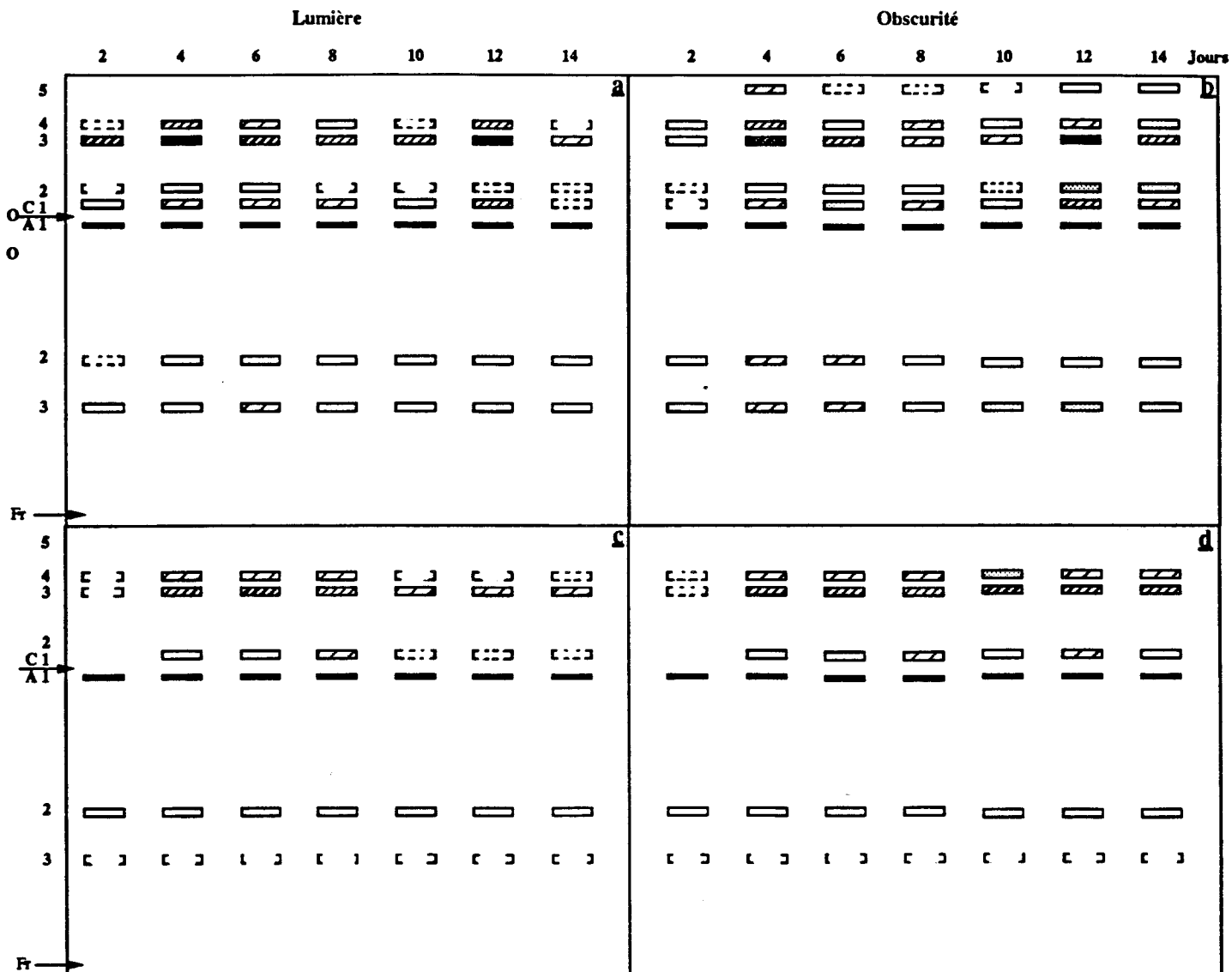
## 2.2. Les profils isoperoxydasiques

Avant leur mise en culture, les explantats racinaires présentent une seule isoperoxydase basique C<sub>4</sub> et 3 isoperoxydases acides A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> et A<sub>3</sub>. Après deux jours de culture, 3 autres isoperoxydases basiques C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> sont révélées sur le milieu de bourgeonnement et sur le milieu de rhizogenèse (fig. 19 et 20 a-b). Si les bandes C<sub>1</sub>, C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub> restent communes pour les différents traitements, l'isoperoxydase C<sub>2</sub> fait défaut durant toute la durée de culture sur le milieu de callogenèse (fig. 20 c et d).

Quand les explantats sont privés de lumière, une isoperoxydase basique C<sub>5</sub> (photo 1), ayant une grande mobilité électrophorétique, apparaît dès le quatrième jour sur le milieu de bourgeonnement et sur le milieu de rhizogenèse (fig. 19 b et 20 b) alors qu'elle n'est pas révélée sur le milieu de callogenèse (fig. 20 d).



**Figure 19:** Evolution des isoperoxydases d'explantats racinaires de *Cichorium intybus* cultivés sur le milieu de bourgeonnement. O= Origine du dépôt, Fr= limite du front de migration.

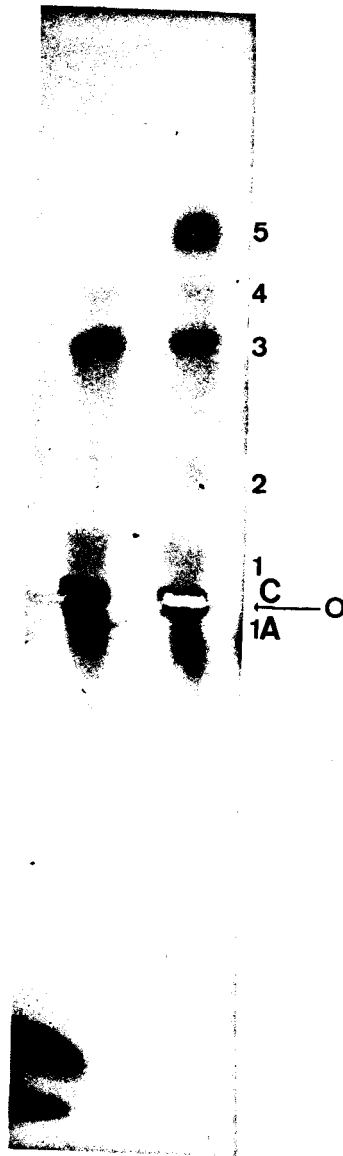


**Figure 20:** Diagramme électrophorétique montrant l'évolution des isoperoxydases des explantats racinaires de *Cichorium intybus* cultivés sur le milieu rhizogène (a et b) ou callogène (c et d).

Les variations observées au niveau des isoperoxydases basiques concernent leur intensité de coloration, donc leur activité, en fonction du temps et du milieu de culture utilisé. En effet, l'isoperoxydase C<sub>3</sub> présente toujours une activité plus élevée que celle des isoperoxydases C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> et de C<sub>4</sub>. Quelles que soient les conditions d'éclairement, elle atteint son maximum au sixième jour sur le milieu de bourgeonnement, au quatrième et au douzième jour de culture sur le milieu de rhizogenèse. Par contre, sur le milieu de callogenèse, cette isoperoxydase varie peu au cours de la culture.

Du côté anodique les isoperoxydases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> et A<sub>3</sub> sont communes pour les différents traitements et aucune conclusion générale ne peut être tirée à partir des variations de l'activité de ces isoenzymes. Il faut noter que, lors de la révélation des gels, l'isoperoxydase A<sub>1</sub> est très active et apparaît rapidement, alors que pour l'isoperoxydase A<sub>2</sub> le temps de révélation est très long, enfin l'isoperoxydase A<sub>3</sub> n'est révélée qu'avec le mélange d'incubation H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-gäïacol, elle aurait donc très peu d'affinité pour la benzidine.





**Photo 1:** Diagramme électrophorétique d'extraits de racine de chicorée cultivés pendant 6 jours à la lumière (A) ou à l'obscurité (B)

## CONCLUSION

En modifiant la composition du milieu de culture la morphogénèse des explantats racinaires a été orientée vers la production soit de bourgeons, soit de racines ou de cals.

La capacité de bourgeonnement atteint 100 % et 70 % respectivement à la lumière et à l'obscurité. Sur le milieu rhizogène seuls 58 % d'explantats sont rhizogènes à l'obscurité contre 64 % à la lumière.

Durant cette morphogénèse, des variations au cours de la croissance ont été observées. En effet l'augmentation graduelle du poids de la matière fraîche est plus importante quand les explantats sont cultivés sur le milieu de rhizogénèse ou de callogénèse que lorsqu'ils sont cultivés sur le milieu de bourgeonnement. Cette augmentation est plus importante à la lumière qu'à l'obscurité. De plus, si sur le milieu caulogène et rhizogène une faible augmentation de la masse de matière sèche a été constatée sur le milieu callogène, la MS diminue.

La teneur en protéines varie également en fonction du milieu de culture utilisé. Sur le milieu rhizogène, le maximum de protéines est mesuré dès le deuxième jour de culture alors que sur le milieu de bourgeonnement et de callogénèse il est au quatrième et au sixième jour respectivement à la lumière et à l'obscurité. Au niveau des pics d'activité peroxydasique, la teneur en protéines est moins importante à la lumière qu'à l'obscurité sauf pour le milieu de callogénèse où le phénomène inverse a lieu. Suite à ces variations des protéines totales, nous avons pensé que le calcul de l'activité peroxydasique par rapport à la teneur en protéines était nécessaire.

Les profils cinétiques d'activité peroxydasique diffèrent selon la réponse morphogène des explantats. Ainsi au cours de la néoformation de bourgeons ou de racines, l'activité peroxydasique augmente et présente un pic précédent toujours l'émergence des organes. Par contre de faibles variations peroxydasiques caractérisent les tissus callogènes.

Dans les conditions organogènes, quel que soit le critère d'expression, l'activité peroxydasique est toujours plus forte à l'obscurité qu'à la lumière par contre sur le milieu callogène, elle est plus importante à la lumière qu'à l'obscurité en début de culture et après le huitième jour on note le phénomène inverse.

En ce qui concerne les profils isoperoxydasiques, aucune différence n'a été décelée entre la néoformation de bourgeons ou de racines, par contre dans les tissus non

organogènes une isoperoxydase basique (C<sub>2</sub>) est absente quelles que soient les conditions d'éclairement.

Quand les explantats différenciant des organes sont cultivés à l'obscurité une nouvelle isoperoxydase basique (C<sub>5</sub>) ayant la plus grande mobilité électrophorétique a été révélée. Par contre sur le milieu non organogène elle est absente.

## **C- INFLUENCE DU GLUCOSE ET DES RÉGULATEURS DE CROISSANCE SUR LE DEVENIR DE LA MORPHOGENESE ET DES PROFILS PEROXYDASIQUES ET ISOPEROXYDASIQUES**

A la suite des expériences précédentes, nous nous sommes posé la question de savoir si les variations de l'activité peroxydasique étaient dues aux processus morphogénétiques ou plutôt aux effets de la composition différente des milieux de culture. Nous avons donc entrepris d'étudier l'influence du glucose et des régulateurs de croissance, pris séparément ou associés, sur la morphogénèse et sur les enzymes du catabolisme auxinique.

### **I- LE GLUCOSE**

Les travaux antérieurs de LEGRAND (1987) avaient montré une influence très nette du glucose à la fois sur les capacités de bourgeonnement des explantats racinaires de *Cichorium intybus* et sur l'activité des peroxydases solubles. Nous avons repris ces expériences et élargi le champ d'investigation en nous intéressant non seulement à l'activité peroxydasique, mais aussi à l'activité auxine-oxydasique des peroxydases solubles et des peroxydases liées ioniquement et/ou de façon covalente.[Fractions E<sub>1</sub> : solubles, E<sub>2</sub> : ioniques et E<sub>3</sub> : covalentes (§ Matériel et méthodes, page 22)]

#### **1.1. Influence de la concentration en glucose sur le bourgeonnement**

Les résultats concernant la capacité de bourgeonnement ainsi que les nombres moyens de bourgeons néoformés par explantat sont consignés dans le tableau 3.

Sur le milieu sans glucose ou en présence de 0,01 M de glucose, 100 % des explantats cultivés en lumière continue sont capables de régénérer des bourgeons et seulement 70 % quand ils sont cultivés à l'obscurité. Pour des concentrations plus élevés en glucose seulement 40 % d'explantats sont organogènes quelles que soient les conditions d'éclairage.

		Concentration en glucose (M)			
		0	0,01	0,1	0,3
Capacité de bourgeonnement	Lumière	100	100	39	38
	Obscurité	70	68	40	39
Nombre moyen de bourgeons par explantat	Lumière	2,20 ± 0,38	2,69 ± 0,43	0,95 ± 0,31	0,57 ± 0,43
	Obscurité	0,78 ± 0,41	1,25 ± 0,30	1,17 ± 0,22	0,73 ± 0,40

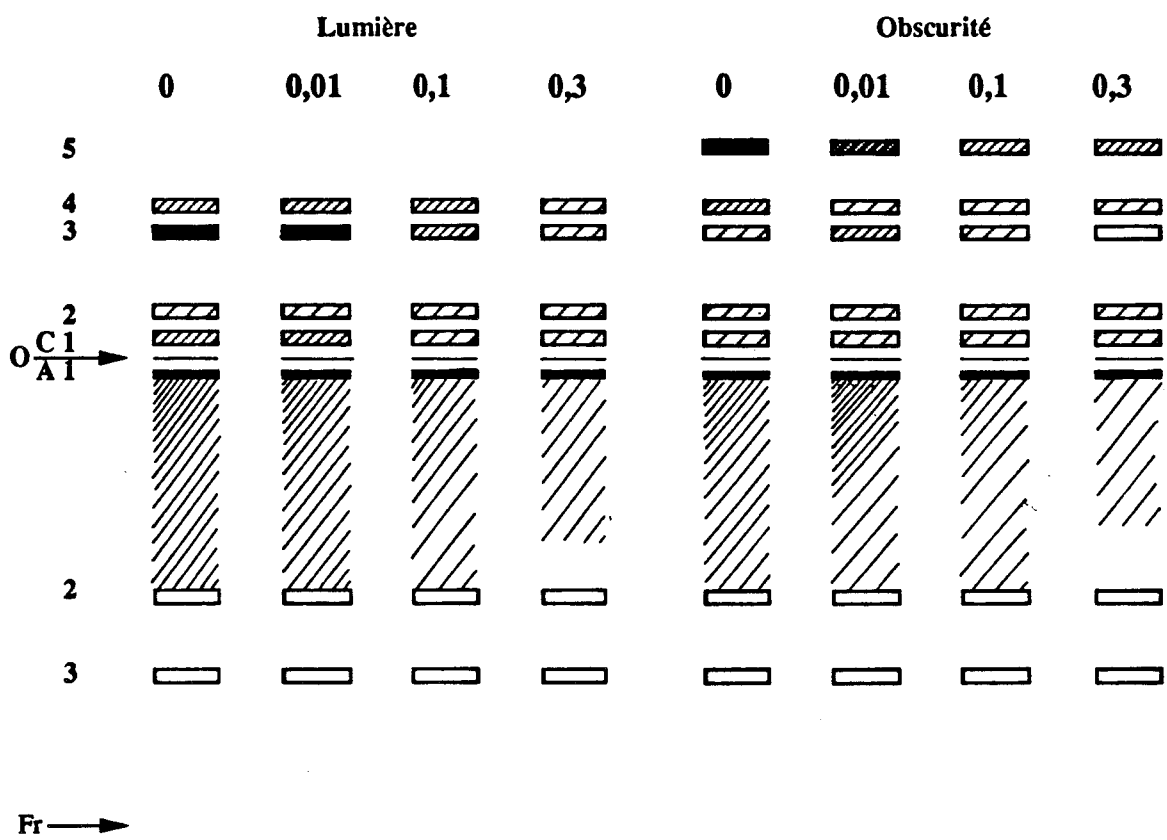
**Tableau 3:** Influence de la concentration en glucose sur le pourcentage de bourgeonnement et sur le nombre moyen de bourgeons néoformés, après 25 jours de culture, à la lumière ou à l'obscurité, par des explantats de racine de *Cichorium intybus*. La moyenne et les écart-types ont été calculés sur 60 explantats racinaires.

Lorsque les cultures sont réalisées en lumière continue, les nombres moyens de bourgeons néoformés par explantat cultivés sur un milieu sans glucose ou en présence d'une faible dose de glucose (0,01 M) sont pratiquement les mêmes (planche 2). Pour des concentrations plus fortes (0,1 et 0,3 M), il est sensiblement diminué. Par exemple il y a 4 fois moins de bourgeons formés pour une concentration de 0,3 M que lorsque la dose est très faible (0,01 M).

Lorsque les tissus sont placés à l'obscurité, les différences trouvées entre les échantillons cultivés sans glucose ou en présence de 0,01 M et 0,1 M sont peu significatives. Mais l'expérience ayant été recommencée plusieurs fois nous avons constaté que c'est toujours à la dose 0,01 M que le nombre moyen de bourgeons est le plus important et que la dose 0,3 M n'est pas favorable au bourgeonnement (planche 2).

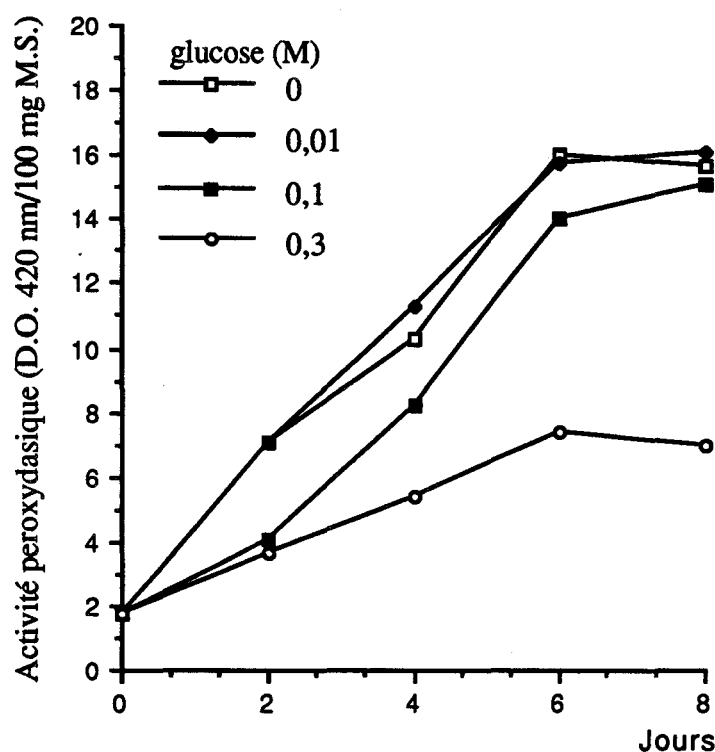
### 1.2. Action du glucose sur la cinétique de l'activité peroxydasique

Les résultats des dosages de l'activité peroxydasique ramenée au poids de la matière sèche pendant les 8 premiers jours de culture sont reportés dans la figure 21.



**Figure 22:** Profils isoperoxydasiques d'extraits de racines de *Cichorium intybus* cultivés pendant 6 jours à la lumière ou à l'obscurité en présence de différentes concentrations en glucose.

Pour chaque traitement, les AP évoluent de façon identique, c'est-à-dire qu'elles augmentent jusqu'au sixième jour puis se stabilisent du sixième au huitième jour. Cette augmentation est plus rapide dans les milieux pauvres en glucose, par contre pour une plus forte concentration (0,3 M), une importante diminution d'activité peroxydasique est observée.

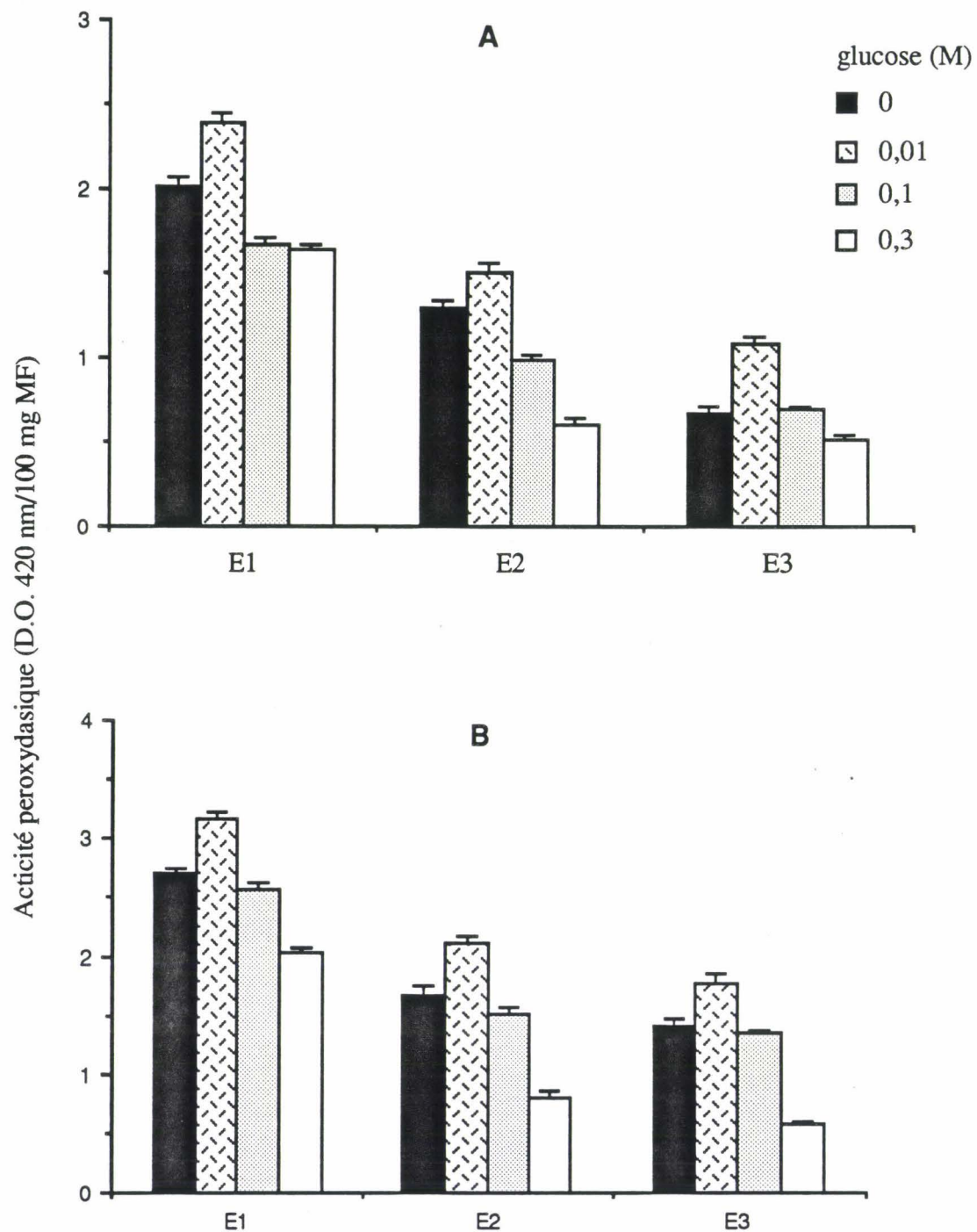


**Figure 21:** Influence de la teneur en glucose sur l'évolution de l'activité peroxydasique dans les explantats racinaires de *Cichorium intybus* cultivés en lumière continue. La moyenne et les écart-types ont été calculés sur 3 extraits enzymatiques.

Aucune différence significative n'a été observée en ce qui concerne les profils isoperoxydasiques en fonction des différents traitements (fig. 22), seule l'intensité de révélation donc de l'activité des isoperoxydases varie.

### 1.3. Influence du glucose sur l'activité des peroxydases solubles (E1), liées ioniquement (E2), et de façon covalente (E3)

Les analyses enzymatiques ont été réalisées sur des tissus cultivés pendant 6 jours en lumière continue ou à l'obscurité totale.



**Figure 23:** Activité peroxydasique des différentes fractions en fonction de la concentration en glucose des tissus d'endive cultivés pendant 6 jours à la lumière (A) ou à l'obscurité (B).



### 1.3.1. Activité peroxydasique des fractions E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> et E<sub>3</sub>

Les peroxydases solubles ont une activité plus forte que celle des peroxydases liées ioniquement dont l'activité est elle même plus importante que celle des peroxydases liées de façon covalente et représentent respectivement 55 %, 30 % et 15 % de l'activité globale.

Cette gradation se retrouve d'une part quelle que soit la dose du sucre utilisée et d'autre part quelle que soient les conditions d'éclairement, lumière (figure 23 A) ou obscurité (figure 23 B).

Nous constatons également que l'activité peroxydasique de chacune des fractions est plus forte quand les tissus sont cultivés à l'obscurité que lorsqu'ils sont éclairés, et qu'elle est toujours maximale quand le milieu contient 0,01 M de glucose.

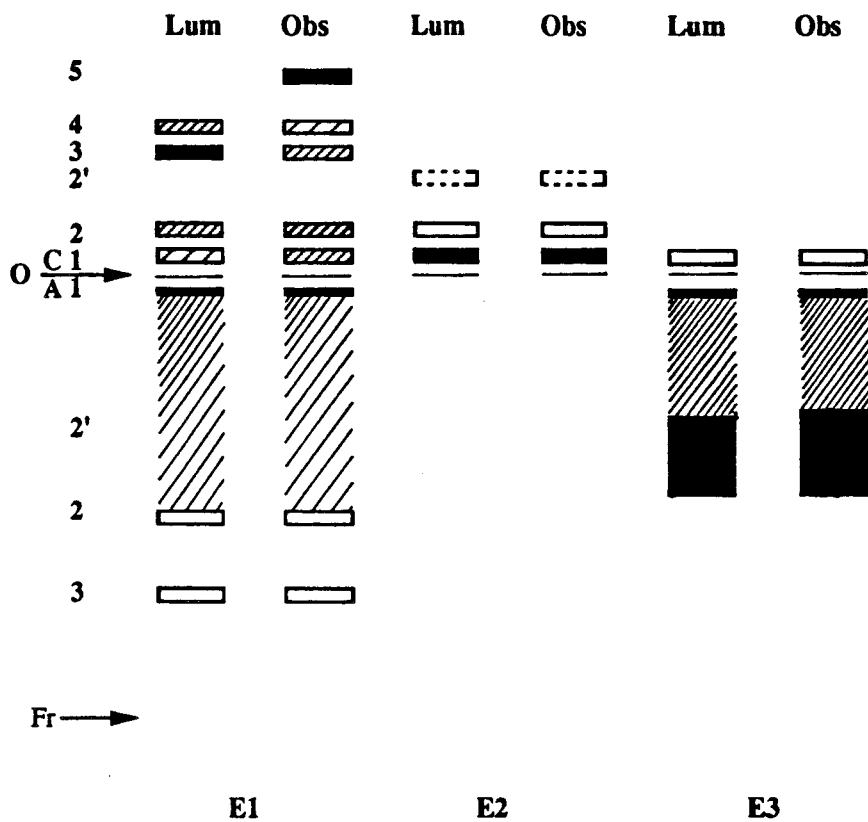
### 1.3.2. Les isoperoxydases des différentes fractions

Les puits aménagés par le "peigne" pour l'électrophorèse peuvent contenir 30 µl d'extrait. Si cette quantité est suffisante pour révéler les peroxydases solubles, elle est insuffisante pour mettre en évidence les peroxydases ioniques ou liées de façon covalente. Nous avons donc fabriqué un autre "peigne" nous permettant des dépôts de 75 µl.

La figure 24 représente les résultats de l'électrophorèse d'extraits des différentes fractions provenant de tissus cultivés pendant 6 jours soit à la lumière soit à l'obscurité sur un milieu contenant 0,01 M de glucose, dose pour laquelle nous avons obtenu le maximum d'activité peroxydasique.

Quand les tissus sont cultivés à la lumière, les peroxydases solubles sont représentées par 4 isoperoxydases cationiques: C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, et C<sub>4</sub>. L'isoperoxydase C<sub>3</sub> ayant une activité plus élevée. Du côté anionique, 3 isoperoxydases A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> et A<sub>3</sub> sont révélées.

Si les tissus sont maintenus à l'obscurité, une isoperoxydase basique C<sub>5</sub> est révélée en plus des 4 précédentes. Cette isoperoxydase présente une très forte activité.



**Figure 24:** Profils isoperoxydasiques des fractions solubles (E1), ioniques (E2) et covalentes (E3) des tissus de racines de *Cichorium intybus* cultivés pendant 6 jours à la lumière continue (Lum) ou à l'obscurité totale (Obs).

Les fractions ioniques sont représentées par 3 isoperoxydases cationiques C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> et C<sub>2'</sub> quand les tissus sont éclairés ou non. C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> ayant la même mobilité électrophorétique que celles des fractions E<sub>1</sub>.

Dans les fractions covalentes, 3 isoperoxydases sont révélées : une basique C<sub>1</sub> et deux acides A<sub>1</sub> et A<sub>2'</sub>. L'activité isoperoxydasique, dans cette fraction est représentée essentiellement par les peroxydases acides A<sub>1</sub> et A<sub>2'</sub>. Nous pensons que du fait de la forte activité, vue la taille de la tâche, que cette isoperoxydase A<sub>2</sub> est en fait composée de plusieurs isoenzymes ou isoformes.

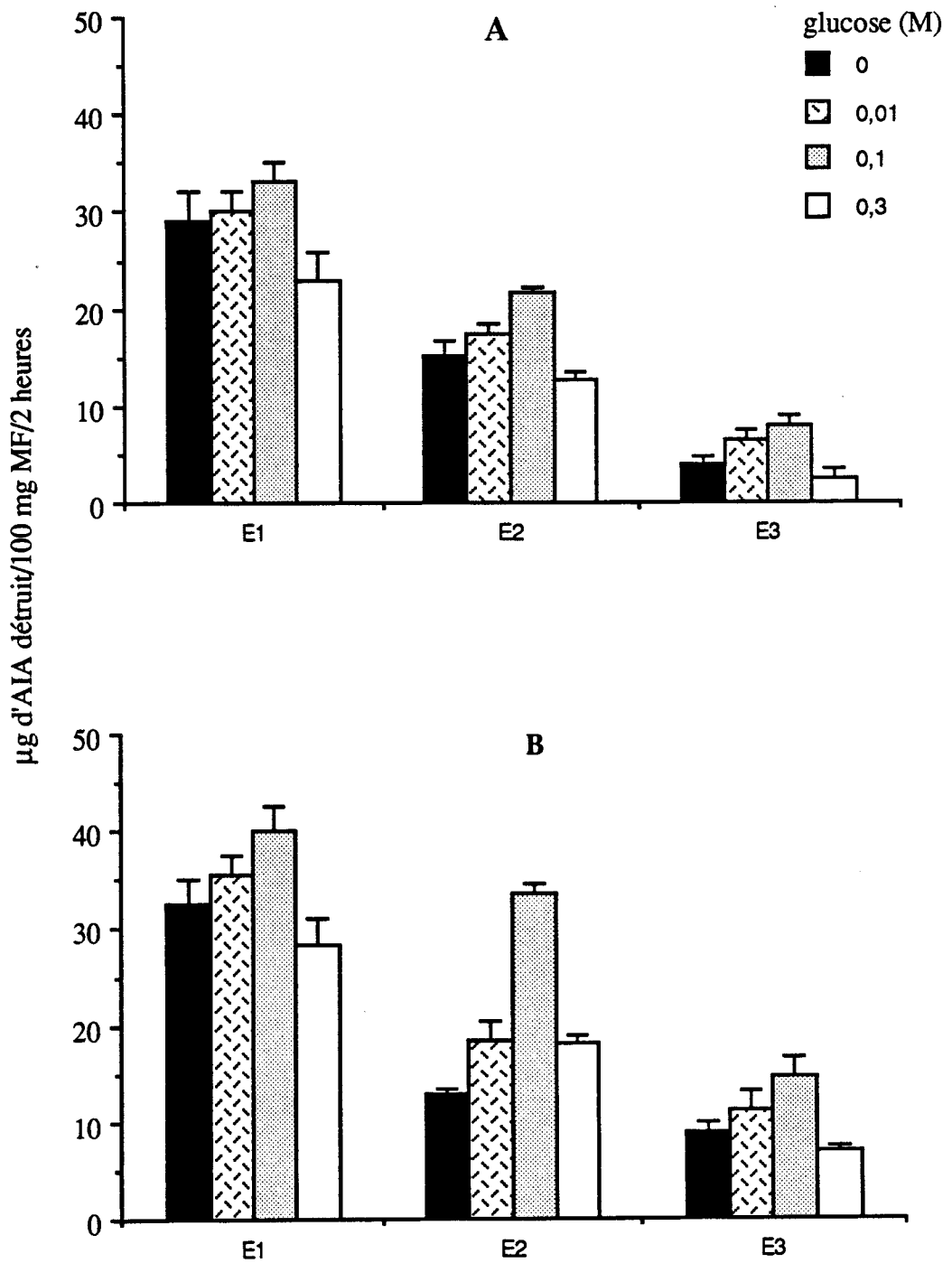
D'après ces résultats, l'isoperoxydase basique C<sub>1</sub> semble commune à toutes les fractions. La fraction ionique est caractérisée par une isoperoxydase C<sub>2'</sub>, alors que pour les fractions covalentes l'importance des isoperoxydases anioniques est considérable.

### .3.3. Activité auxine-oxydasique des différentes fractions:

En ce qui concerne l'activité auxine-oxydasique, la représentation en pourcentage des différentes fractions est la même que celle trouvée pour l'activité peroxydasique.

L'AAO des fractions solubles est plus forte que celle des fractions ioniques, elle même supérieure à celle des fractions covalentes (fig. 25). Ceci est vérifié d'une part quelle que soit la concentration de glucose utilisée, d'autre part quelles que soient les conditions d'éclairement lumière (fig. 25 A) ou obscurité (fig. 25 B).

Il faut également noter que l'activité auxine-oxydasique est plus forte dans les explantats privés de lumière que dans ceux éclairés et que dans tous les cas le maximum et le minimum d'AAO se trouve respectivement en présence de 0,1 et 0,3 M de glucose.



**Figure 25:** Activité auxine-oxydasique des différentes fractions en fonction de la concentration en glucose des tissus d'endive cultivés pendant 6 jours à la lumière (A) ou à l'obscurité (B).

## CONCLUSION

La caulogénèse et les activités peroxydasique et auxine-oxydasique des explantats racinaires de *Cichorium intybus* sont influencées d'une part par la teneur en glucose du milieu de culture et d'autre part par les conditions d'éclairement (lumière ou obscurité).

Lorsque le milieu de culture est additionné de glucose la capacité de bourgeonnement ainsi que le nombre moyen de bourgeons néoformés varient en fonction de la concentration utilisée. Ils sont plus importants en absence ou en présence d'une faible concentration en glucose (0,01 M) et plus faibles pour des concentrations plus fortes (0,1 et 0,3 M).

La lumière continue est plus favorable au bourgeonnement que l'obscurité quand les concentrations en glucose sont faibles (0,01 M) ou nulles. Cependant, en présence de fortes concentrations en glucose, nous constatons le phénomène inverse c'est-à-dire qu'il y a plus de bourgeons formés par les explantats maintenus à l'obscurité que par ceux maintenus continuellement à la lumière. Mais quelles que soient les conditions d'éclairement le maximum de bourgeonnement se trouve toujours à 0,01 M de glucose.

L'AP varie selon les fractions peroxydasiques utilisées, en effet, quelle que soit la concentration du glucose, elle est plus forte dans les fractions solubles dont l'activité est supérieure à celle des fractions ioniques, elle même plus importante que celle mesurée dans les fractions covalentes. L'activité auxine-oxydasique mesurée à partir des mêmes extraits présente les mêmes variations.

Ces deux activités sont influencées par la quantité de glucose ajoutée au milieu de culture. Qu'il s'agisse des fractions solubles, ioniques ou covalentes, le maximum d'AP et d'AAO se trouve respectivement à 0,01 et 0,1 M de glucose. Pour des doses plus fortes elles sont plus faibles.

Les profils isoperoxydasiques sont très différents selon qu'on est en présence des fractions solubles, ioniques ou covalentes. Le glucose n'agit pas sur le nombre d'isoperoxydases mais uniquement sur leur activité.

Nous avons également mis en évidence que l'AP et l'AAO sont contrôlées par les conditions d'éclairement. En effet, elles sont plus fortes dans les tissus cultivés à l'obscurité que dans ceux éclairés et dans les fractions solubles, l'augmentation des activités enzymatiques se traduit par l'apparition d'une isoperoxydase basique supplémentaire ayant une plus grande mobilité électrophorétique (C<sub>5</sub>).

			Kin. (M)			GA3 (M)			ANA (M)			
		glucose	0	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	5.10 <sup>-5</sup>
<u>nombre moyen de bourgeons/ explantat</u>	<u>Lum</u>	-	1,75	1,80	1,85	1,51	1,25	1,33	1,19	0	*	*
		+	1,30	1,42	1,46	1,26	1,11	1,25	1,10	0	*	*
	<u>Obs</u>	-	1,00	1,19	1,25	0,73	1,00	0,95	0,75	0	*	*
		+	0,95	0,95	1,10	0,57	1,00	0,75	0,62	0	*	*
<u>pourcentage d'explantats rhizogènes</u>	<u>Lum</u>	-	0	0	0	0	0	0	0	72	*	*
		+	0	0	0	0	0	0	0	75	*	*
	<u>Obs</u>	-	0	0	0	0	0	0	0	50	*	*
		+	0	0	0	0	0	0	0	67	*	*

**Tableau 4:** Action de quelques régulateurs de croissance sur la morphogénèse des explantats racinaires de *Cichorium intybus* après 25 jours de culture à la lumière ou à l'obscurité continue avec ou sans glucose ( $5,5 \cdot 10^{-2}$  M). kin. = kinétine, AG<sub>3</sub> = acide gibbérellique, ANA = acide naphthyl-acétique.

\* = présence de cals.

Par ailleurs, nous avons constaté qu'il y a un parallélisme entre activité peroxydasique et auxine-oxydasique d'une part et entre les différentes fractions enzymatiques d'autre part, c'est pourquoi nous avons décidé de nous limiter au dosage de l'activité peroxydasique des seules fractions solubles.

## II- INFLUENCE DES RÉGULATEURS DE CROISSANCE

### 2.1. Influence sur l'organogénèse

La kinétine et l'acide gibbérellique favorisent la néoformation de bourgeons (tableau 4).

Lorsque les explantats racinaires sont cultivés en présence de  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M de kinétine, le nombre moyen de bourgeons néoformés est légèrement stimulé, alors que pour une dose plus forte ( $10^{-5}$  M), il est moins important que celui trouvé chez les explantats non traités (planche 3 A).

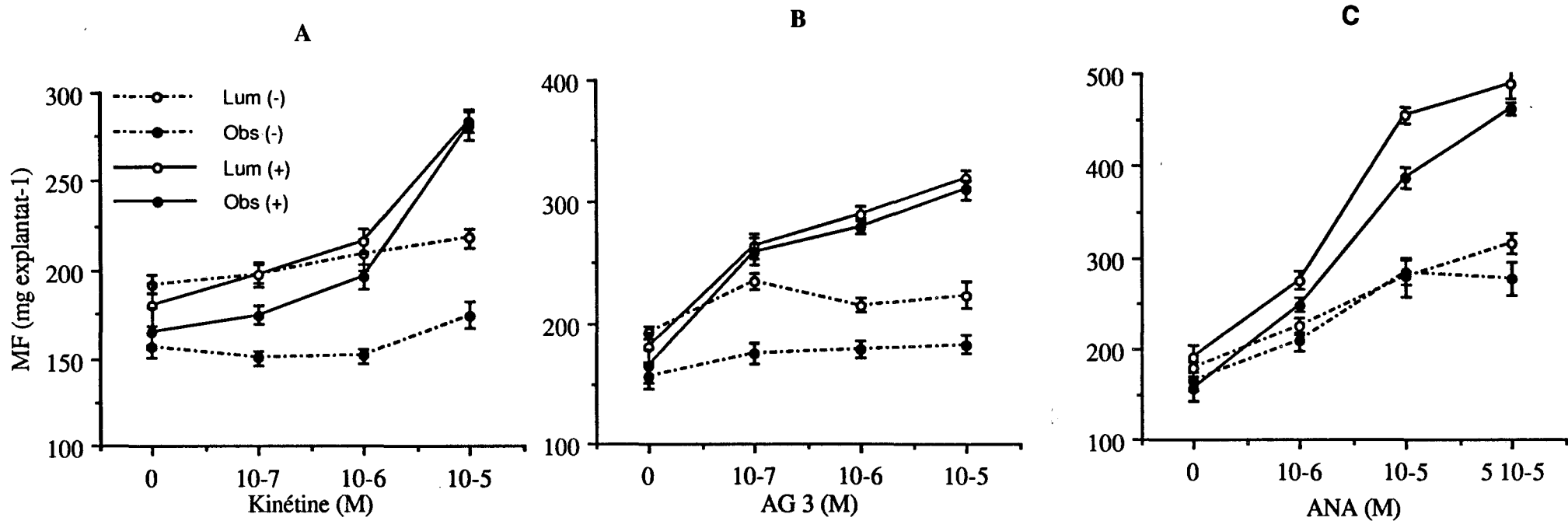
En présence d'acide gibbérellique le nombre moyen de bourgeons formés diminue et quelle que soit la concentration utilisée, il reste toujours plus faible par rapport à celui trouvé chez le témoin (planche 3 B).

Il est également intéressant de noter que quelle que soit la concentration de ces deux hormones, le nombre moyen de bourgeons diminue d'une part quand les explantats sont privés de lumière, d'autre part quand le milieu de culture est additionné de glucose à  $5,5 \cdot 10^{-2}$  M.

En présence d'ANA, seule la formation de racines est favorisée. En présence d'une dose de  $10^{-6}$  M le pourcentage d'explantats rhizogènes atteint 75 % quand les tissus sont cultivés à la lumière sur un milieu contenant du glucose (planche 4). A l'obscurité et/ou en absence du glucose ce pourcentage est plus faible. Pour des doses plus fortes que  $10^{-6}$  M d'ANA, les explantats ne présentent que des cals mous aux cellules hyperhydriques (planche 4).

### 2.2. Influence sur la croissance

Les résultats de l'influence de la kinétine, de l'acide gibbérellique (AG<sub>3</sub>) et de l'acide naphthyl-acétique (ANA) sur la croissance des explantats racinaires sont reportés dans la figure 26 quand la croissance est reportée à la masse de substance



**Figure 26:** Influence des régulateurs de croissance sur la masse de la matière fraîche d'explantats racinaires de *Cichorium intybus* après 6 jours de culture à la lumière (Lum) ou à l'obscurité (Obs), en présence (+) ou en absence (-) du glucose ( $5,5 \cdot 10^{-2}$  M).



fraîche et dans la figure 27 quand le paramètre de croissance est la masse de substance sèche.

### 2.2.1. Action de la kinétine

La masse de matière fraîche est d'autant plus importante que la concentration en kinétine est forte (fig. 26 A). Cette relation se vérifie surtout en présence de glucose.

Par rapport au témoin, la masse de matière sèche est faiblement augmentée en présence de kinétine, mais cette augmentation reste identique quelle que soit la concentration de régulateur de croissance (fig. 27 A). Les conditions d'éclairage influent sur la biomasse qui est toujours supérieure quand les explantats sont éclairés.

### 2.2.2. Action de l'acide gibbérellique (AG<sub>3</sub>)

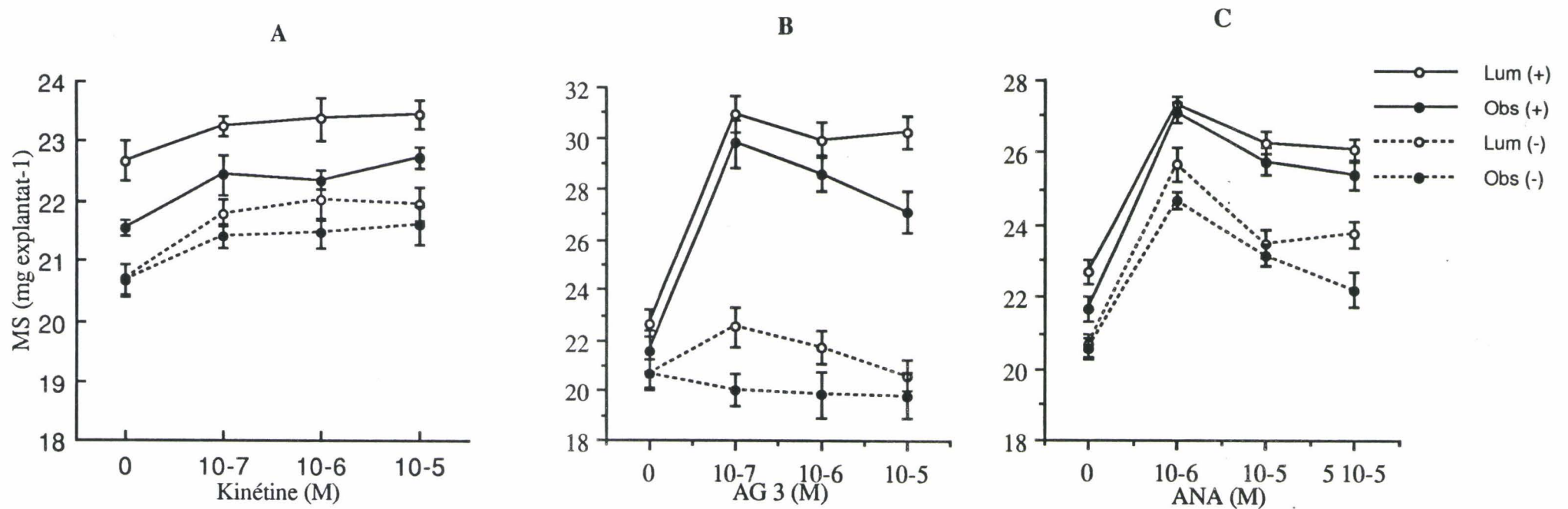
La masse de matière fraîche augmente à mesure que la concentration d'AG<sub>3</sub> augmente. Cette augmentation est plus importante en présence de glucose (fig. 26 B).

Par rapport aux explantats cultivés sur le milieu de base, la MS est exaltée en présence de 10<sup>-6</sup> M d'acide gibbérellique puis diminue légèrement. La biomasse est d'autant plus importante que les explantats sont cultivés à la lumière et en présence de glucose (fig. 27 B).

### 2.2.3. Action de l'ANA

En présence d'ANA, à mesure que sa concentration augmente et quelles que soient les conditions d'éclairage (lumière ou obscurité) ou de la composition de milieu de culture (présence ou non de glucose), la croissance est caractérisée par une augmentation régulière de la MF (fig. 26 C). Cette augmentation est plus importante pour les explantats cultivés à la lumière et en présence de glucose que pour ceux cultivés à l'obscurité sur un milieu privé de sucre.

Le maximum de la masse de matière sèche se trouve pour 10<sup>-6</sup> M d'ANA. Au delà de cette concentration il diminue mais reste toujours supérieur à celui trouvé dans les explantats cultivés sur le milieu témoin (fig. 27 C).

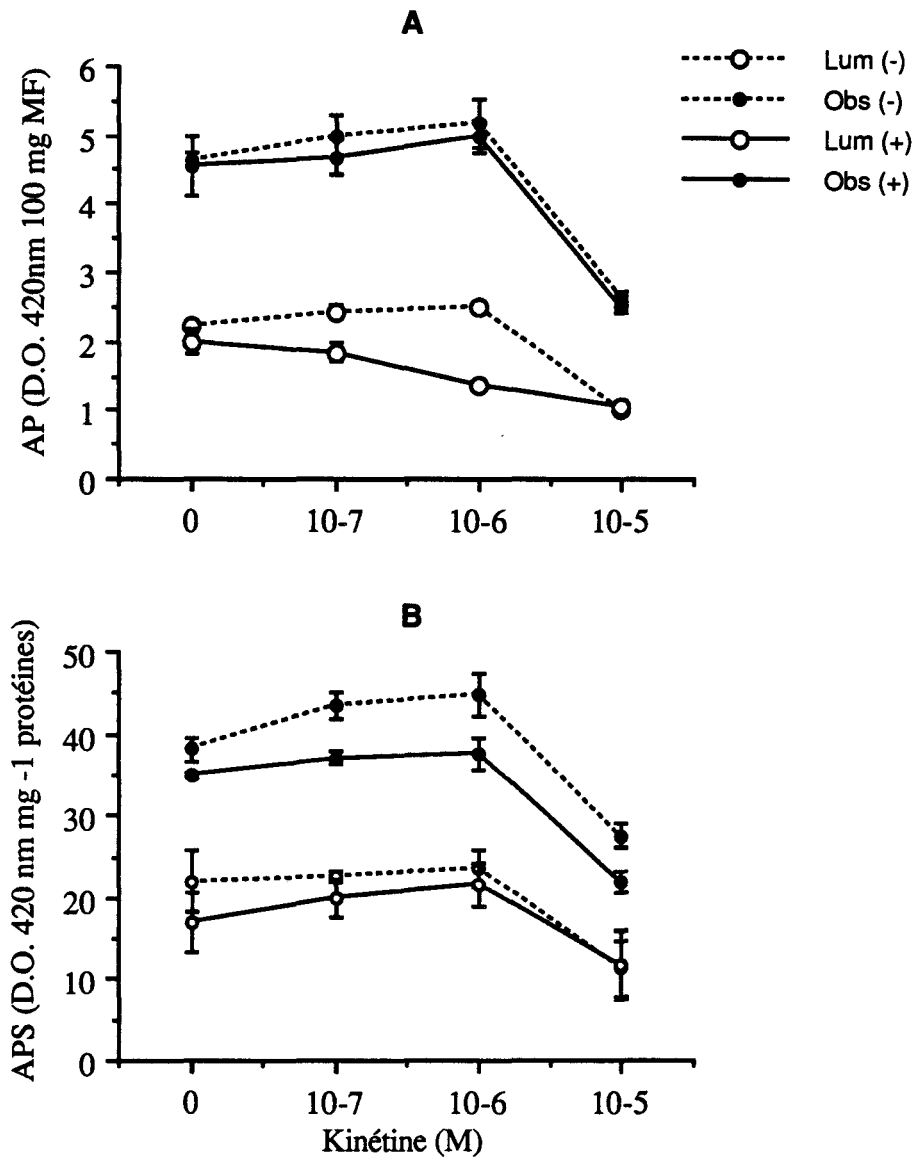


**Figure 27:** Influence des régulateurs de croissance sur la masse de la matière sèche d'explantats racinaires de *Cichorium intybus* après 6 jours de culture à la lumière (Lum) ou à l'obscurité (Obs), en présence (+) ou en absence (-) du glucose ( $5,5 \cdot 10^{-2}$  M).

### 2.3. Influence sur l'activité peroxydasique et sur les profils isoperoxydasiques

#### 2.3.1 Action de la kinétine

Les résultats de l'AP et l'APS sont schématisés dans la figure 28.

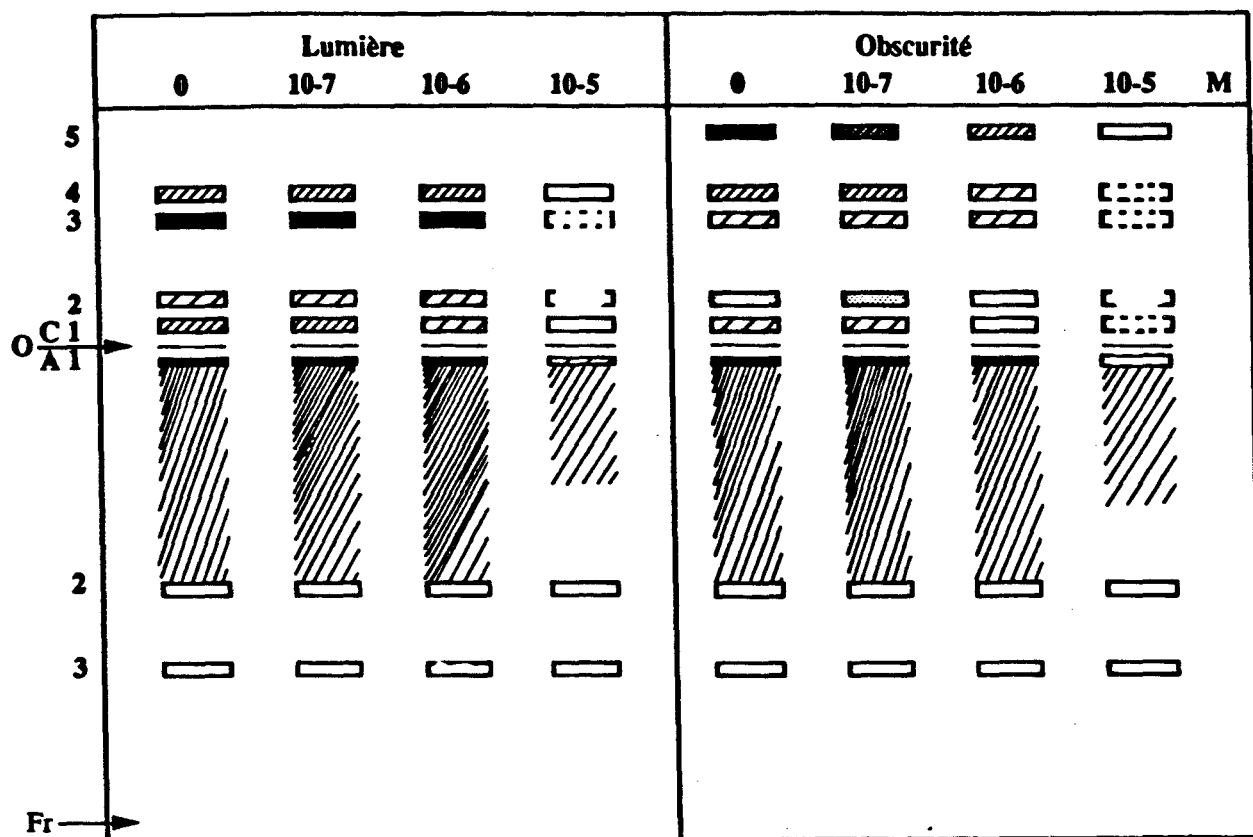


**Figure 28:** Action de la kinétine sur l'activité peroxydasique d'explantats racinaires de *Cichorium intybus* après 6 jours de culture à la lumière (lum) ou à l'obscurité continue (obs) en présence (+) ou en absence (-) de glucose  $5,5 \cdot 10^{-2}$  M). La moyenne et les écart-types ont été calculés sur 3 extraits enzymatiques.

Quel que soit le critère d'expression de l'activité peroxydasique : AP ou APS, les variations sont similaires.

Par rapport aux tissus non traités, l'activité peroxydasique est légèrement supérieure en présence de  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M de kinétine, par contre à  $10^{-5}$  M, elle est moins importante. Cette activité est plus forte d'une part à l'obscurité qu'à la lumière, et d'autre part en absence de glucose.

Les zymogrammes des extraits d'explantats racinaires traités par la kinétine montrent que la composition isoperoxydasique ne change pas par rapport à celle trouvée dans les explantats cultivés sur le milieu témoin (fig. 29). Toutefois des variations de l'intensité de coloration des isoperoxydases sont observées. L'isoperoxydase C<sub>3</sub> fortement active en absence ou en présence de  $10^{-7}$  ou de  $10^{-6}$  M de kinétine présente une activité plus faible à la dose  $10^{-5}$  M. De plus les activités des isoperoxydases C<sub>2</sub> et C<sub>5</sub> sont d'autant plus faibles que la concentration en kinétine est plus élevée quand les tissus sont placés à l'obscurité, tandis qu'à la lumière seule la concentration  $10^{-5}$  M diminue l'activité de C<sub>2</sub>. Ces résultats montrent que la kinétine à  $10^{-5}$  M influe fortement sur les isoperoxydases basiques en diminuant leur activité.

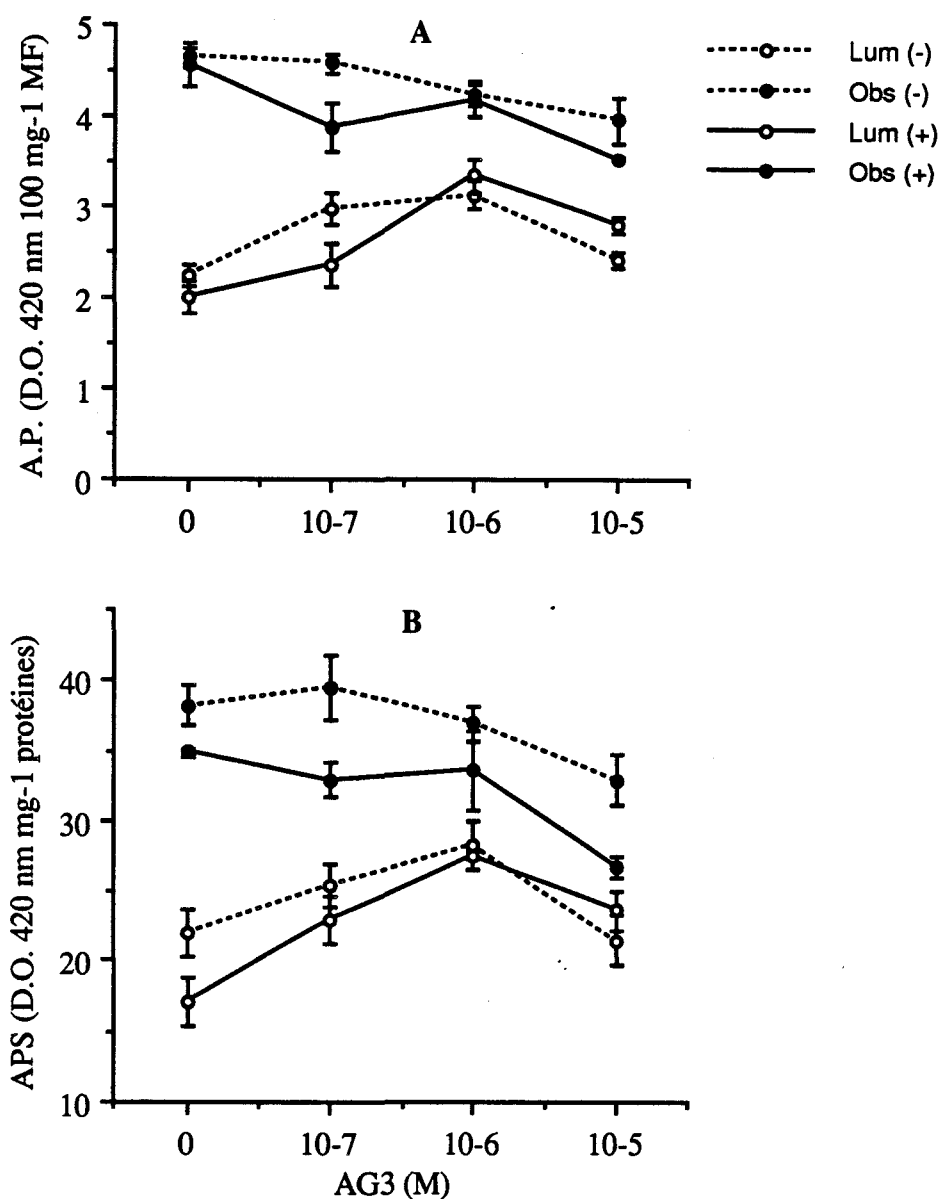


**Figure 28:** Zymogramme des peroxydases solubles d'extraits d'explantats racinaires cultivés pendant 6 jours à la lumière ou à l'obscurité en présence de différentes concentrations de kinétine.

### 2.3.2. Action de l'acide gibbérellique (AG<sub>3</sub>)

Les résultats de l'AP et l'APS sont reportés dans la figure

30.



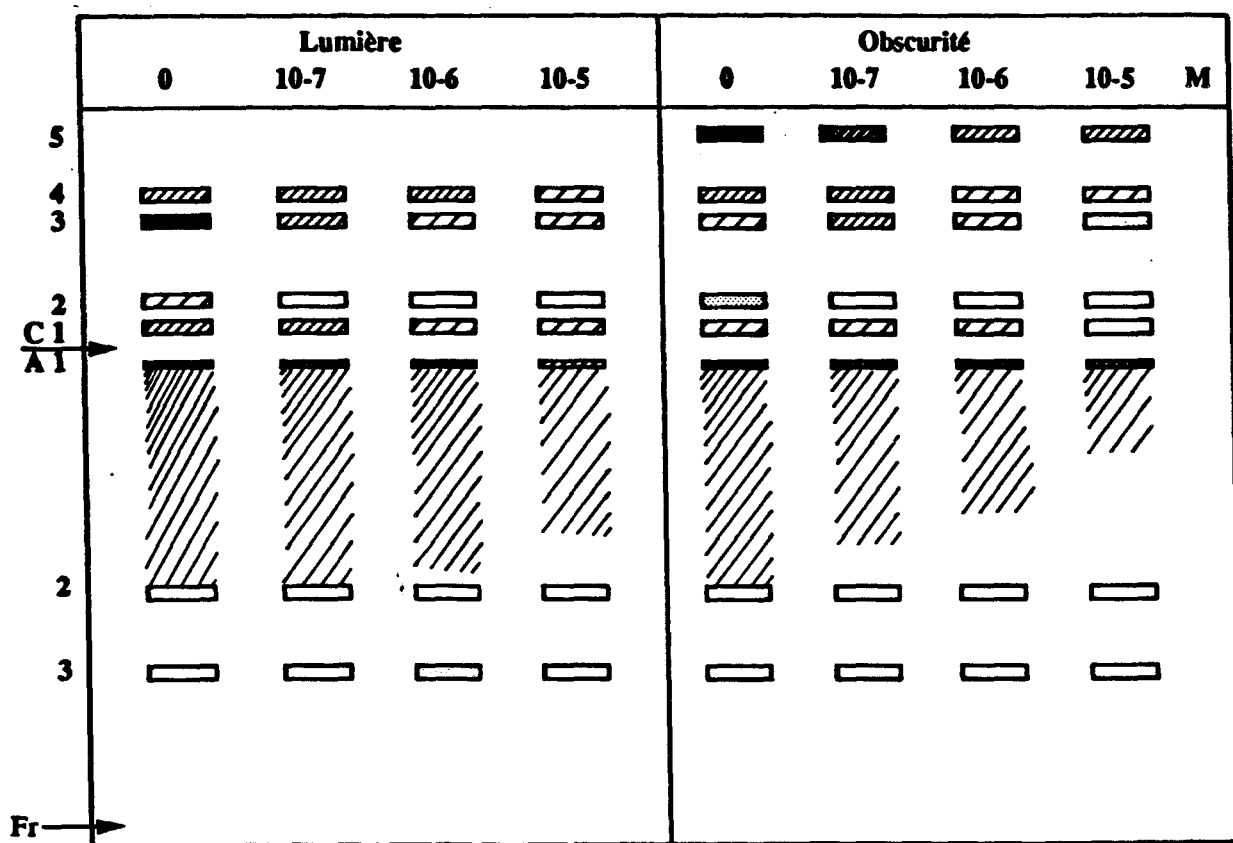
**Figure 30:** Action de l'acide gibbérellique sur l'activité peroxydasique d'explantats racinaires de *Cichorium intybus* après 6 jours de culture à la lumière (lum) ou à l'obscurité continue (obs) en présence (+) ou en absence (-) de glucose ( $5,5 \cdot 10^{-2}$  M).

La moyenne et les écart-types ont été calculés sur 3 extraits enzymatiques.

Lorsque les tissus sont éclairés et quelle que soit la concentration d'AG<sub>3</sub>, les activités peroxydasiques sont plus élevées que celles trouvées chez le témoin. Le maximum d'activité se trouve à  $10^{-6}$  M. Par contre dans les tissus

peroxydasiques diminuent et restent toujours inférieures à celles trouvées sur le milieu de base. Il est intéressant de noter, que lorsque les explantats sont éclairés et pour  $10^{-6}$  et  $10^{-5}$  M d'AG<sub>3</sub> l'AP est plus forte en présence du glucose.

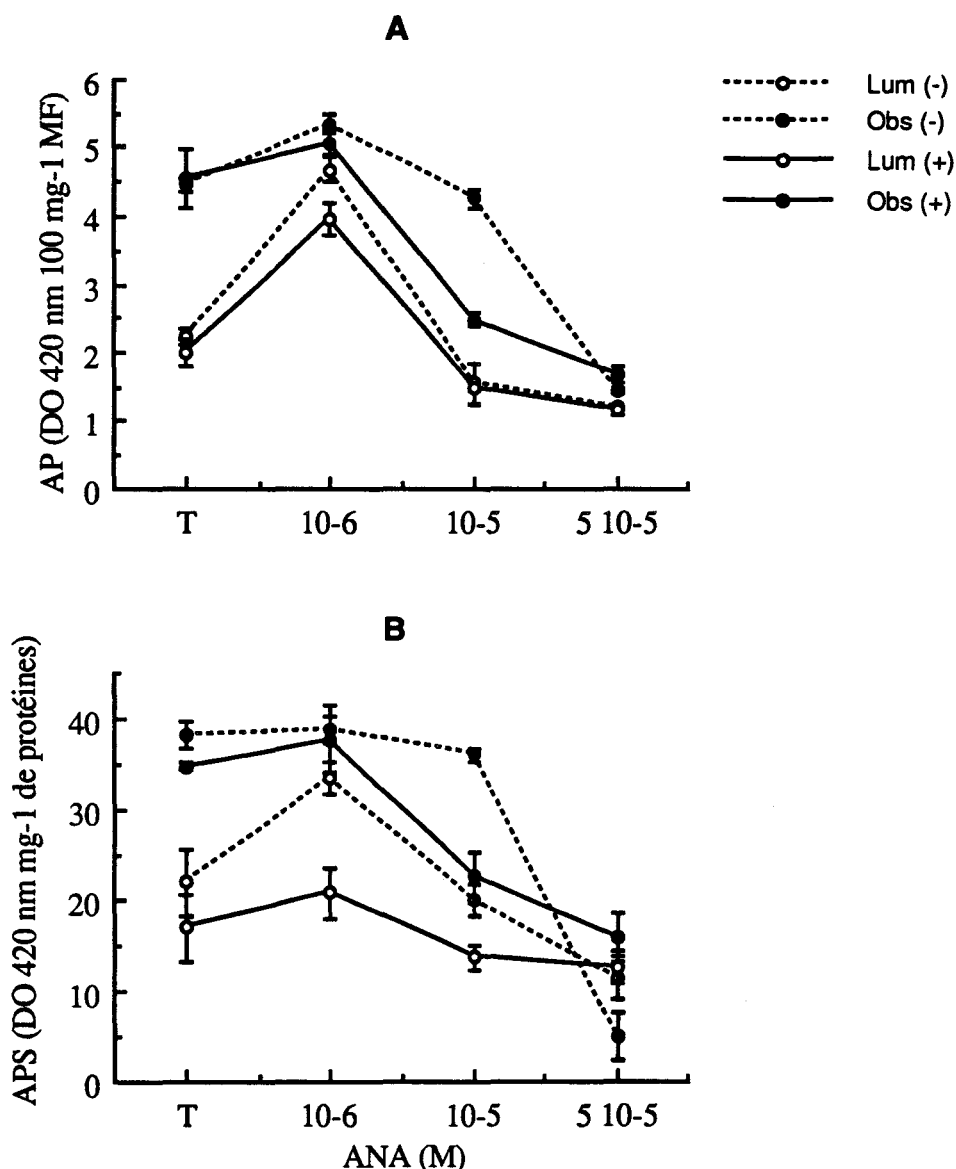
Le diagramme électrophorétique schématisé dans la figure 31 révèle, à la lumière une diminution très faible de l'activité de l'isoperoxydase C<sub>2</sub>. Alors que celle des autres isoperoxydases ne montre pas de très grandes variabilités. Les mêmes observations se trouvent dans les explantats cultivés à l'obscurité où l'isoperoxydase supplémentaire C<sub>5</sub> est également révélée.



**Figure 31:** Diagramme électrophorétique montrant les isoperoxydases obtenues à partir d'extraits de racines cultivés pendant 6 jours à la lumière ou à l'obscurité en présence d'acide gibbérellique.

### 2.3.3. Action de l'acide naphthyl-acétique (ANA)

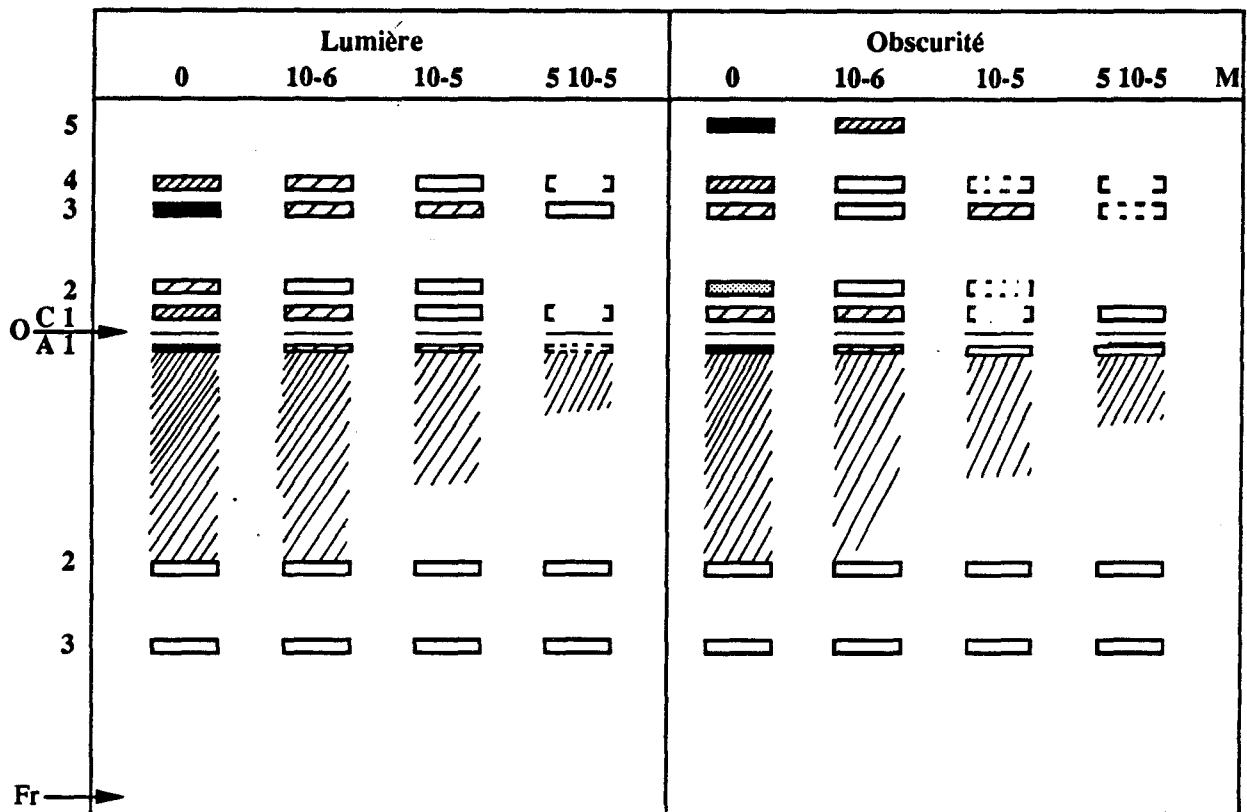
Quelles que soient les conditions d'éclairciment en présence ou non de glucose, l'activité peroxydasique présente un maximum à  $10^{-6}$  M d'ANA (fig. 32 A et B). Pour une dose de  $5 \cdot 10^{-5}$  M, elle est nettement plus faible que celle trouvée chez le témoin. Il faut également signaler que le pic d'activité est plus aigu à la lumière qu'à l'obscurité. L'APS présente les mêmes variations (fig. 32 B).



**Figure 32:** Action de l'acide naphthyl-acétique sur l'activité peroxydasique d'explantats racinaires de *Cicorium intybus* (T= témoin). La moyenne et les écart-types ont été calculés sur 3 extraits enzymatiques.

Les zymogrammes schématisés dans la figure 33 montrent que lorsque les explantats sont cultivés à la lumière, l'activité des isoperoxydases C<sub>2</sub> et C<sub>4</sub> diminue à mesure que la concentration d'ANA augmente. Quand

la dose d'ANA est de  $5 \cdot 10^{-5}$  M, l'isoperoxydase C<sub>2</sub> n'est plus révélée quelles que soient les conditions de culture (lumière ou obscurité). A l'obscurité, une autre isoperoxydase C<sub>5</sub> n'est plus révélée à partir de  $10^{-5}$  M.



**Figure 33:** Action de l'acide naphthyl-acétique (ANA) sur la composition isoperoxydasique d'extraits de racines cultivés pendant 6 jours à la lumière ou à l'obscurité.



		glucose	Témoin	Kin + AG <sub>3</sub>	AG <sub>3</sub> + ANA	Kin + ANA	Kin+GA <sub>3</sub> +ANA
<u>nombre moyens de bourgeons/explantat</u>	<u>Lum</u>	-	1,75	1,21	0	0	0
		+	1,30	1,15	0	0	0
	<u>Obs</u>	-	1,00	0,85	0	0	0
		+	0,95	0,75	0	0	0
<u>pourcentage d'explantats rhizogènes</u>	<u>Lum</u>	-	0	0	62	75	-
		+	0	0	80	80	64
	<u>Obs</u>	-	0	0	50	45	-
		+	0	0	60	58	58

**Tableau 5:** Action combinée des différents régulateurs de croissance sur la morphogénèse des explantats racinaires de *Cichorium intybus* après 25 jours de culture à la lumière ou à l'obscurité continue avec ou sans glucose ( $5,5 \cdot 10^{-2}$  m).

## 2.4. Interaction kinétine-gibbérelline et/ou auxine

Pour l'étude des interactions des différents régulateurs de croissance, leurs concentrations sont celles utilisées pour le milieu de rhizogenèse, c'est à dire  $10^{-7}$  M de kinétine,  $10^{-6}$  M d'ANA et  $10^{-5}$  M d'acide gibbérellique.

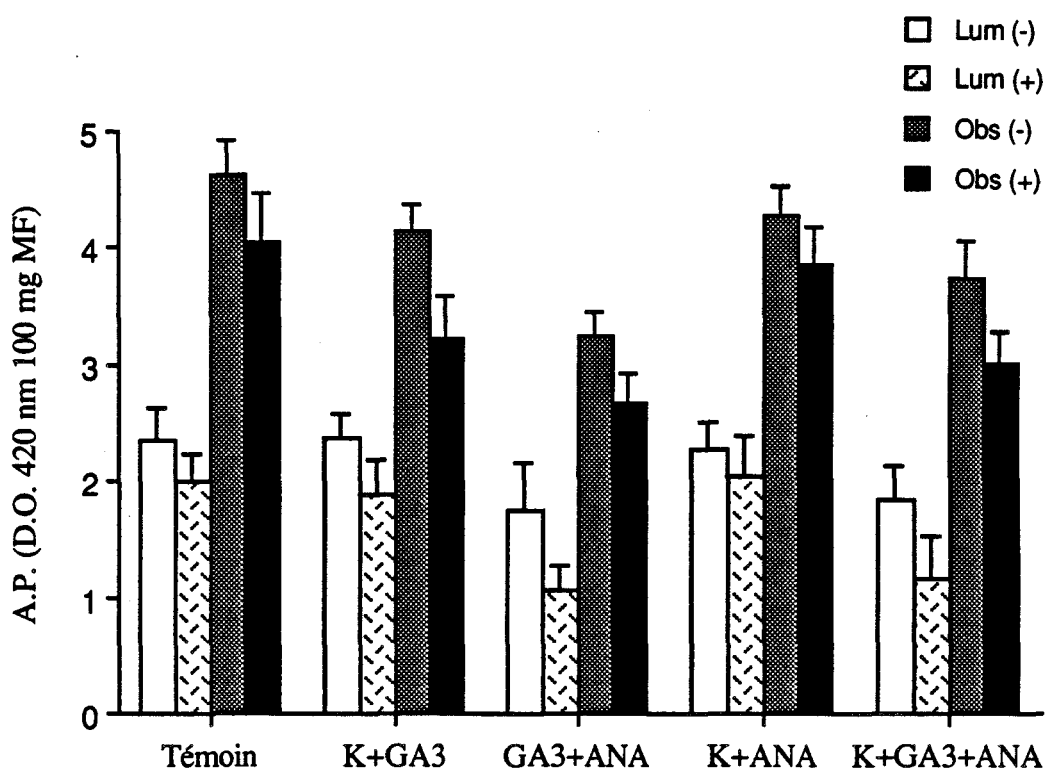
### 2.4.1. Action sur l'organogenèse

L'association de la kinétine à l'acide gibbérellique entraîne la formation de bourgeons. Quelles que soient les conditions d'éclairage en absence ou en présence du glucose, le nombre moyen de bourgeons néoformés est moins important que celui trouvé chez les explantats cultivés sur le milieu de base (Tableau 5).

L'association de l'ANA à la kinétine ou à l'acide gibbérellique favorise la formation de racines seules (planche 5). Dans les deux cas, quand les conditions sont favorables à la formation de racines, c'est-à-dire la lumière et la présence de glucose, le pourcentage d'explantats rhizogènes est de 80 % au lieu de 75 % quand l'ANA est utilisé seul. L'interaction des 3 hormones ne produit que 65 % d'explantats rhizogènes.

### 2.4.2. Action sur l'activité peroxydasique

En fonction des conditions de culture (lumière ou obscurité) et de la présence ou de l'absence de glucose, l'action des régulateurs de croissance n'est pas modifiée (fig. 34). Par exemple, l'association de l'ANA à l'acide gibbérellique (ANA+ AG<sub>3</sub>) diminue sensiblement l'activité peroxydasique, alors que si nous associons la kinétine à l'ANA ou à la AG<sub>3</sub> (K + ANA ou K + AG<sub>3</sub>), les activités peroxydasique sont identiques à celle trouvées pour le milieu sans régulateurs de croissance. Enfin, si kinétine, AG<sub>3</sub> et ANA sont réunis dans un même milieu nous constatons une diminution significative de l'AP.



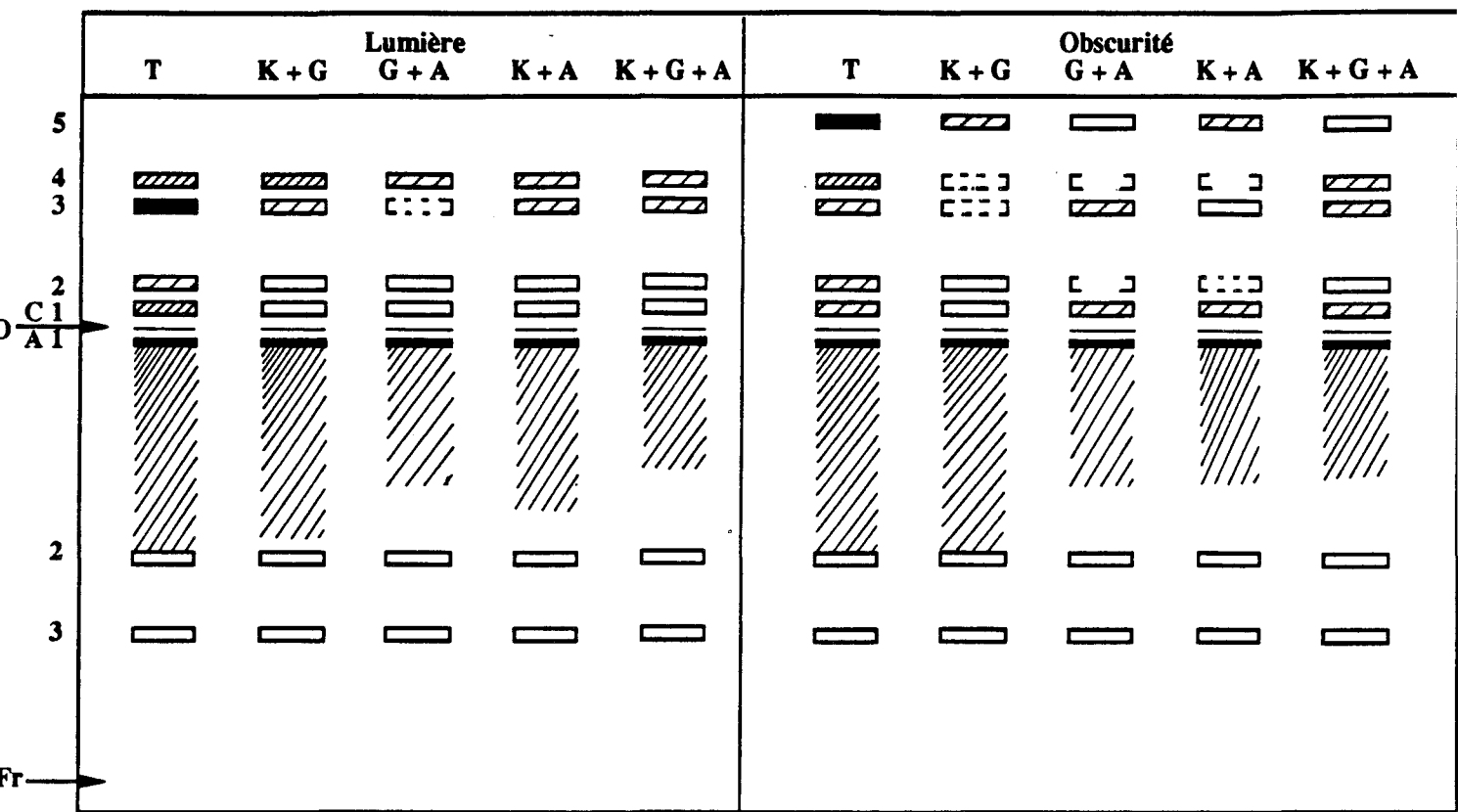
**Figure 34:** Actions combinées des différents régulateurs de croissance sur l'activité peroxydasique (AP) d'explantats racinaires de *Chicorium intybus* après 6 jours de culture à la lumière ou à l'obscurité (Obs) avec (+) ou sans (-) glucose. (K= kinétine).

### 2.4.3. Action sur les profils isoperoxydasiques

Aux concentrations utilisées dans cette expérience les régulateurs de croissance ne modifient pas la composition en isoperoxydases des tissus par rapport aux tissus non traités (fig. 35).

Le diagramme d'électrophorèse ne révèle que quelques nuances d'intensité de coloration et donc d'activité des isoperoxydases. En présence de AG<sub>3</sub> + ANA l'isoperoxydase C<sub>3</sub> est peu active quand les tissus sont éclairés alors qu'elle présente la même intensité que le témoin quand les tissus sont placés à l'obscurité.

En ce qui concerne les isoperoxydases acides aucune variation n'a été observée



**Figure 35:** Action combinée des différents régulateurs de croissance sur les profils isoperoxydasiques d'extraits d'explantats racinaires de *Cichorium intybus* cultivés pendant 6 jours à la lumière ou à l'obscurité continue.

T= témoin, K= kinétine, G= acide gibbérellique, A= acide naphtyl-acétique.

## CONCLUSION

Les régulateurs de croissance additionnés au milieu de culture ont des effets différents sur la morphogenèse des tissus de racine de la chicorée. En effet, selon la nature et la concentration du régulateur utilisé on obtient soit des bourgeons, soit des racines ou des cals.

Ainsi seuls la kinétine et l'acide gibbérellique favorisent la formation de bourgeons. Si en présence de faibles concentrations de kinétine, le nombre moyen de bourgeons néoformés est augmenté, celui-ci est diminué par de fortes concentrations ( $10^{-5}$  M). Par contre, l'action de la gibbérelline se traduit par une diminution du nombre moyen de bourgeons produits par explantat, quelles que soient les concentrations utilisées.

L'activité peroxydasique est inhibée uniquement par de fortes concentrations de kinétine par contre en présence d'acide gibbérellique, elle est plus élevée que celle trouvée chez le témoin pour les explantats éclairés alors que pour ceux placés à l'obscurité, elle est nettement plus faible.

Les résultats trouvés montrent également que le glucose utilisé à  $5,5 \cdot 10^{-2}$  M agit en diminuant à la fois l'AP et la néoformation des bourgeons.

Si l'ANA est complètement défavorable au bourgeonnement, il est tout à fait indispensable pour l'induction de racines à une concentration optimale de  $10^{-6}$  M (75 % d'explantats rhizogènes). Pour des doses supérieures, seule la formation de cals est observée. Dans les conditions favorables à la rhizogenèse (lumière et présence de sucre dans le milieu de culture), l'association de l'ANA ( $10^{-6}$  M) à la kinétine ( $10^{-7}$  M) ou à la gibbérelline ( $10^{-5}$  M) améliore encore plus la formation de racines et permet d'atteindre 80 % d'explantats rhizogènes. Par contre l'association de ces trois hormones ne donne que 64 % d'explantats présentant des racines.

En ce qui concerne les profils isoperoxydasiques, à l'exception de l'ANA utilisé à  $5 \cdot 10^{-5}$  M qui entraîne la répression de deux isoperoxydases ( $C_2$  et  $C_5$ ), la carte isoperoxydasique n'est pas modifiée en présence de kinétine, gibbérelline ou ANA utilisés seuls ou associés. On pourrait donc conclure que la diminution du nombre d'isoperoxydases sur le milieu callogène (contenant l'ANA à  $5 \cdot 10^{-5}$  M) est le résultat de la présence des concentrations élevées d'ANA dans ce milieu de culture.

D'après ces résultats, on peut dire que les variations d'activités et celles du profil peroxydasique peuvent expliquer la morphogenèse différente des tissus de racine de *Cichorium intybus*.

### III- CAS PARTICULIER DES CYTOKININES

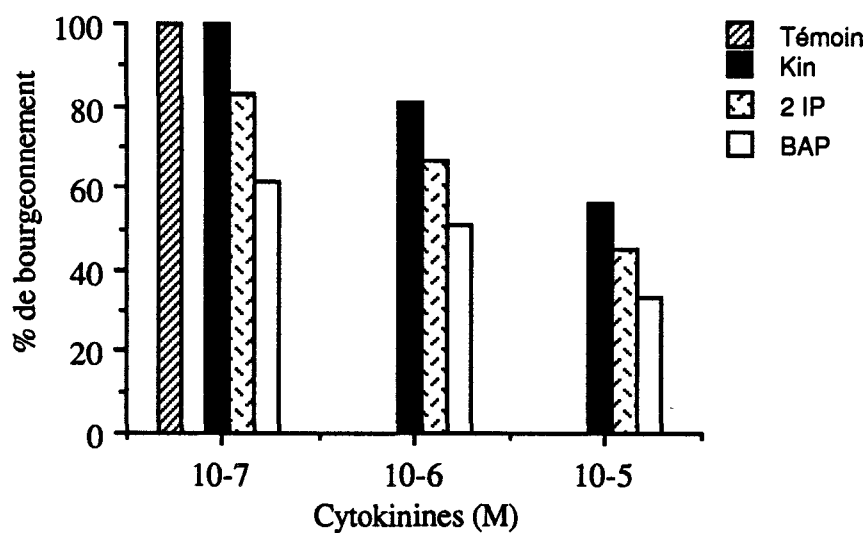
Nous savons que la kinétine favorise le bourgeonnement de feuilles étiolées de *Cichorium intybus* (VASSEUR, 1979; LEGRAND 1987), c'est pourquoi nous nous sommes proposés d'analyser les effets de cette cytokinine, ainsi que ceux de la benzyl-aminopurine (BAP) et de la 6  $\gamma$ - $\gamma$ -diméthylallyl amino purine (2 IP) sur la néoformation de bourgeons et sur les profils d'activité peroxydasique et isoperoxydasiques des explantats racinaires de la chicorée. Ces tissus sont donc mis en culture en présence de ces 3 cytokinines à des concentrations variant de  $10^{-7}$  à  $10^{-5}$  M et sont ensuite entretenus pendant 8 jours en lumière continue.

#### 3.1. Action sur la néoformation des bourgeons

Après 25 jours les bourgeons sont dénombrés. Leur développement et leur teneur en chlorophylle différent selon la nature et la concentration des cytokinines utilisées. En effet, plus leur concentration augmente et plus les bourgeons obtenus sont chlorophylliens par contre leur développement est de plus en plus faible par rapport à ceux cultivés sur le milieu de base. A  $10^{-7}$  M, concentration à laquelle ils sont de taille plus grande, les bourgeons sont plus ou moins vitreux en présence de la kinétine alors qu'ils le sont moins ou pas du tout, respectivement en présence de la BAP ou la 2 IP.

Les effets de ces 3 cytokinines sur le pourcentage de bourgeonnement sont résumés dans la figure 36. Ainsi, le maximum de bourgeonnement (100 %) est obtenu sur un milieu témoin ou additionné de kinétine à  $10^{-7}$  M.

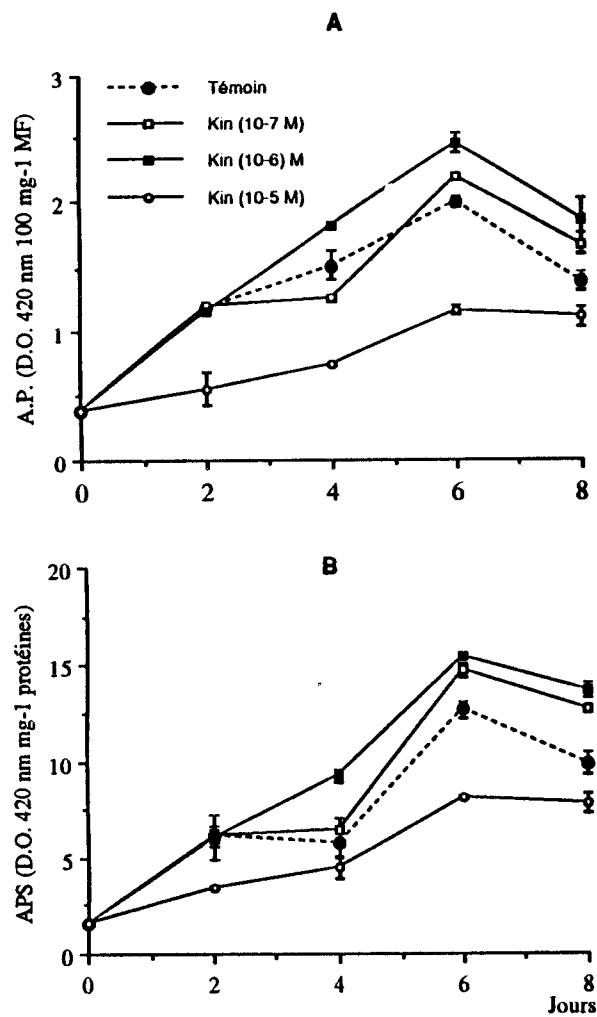
Pour une cytokinine donnée, plus sa concentration augmente plus la capacité de bourgeonnement diminue. Quelle que soit la concentration des cytokinines utilisée, le pourcentage de bourgeonnement est plus élevé en présence de kinétine que celui obtenu en présence de 2 IP, lui même plus important que celui obtenu quand le milieu de base est additionné de BAP.



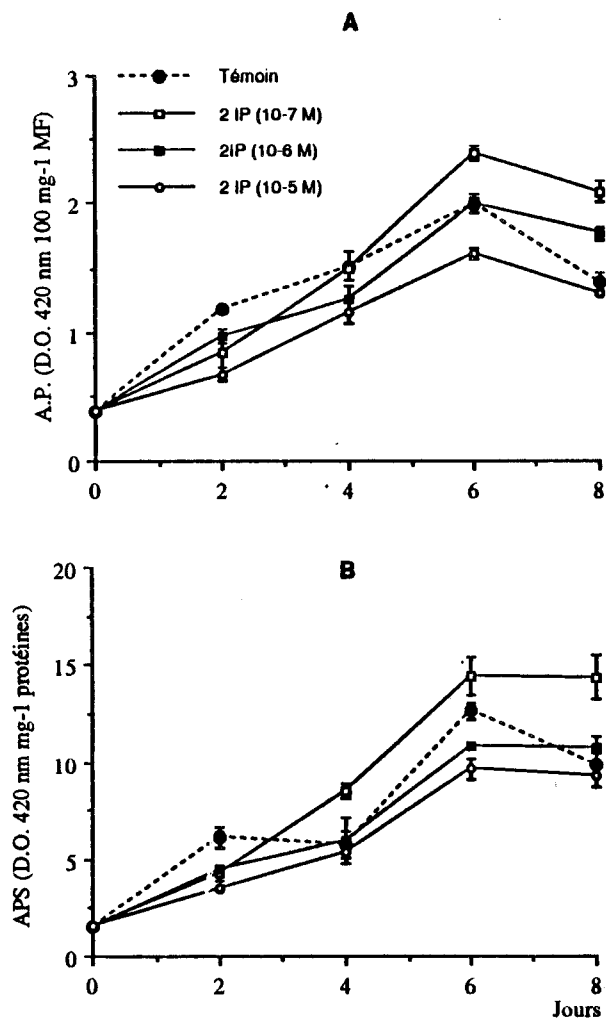
**Figure 36:** Action de la kinétine (Kin), 2 IP ou de BAP sur la capacité de bourgeonnement par les explantats racinaires de *Cichorium intybus* après 25 jours de culture à la lumière continue.

Les effets de la kinétine et de la 2 IP sur le nombre moyen de bourgeons par explantat sont sensiblement les mêmes (fig. 37). Ainsi, le nombre de bourgeons néoformés est stimulé en présence de 10<sup>-7</sup> et 10<sup>-6</sup> M de kinétine ou de 2 IP avec un maximum de stimulation à 10<sup>-7</sup> M alors qu'à la concentration de 10<sup>-5</sup> M il reste sensiblement égal à celui obtenu sur le milieu de base.

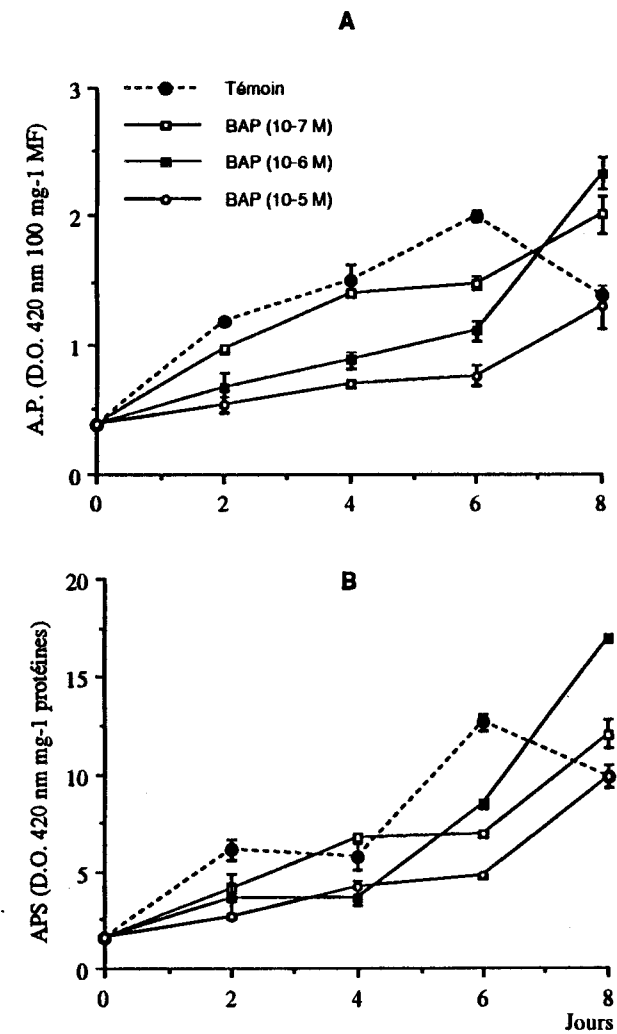
En présence de BAP, le nombre moyen de bourgeons néoformés diminue à mesure que sa concentration augmente.



**Figure 38:** Action de la kinétine sur les variations de l'activité peroxydasique (A) et de l'activité spécifique (B) d'explantats racinaires de *Cichorium intybus*.

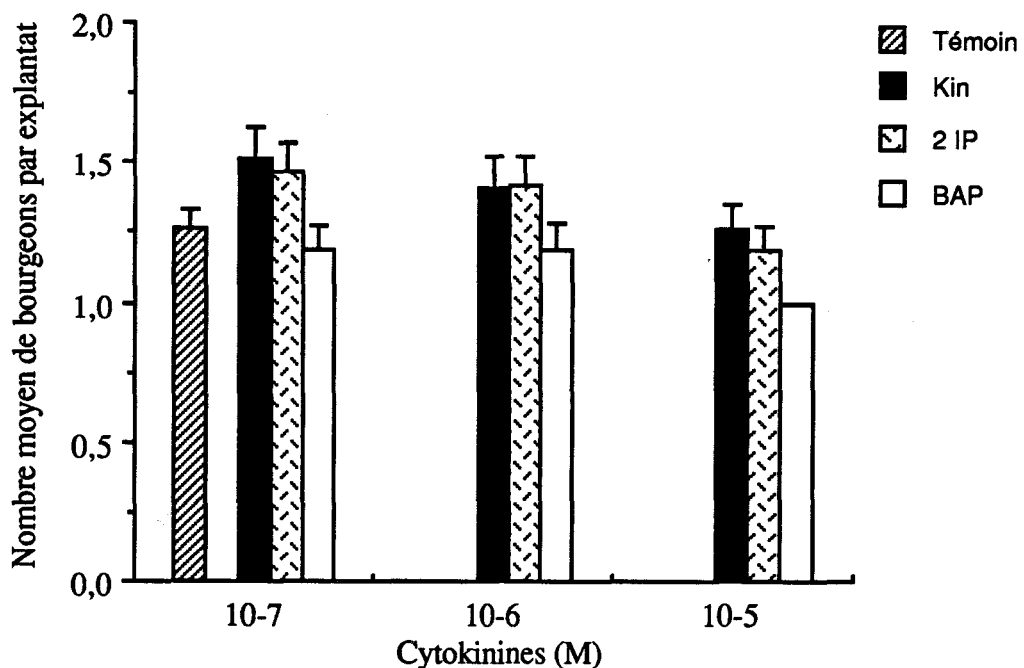


**Figure 39:** Action de la 2 IP sur les variations de l'activité peroxydasique (A) et de l'activité spécifique (B) d'explantats racinaires de *Cichorium intybus*.



**Figure 40:** Action de la BAP sur les variations de l'activité peroxydasique (A) et de l'activité spécifique (B) d'explantats racinaires de *Cichorium intybus*.





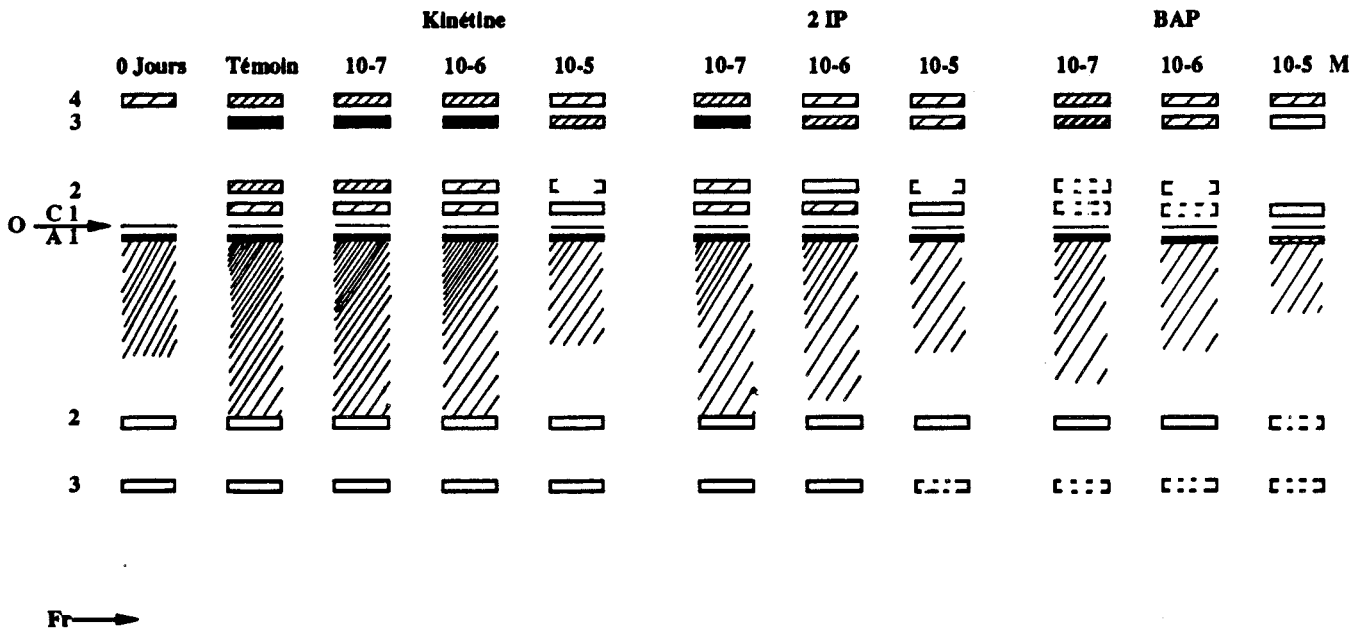
**Figure 37:** Action de la kinétine (Kin), 2 IP ou de BAP sur la néoformation de bourgeons par des explantats racinaires après 25 jours de culture à la lumière continue. La moyenne et les écart-types ont été calculés sur 60 explantats racinaires.

### 3.2. Action sur l'activité peroxydasique

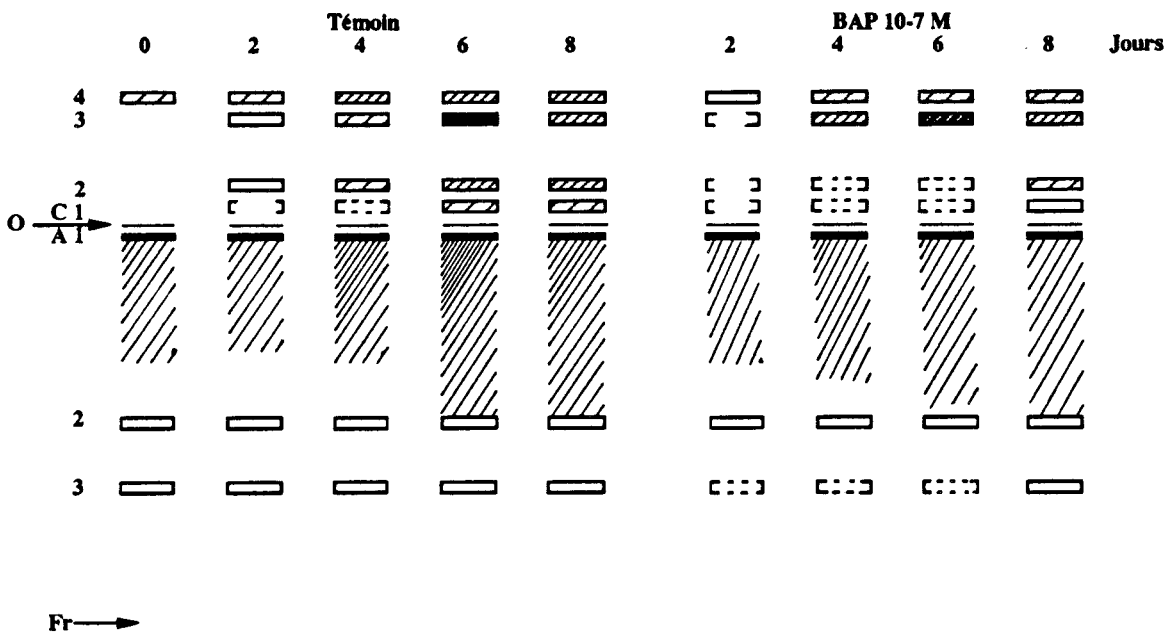
Pour doser l'activité peroxydasique les explantats racinaires ont été prélevés tous les deux jours pendant les huit premiers jours de culture, donc avant l'apparition des bourgeons.

Après 6 jours de culture les activités peroxydasiques des explantats cultivés aux concentrations  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M de kinétine sont plus importantes que celles des explantats poussant sur le milieu de base (fig. 38). Par contre, à la concentration  $10^{-5}$  M, l'activité peroxydasique est toujours plus faible que celle trouvée sur le milieu de base et ceci pendant toute la durée de la culture.

Aux concentrations utilisées, la 2 IP présente les mêmes effets que la kinétine (fig. 39), néanmoins, seule la dose  $10^{-7}$  M est stimulatrice de l'activité peroxydasique après 6 jours de culture, la concentration  $10^{-5}$  M comme dans le cas précédent diminue l'activité peroxydasique comparée à celle du témoin sans régulateur de croissance.



**Figure 41:** Action de la kinétine, 2 IP et de la BAP sur les profils isoperoxydasiques d'extraits de racines de *Cichorium intybus* après 6 jours de culture à la lumière continue.



**Figure 42:** Evolution des profils isoperoxydasiques d'explantats racinaires de *Cichorium intybus* cultivés sur le milieu de base (témoin) ou en présence de BAP (10-7 M).

Jusqu'au sixième jour, quelle que soit la concentration de BAP utilisée (fig. 40), l'activité peroxydasique est toujours inférieure à celle du témoin. Après 6 jours de culture nous constatons une augmentation de l'activité peroxydasique qui est alors supérieure ( $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M) ou égale ( $10^{-5}$  M) à celle trouvée sur le milieu de base.

Si en présence de kinétine et de 2 IP, l'évolution de l'activité peroxydasique est identique à celle du témoin, c'est à dire une augmentation pendant les six premiers jours suivie d'une diminution passée cette date, en présence de BAP l'activité peroxydasique augmente faiblement pendant les six premiers jours puis brutalement entre le sixième et le huitième jour, nous ne retrouvons plus alors le pic classique lié au bourgeonnement.

### 3.3. Action sur les profils isoperoxydasiques

La composition en isoperoxydases est, par rapport au témoin, très peu modifiée en présence des différentes cytokinines (fig. 41). Les seules modifications importantes se situent dans l'intensité des bandes, donc dans les variations d'activité de certaines peroxydases. Par exemple aux concentrations  $10^{-7}$  et  $10^{-6}$  M de kinétine ou de  $10^{-7}$  M de 2 IP l'activité de l'isoperoxydase C<sub>3</sub> est exaltée. Au contraire, plus la concentration en cytokinine augmente plus l'activité des isoperoxydases C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> sont faibles, et en présence de BAP  $10^{-5}$  M l'isoperoxydase C<sub>2</sub> n'est plus révélée après 6 jours de culture.

Il semblerait que l'action inhibitrice de la BAP sur l'expression de l'isoperoxydase C<sub>2</sub> s'exerce, uniquement, en début de culture, en effet cette isoperoxydase C<sub>2</sub> présente une activité plus forte au huitième et dixième jour de culture (fig. 42).

## CONCLUSION

La néoformation de bourgeons ainsi que l'activité et les profils peroxydasiques des tissus de racines de *Cichorium intybus* sont influencées par la nature et la concentration de la cytokinine utilisée.

L'action de la kinétine ou de la 2 IP à  $10^{-7}$  M se traduit par une augmentation du nombre de bourgeons néoformés et de l'activité peroxydasique. Dans ce cas, on note qu'en plus de leur action bénéfique sur la production de bourgeons, la kinétine et la 2 IP interviennent sur leur développement. Ceux-ci sont de plus grande taille, et en présence de 2 IP ils sont plus chlorophylliens que les bourgeons obtenus sur le milieu de base ou sur le milieu contenant la kinétine.

Des concentrations plus fortes de kinétine ou de 2 IP entraînent une diminution du nombre de bourgeons néoformés. Cette diminution est précédée par une diminution de l'activité peroxydasique.

Le même nombre d'isoperoxydases a été révélé en présence de la kinétine ou de la 2 IP. Seules des variations d'activité des isoperoxydases C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> sont décelées. En effet, plus la concentration de la kinétine ou de la 2 IP augmente, plus leur activité diminue.

L'action de la BAP ajoutée au milieu de culture se traduit par un effet défavorable sur le bourgeonnement et sur l'activité peroxydasique par comparaison à celui constaté en présence de la kinétine ou de la 2 IP. En effet la capacité de bourgeonnement et le nombre de bourgeons néoformés diminuent et une faible concentration de BAP suffit pour diminuer l'activité peroxydasique. Par contre à des concentrations plus fortes ( $10^{-5}$  M), cette activité est beaucoup plus inhibée ce qui se traduit par l'absence d'une isoperoxydase basique (C<sub>2</sub>) à faible migration.

Le profil isoperoxydasique est donc sensiblement modifié en présence de cette cytokinine qui modifie également l'évolution typique de l' AP se traduisant par une augmentation suivie d'une diminution caractérisant le processus de bourgeonnement. En effet, l'AP continue à augmenter après le sixième jour sans pic apparent ce qui caractérise la BAP des autres cytokinines que nous avons étudié.

## D- ENRACINEMENT DES BOURGEONS

Dans le cas des explantats racinaires de *Cichorium intybus*, les bourgeons commencent à apparaître spontanément entre le dixième et douzième jour de culture. Après avoir obtenu un taux de 100 % de bourgeonnement, le problème consistait à provoquer leur enracinement. C'est pourquoi, nous avons essayé de trouver d'abord la condition la plus favorable à l'enracinement avant d'étudier les variations de l'évolution de l'AP à partir de la base des bourgeons. Pour cela, des explantats de 8 mm de diamètre et de 1,5 cm de longueur ont été mis en culture sur un milieu contenant les éléments de la solution de HELLER additionnée de 10 g l<sup>-1</sup> de glucose. Ces explantats à raison d'un par tube sont éclairés 24/24 h dans des pièces maintenues à 22 ± 1°C et après 25 jours de culture environ 8 bourgeons chlorophylliens par explantat sont obtenus. Ceci nous a permis pour une expérience donnée d'utiliser des bourgeons provenant d'explantats d'une même racine. Ces pousses feuillées, prélevées sur "les gros" explantats racinaires, sont mises en culture sur des milieux de compositions variées et leurs capacités d'enracinement ont été comparées à celle des bourgeons cultivés sur le milieu de base. Après un mois de culture en lumière continue, les vitroplants c'est à dire les pousses feuillées enracinés, ont été dénombrés.

## I- EFFET DE LA TAILLE DES BOURGEONS SUR LA NEOFORMATION DE RACINES

Dans un premier temps, nous avons voulu tester la capacité des bourgeons à s'enraciner en fonction de leur taille. Ainsi, des bourgeons de différentes tailles ont été choisis et cultivés sur le milieu de base. Les valeurs contenues dans le tableau 6 montrent que ce sont les bourgeons de plus de 1,5 cm de long qui donnent le maximum de vitroplants (67 %). Les bourgeons ayant une taille inférieure donnent un taux d'enracinement plus faible (environ 55 %).

Taille des bourgeons (cm)	0,5	1	1,5	2	2,5	3
pourcentage d'enracinement	54,14	56,16	63,63	66,66	66,66	63,63

**Tableau 6:** Influence de la taille des bourgeons de *Cichorium intybus* sur leur capacité néoformatrice de racines. Le pourcentage d'enracinement a été calculé sur 48 bourgeons.

Pour la suite de nos expériences nous avons donc choisi des bourgeons d'environ 1,5 cm de longueur.

## II- EFFET DE CERTAINES SUBSTANCES REPUTÉES RHIZOGENES SUR LA FORMATION DE RACINES.

Après deux semaines de culture à la lumière continue, les pousses feuillées ayant 1,5 cm environ ont été mises en culture sur différents milieux contenant de la proline (100 mg l<sup>-1</sup>), du naphtylacétamide (NAM; 0,1 mg l<sup>-1</sup>) ou une double quantité de nitrate sous forme de NaNO<sub>3</sub> de la solution préconisée par HELLER (1953). Ces éléments connus par leur effet rhizogène ont été utilisés seuls ou combinés, avec ou sans saccharose (10 g l<sup>-1</sup>).

Quelle que soit le composé utilisé, le pourcentage de racines néoformées est toujours plus important lorsque le milieu de base contient du saccharose que lorsqu'il en est privé (tableau 7). En effet, après un mois de culture sur un milieu de base sans sucre, il n'y a que 42 % de bourgeons qui produisent des racines alors qu'en présence du saccharose le pourcentage d'enracinement atteint 67 %. Dans les deux cas, les racines commencent à être visibles à partir du 16<sup>ème</sup> jour de culture.

	MB	Proline	2(NaNO <sub>3</sub> )	NAM	Proline + 2(NaNO <sub>3</sub> )	Proline + NAM	2(NaNO <sub>3</sub> ) + NAM
<u>sans saccharose</u>	41,66	54,16	47,82	66,6	41,66	37	50
<u>avec saccharose</u>	66,66	62,5	75	70,8	54,16	44,44	75

**Tableau 7:** Influence de différentes substances sur la néoformation de racines par les pousses feuillées de *Cichorium intybus* cultivées à la lumière continue sur un milieu de base additionné ou non de saccharose. MB= milieu de base. Le pourcentage d'enracinement a été calculé sur 48 bourgeons.

En absence du saccharose, le NAM donne le maximum de bourgeons enracinés (67 % au lieu de 42 % sur le MB). Par contre, quand le milieu de base est additionné de saccharose, c'est la double quantité de nitrate et le NAM seuls ou associés qui se sont révélés les plus efficaces et le pourcentage d'enracinement est

respectivement de 75; 71 et 75 %. L'associations de ces deux substances à la proline diminue le pourcentage d'enracinement par rapport à celui obtenu en cultivant les pousses feuillées sur le milieu de base.

Il est important de signaler que quelle que soit la substance ajoutée dans le milieu de culture, l'émergence des racines a lieu toujours au même moment c'est à dire au seizième jour.

Par la suite, nous avons voulu tester l'effet d'ANA et celui de l'AIB (acide indolyl-buturique) sur l'enracinement en utilisant différentes concentrations en présence du saccharose  $10 \text{ g l}^{-1}$  (Tableau 8).

	0	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
AIB (M)	66,66	72	70,83	79,16*	66,66*
ANA (M)	66,66	79	58,33	25*	18,18*

**Tableau 8:** Effet d'ANA et d'AIB sur l'enracinement des bourgeons verts de *Cichorium intybus* cultivés pendant un mois à la lumière continue.  
(\*): présence de cals à la base des vitroplants. Le pourcentage d'enracinement a été calculé sur 48 bourgeons.

A la suite de ces résultats, on constate qu'une concentration de  $10^{-5}$  M d'AIB qui donne le maximum de bourgeons enracinés (79 % au lieu de 67) provoque l'apparition de cals à la base des vitroplants. Il en est de même pour une concentration de  $10^{-4}$  M. Par contre en présence  $10^{-6}$  M d'AIB le pourcentage d'enracinement passe de 67 % quand le milieu de culture est privé d'hormone à 71 % sans que les vitroplants ne présentent de cals.

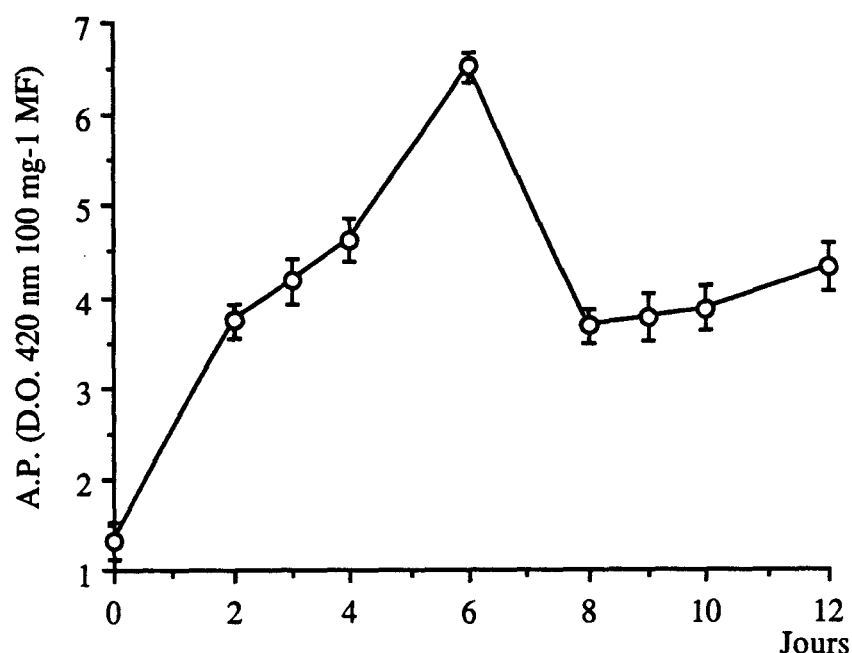
En présence d'ANA la néoformation de racines n'est stimulée de façon très importante qu'en présence de  $10^{-7}$  M. Ainsi le pourcentage de bourgeons enracinés passe de 67 % à 79 %. Dans ce cas, les plantes se développent bien et aucun cal n'apparaît. Pour des concentrations plus fortes, la capacité d'enracinement diminue et les boutures présentent de plus en plus de cals ce qui empêche le bon développement des vitroplants dont certains finissent même par dégénérer surtout à la dose de  $10^{-5}$  M.

Parmi les substances rhizogènes testées, l'ANA à  $10^{-7}$  M semble donc être le régulateur de croissance le plus efficace capable de stimuler d'une façon significative la néoformation des racines à la base des bourgeons chlorophylliens obtenus après un séjour de 25 jours à la lumière continue.

Dans certains cas, le transfert des boutures après la phase d'induction des racines, indiqué par le pic d'activité peroxydasique, sur un milieu de base sans hormones ou en présence de rutine améliore le pourcentage d'enracinement (GASPAR et al., 1977; MOSELLA et MACHEIX, 1979; MONCOUSIN et GASPAR, 1983; BEKKAOUI et al, 1984; GASPAR et al., 1985; BERTHON et al. 1989).

Nous avons donc repris certaines expériences et pour cela il nous a fallu d'abord déterminer la durée de la phase d'induction en se basant sur l'évolution de l'activité peroxydasique sachant que cette phase prend fin au niveau du pic correspondant au maximum d'activité peroxydasique (GASPAR, 1981).

L'évolution de l'activité peroxydasique (fig. 43) montre que la phase d'induction prend fin au sixième jour. A la suite de ces résultats préliminaires, le transfert sur des milieux de composition différente sera effectué au sixième jour.



**Figure 43:** Évolution de l'activité peroxydasique (AP) des bourgeons chlorophylliens de *Cichorium intybus* cultivées à la lumière continue. La moyenne et les écart-types ont été calculés sur 3 extraits enzymatiques.



Le transfert des bourgeons a été fait donc à partir d'un milieu contenant de l'ANA à  $10^{-7}$  M, soit sur un milieu sans régulateur de croissance ou additionné de rutine à  $10^{-3}$  M, toujours en présence du saccharose (Tableau 9).

Traitements (après le 6ème jour)	% d'enracinement
MB + ANA (témoin)	74
MB	83
MB +rutine	89

**Tableau 9:** Néof ormation de racines à partir des pousses feuillées de *Cichorium intybus* transférées après 6 jours de culture d'un milieu contenant l'ANA ( $10^{-7}$  M) vers les milieux indiqués ci-dessus. Le pourcentage d'enracinement a été calculé sur 48 bourgeons.

Les résultats reportés dans le tableau 9 montrent que si l'on cultive des bourgeons en présence d'ANA ( $10^{-7}$  M) pendant 6 jours et qu'on les transfère sur un milieu de base sans régulateur de croissance, la capacité d'enracinement augmente de 74 à 83 %, par contre si les bourgeons sont transférés sur un milieu de base additionné de rutine ( $10^{-3}$  M), le taux d'enracinement est nettement amélioré. Il passe de 74 à 89 %.

L'utilisation de deux milieux successifs différents donne donc, de meilleurs résultats que lorsqu'on utilise un seul et même milieu durant toute la durée du processus d'enracinement. En effet, on a vu que si les bourgeons sont cultivés sur un milieu contenant de l'ANA pendant toute la durée de la culture, le pourcentage d'enracinement est de 79 %, alors que si ces bourgeons sont d'abord mis en culture sur un milieu contenant de l'ANA pendant 6 jours, puis transférés sur un autre milieu différent le taux de vitroplants est amélioré surtout en présence de la rutine avec laquelle on obtient 89 % de bourgeons enracinés au lieu de 74 %.

### III- EFFET DU PRETRAITEMENT DES BOURGEONS A L'OBSCURITE SUR LA NEOFORMATION DE RACINES

Jusqu'alors nos expériences d'enracinement concernaient des bourgeons chlorophylliens provenant d'explantats racinaires ayant été éclairés 24 h/24. On s'est demandé, ensuite si des bourgeons étiolés obtenus à partir d'explantats racinaires privés de lumière puis cultivés dans les mêmes conditions d'éclairement que les

bourgeons chlorophylliens (lumière continue) ne permettraient pas d'améliorer le processus d'enracinement.

### 3.1. Effet sur le pourcentage d'enracinement

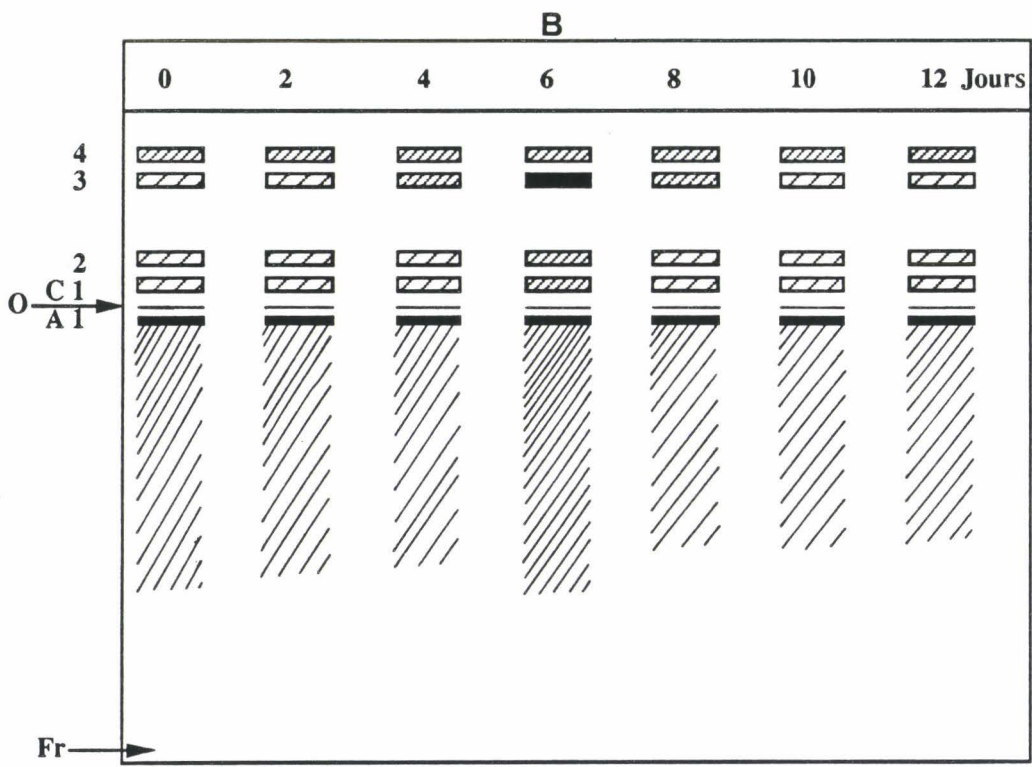
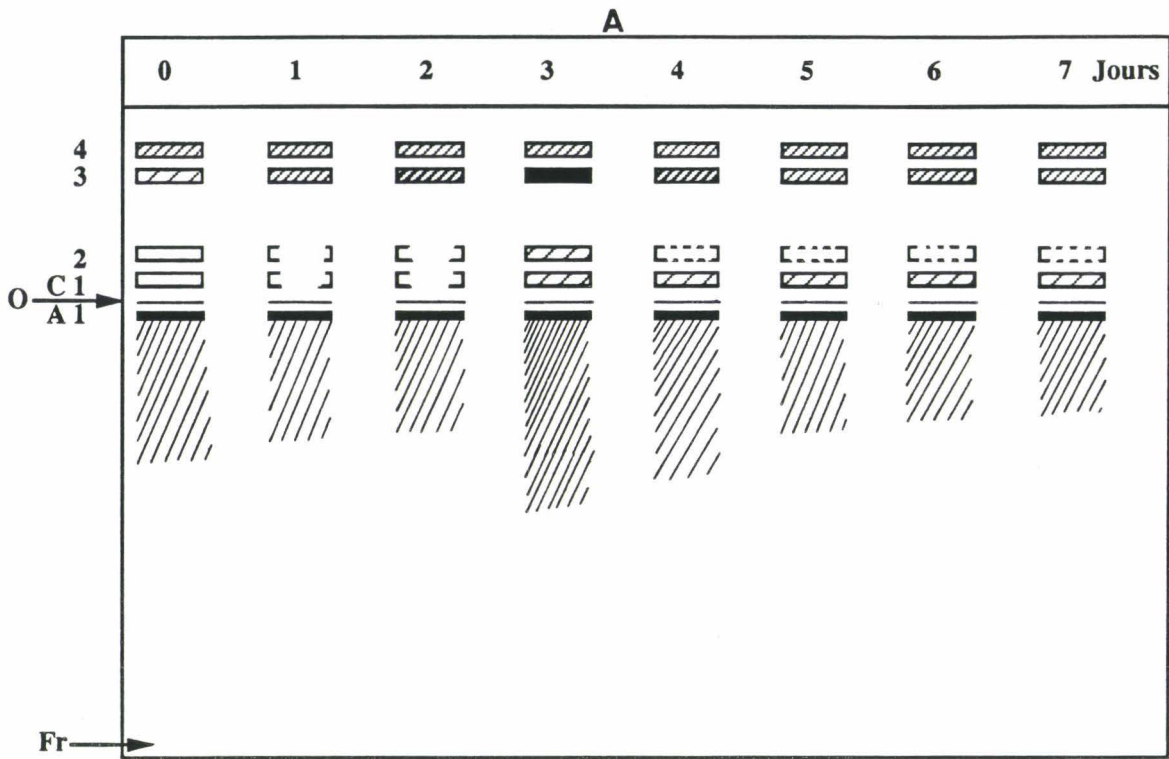
Après avoir réalisé cette expérience, nous avons constaté que les bourgeons étiolés s'enracinent très rapidement et que leur capacité néoformatrice de racines est nettement améliorée. En effet, les racines commencent à apparaître dès le huitième jour et le pourcentage d'enracinement est de 100 %, au lieu de 67 % dans le cas des bourgeons chlorophylliens (Tableau 10).

	Pourcentage d'enracinement
Bourgeons chlorophylliens	67
Bourgeons étiolés	100

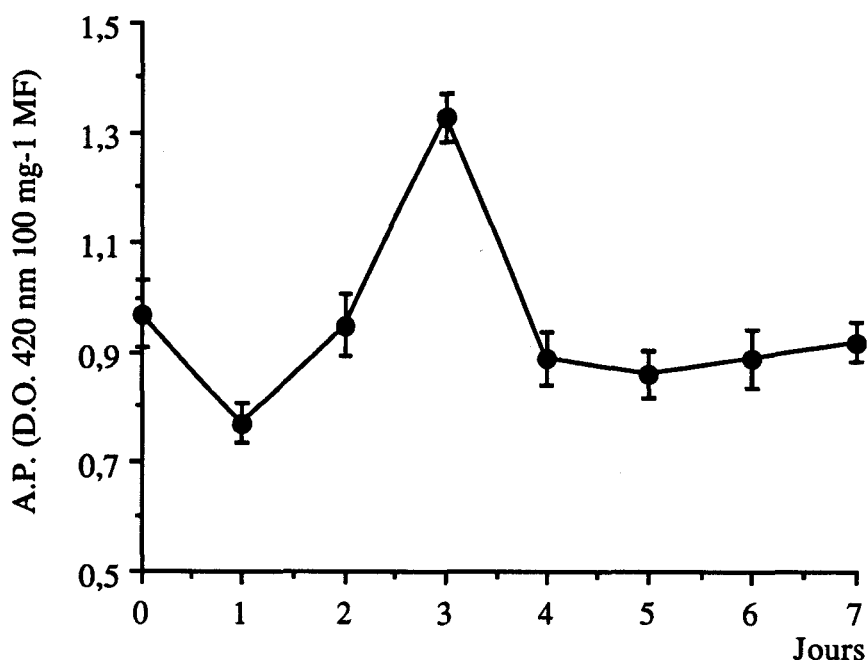
**Tableau 10:** Influence des conditions d'éclairage de la plante mère sur la capacité d'enracinement des bourgeons.

### 3.2. Effet sur l'activité peroxydasique

L'étude de l'évolution de l'activité peroxydasique à partir des bourgeons étiolés (fig. 44) montre une légère diminution d'A. P. après un jour de culture. Le pic d'activité intervient au troisième jour. Par conséquent la période d'"induction" est réduite à 3 jours seulement ce qui pourrait être lié à l'apparition précoce des racines. De plus, l'AP trouvée est plus faible que celle des bourgeons chlorophylliens.



**Figure 45:** Evolution des isoperoxydases au cours de la formation de racines à partir de bourgeons étiolés (A) ou chlorophylliens (B) de *Cichorium intybus*.



**Figure 44:** Évolution de l'activité peroxydasique des bourgeons étiolés obtenus à partir d'explantats racinaires de *Cichorium intybus* cultivés à l'obscurité continue. La moyenne et les écart-types ont été calculés sur 3 extraits enzymatiques.

Le pré-conditionnement des bourgeons c'est à dire leur obtention après un séjour des explantats racinaires à la lumière ou à l'obscurité est donc un facteur important pour l'enracinement des bourgeons.

### 3.3. Effet sur les profils isoperoxydasiques

L'équipement isoenzymatique des peroxydases solubles obtenues à partir des bourgeons chlorophylliens et étiolés est schématisé dans la figure 45. Quelles que soient les conditions des prétraitements (lumière ou obscurité), la composition en isoperoxydases est la même. En effet, 4 isoperoxydases basiques C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub> ainsi qu'une isoperoxydase acide A<sub>1</sub> sont révélées.

Les variations les plus visibles sous les deux régimes de lumière sont la succession de l'augmentation et la diminution de l'activité de la plupart des isoperoxydases basiques en passant de la phase d'"induction" à la phase d'"initiation". On peut donc observer qu'en plus de C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub>, l'isoperoxydase C<sub>3</sub> présente une activité

maximale au sixième jour dans le cas des bourgeons chlorophylliens, alors qu'en présence des bourgeons étiolés cette activité est maximale au troisième jour. Aucune conclusion ne peut être tirée à partir de l'isoperoxydase A<sub>1</sub> puisque les variations d'activité sont généralement les mêmes.

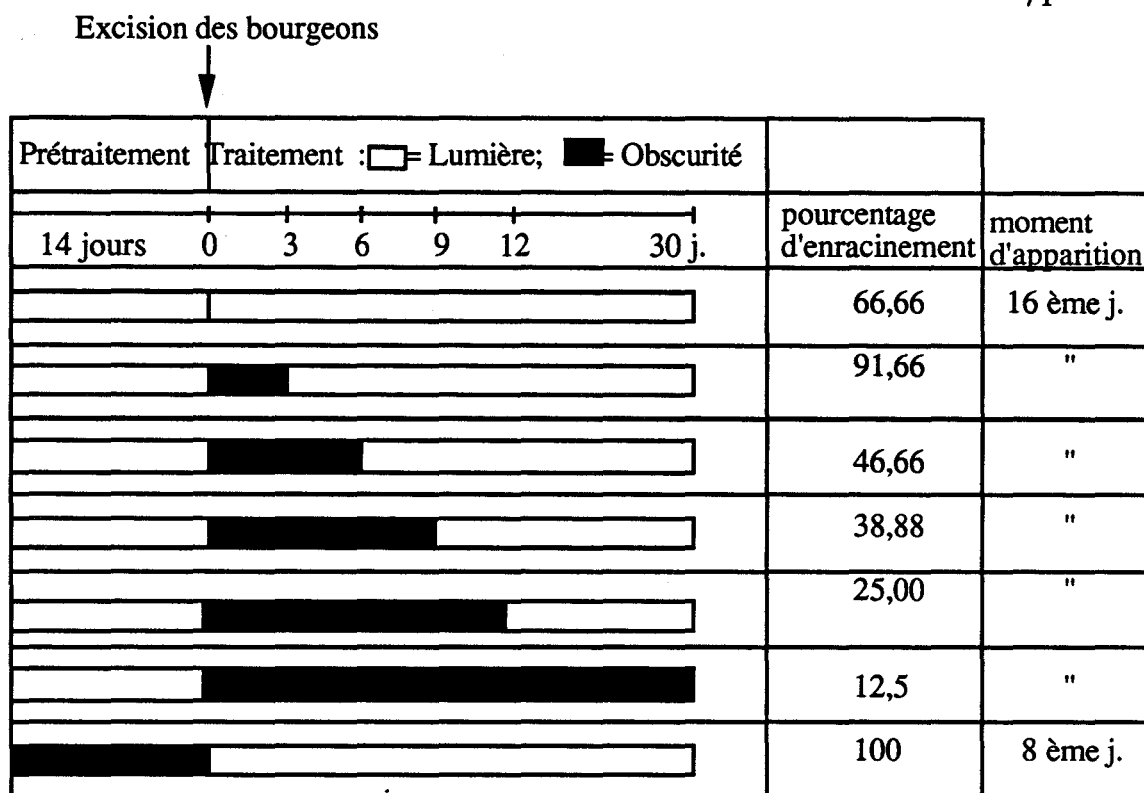
#### **IV- ACTION DE LA NYCTIPERIODE DE DUREES VARIABLES SUR L'ENRACINEMENT DES BOURGEONS CHLOROPHYLLIENS**

On sait que si l'on cultive des bourgeons étiolés obtenus à partir d'explantats racinaires placés à l'obscurité continue, la capacité d'enracinement est nettement stimulée par rapport à celle obtenue à partir des bourgeons chlorophylliens. On pouvait donc se demander quels seraient les effets des différents traitements à l'obscurité au début de la culture sur l'enracinement des bourgeons chlorophylliens.

Pour cela des bourgeons chlorophylliens sont cultivés sur un milieu de base contenant 10 g de saccharose et sont maintenus à l'obscurité totale. Après 3, 6, 9, 12 jours de culture, ils sont transférés à la lumière continue. Des bourgeons placés à la lumière continue pendant toute la durée de l'expérience ont été utilisés comme témoin.

##### **4.1 Effet sur le pourcentage d'enracinement**

D'après les résultats de la figure 46, on constate que plus la période obscure initiale est longue, plus le pourcentage d'enracinement est faible et il est complètement inhibé quand les bourgeons sont traités continuellement à l'obscurité pendant 30 jours. En outre, il faut signaler que lorsque les bourgeons sont soumis initialement à 3 jours seulement d'obscurité, le pourcentage d'enracinement est plus important que lorsqu'ils sont soumis à la lumière continue pendant 30 jours. L'obscurité exercerait donc, au début de la culture, un effet stimulateur sur le taux de bourgeons enracinés.



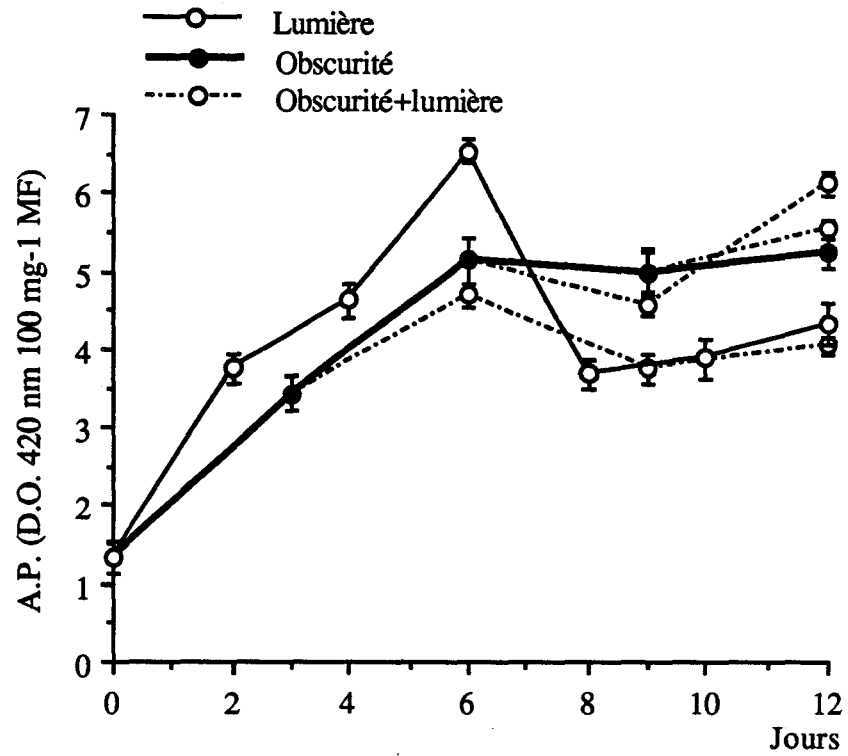
**Figure 46:** Effet des traitements des bourgeons, avant ou après excision , à l'obscurité, sur le taux d'enracinement. Le pourcentage d'enracinement a été calculé sur 48 bourgeons.

#### 4-2 Effet sur l'activité peroxydasique

D'après les résultats résumés dans la figure 47, on constate que pendant les 6 premiers jours de culture et quelle que soit la durée de la période d'obscurité, l'activité peroxydasique est relativement la même mais reste toujours inférieure à celle des bourgeons placés pendant 30 jours à la lumière continue (témoin).

Après le sixième jour l'AP change. En effet, les bourgeons transférés à la lumière continue après un traitement à l'obscurité pendant 6 et 9 jours, présentent une AP qui est nettement plus importante que celle du témoin. Par contre, l'obscurité donnée pendant les 3 premiers jours de culture donne durant cette deuxième phase, une activité qui est de même ordre que celle du témoin.

Un traitement des bourgeons à l'obscurité pendant la première phase d'enracinement (inductive), entraîne une diminution de l'activité peroxydasique, par rapport au témoin, puis une augmentation de celle-ci pendant la deuxième phase. Cette augmentation, n'est pas décelée après un traitement de 3 jours à l'obscurité.



**Figure 47:** Action des traitements des bourgeons chlorophylliens par l'obscurité sur l'activité peroxydasique. La moyenne et les écart-types ont été calculés sur 3 extraits enzymatiques.

## CONCLUSION

Dans cette partie, nous avons étudié la capacité néoformatrice de racines à partir des bourgeons de *Cichorium intybus* ainsi que leur activité peroxydasique. Elles sont contrôlées par la composition du milieu d'induction de racines et par les conditions d'éclairement.

Par modification de la composition des milieux de culture, notamment par apport de proline, de naphthalène-acétamide et/ou d'ANA, le pourcentage d'enracinement des bourgeons chlorophylliens a été amélioré surtout quand le milieu de culture contient du saccharose (à  $10 \text{ g l}^{-1}$ ). En effet, l'ANA ( $10^{-7} \text{ M}$ ) apparaît comme le régulateur de croissance le plus efficace. Par ailleurs il s'est avéré que la présence de cette hormone durant toute la durée de culture n'est pas nécessaire. En effet, la capacité de formation de racines est également améliorée par un transfert des pousses feuillées, après la fin de la phase d'"induction" indiquée par le pic correspondant au maximum d'activité peroxydasique, d'un milieu additionné d'ANA sur un autre milieu sans régulateur de croissance ou additionné de rutine. Dans tous les cas le moment d'apparition des racines ne change pas par rapport au témoin (seizième jour).

Nous avons pu établir également une variation typique de l'activité des peroxydases solubles qui se traduit par une augmentation suivie d'une diminution précédant l'apparition des racines. Le profil cinétique obtenu est à rapprocher de celui de GASPARD (1981) montrant un pic d'activité avant l'apparition des primordium racinaires. Une corrélation entre activité peroxydasique et capacité néoformatrice de racines a été établie. Lorsque les bourgeons (chlorophylliens) sont obtenus à partir d'explantats racinaires éclairés continuellement, une forte activité peroxydasique conduit à un nombre important de vitroplants, alors que si l'activité peroxydasique est diminuée notamment par un prétraitement de la plante mère par un séjour préalable à l'obscurité, l'apparition des racines est très précoce et la capacité néoformatrice de racines est nettement améliorée.

Par la suite, les études concernant les effets de l'obscurité sur la capacité d'enracinement des bourgeons chlorophylliens montrent que plus la durée de la période obscure est longue, plus le taux d'enracinement est réduit voir même inhibé. Ceci pourrait s'expliquer par l'augmentation de l'activité peroxydasique après le pic d'activité peroxydasique contrairement à ce qu'on doit trouver pour améliorer le processus d'enracinement. Toutefois, il faut signaler qu'il y a moins de bourgeons chlorophylliens enracinés en lumière continue que lorsque ils sont soumis initialement à 3 jours d'obscurité pendant lesquels l'AP diminue.



L'obscurité exerce donc, en début de culture, un effet positif sur la capacité d'enracinement des bourgeons mais sans pour cela réduire le moment d'apparition des racines.

Enfin, l'acclimatation des vitroplants montre une grande conformité morphogène vis à vis de la plante mère (planche 6).

A la fin de chaque chapitre nous avons en conclusion fait ressortir les faits marquants de nos résultats et nous allons maintenant les replacer et les discuter dans le contexte de la littérature.

Pour notre expérimentation, les tissus végétaux utilisés sont ceux de la racine tubérisée de *Cichorium intybus*. Depuis quelques années, les travaux réalisés dans le laboratoire portent sur cette Astéracée d'intérêt économique et nos prédécesseurs ont montré que ces tissus possèdent de remarquables capacités de régénération d'organes et que l'on peut même orienter cette différenciation (LEFEBVRE, 1979; SENE et al., 1983).

Il est maintenant bien établi que la néoformation de cals, de bourgeons ou de racines est sous la dépendance de l'équilibre hormonal auxine/cytokinine (SKOOG et MILLER, 1957) et que, par ailleurs, les peroxydases peuvent intervenir comme auxine-oxydase (HOYLE, 1972) et ainsi moduler cet équilibre hormonal. Il nous a paru donc intéressant d'étudier l'évolution des enzymes du catabolisme auxinique au cours de la différenciation à partir de petits explantats racinaires cultivés *in vitro*.

Après une adaptation, à notre matériel végétal, des techniques déjà mises au point par LEGRAND (1987), nous nous sommes d'abord intéressé à l'activité auxine-oxydasique des tissus de racine de chicorée. Ces derniers, lors du prélèvement, présentent une activité auxine-oxydasique qui n'est plus mesurable après 6 jours de culture. Or GASPARD (1965) a montré que l'activité auxine-oxydasique est inhibée par certains composés phénoliques et par ailleurs LOOMIS et BATAILLE (1966) ont signalé qu'au cours de l'extraction, les composés phénoliques pouvaient s'oxyder et former des liaisons covalentes avec les protéines entraînant l'inactivation des enzymes. Nous avons donc pensé à ajouter au cours de l'extraction de la polyvinylpyrrolidone insoluble (PVP) qui a la propriété d'empêcher l'association de ces inhibiteurs avec les enzymes au cours de l'extraction (CASTILLO et al., 1981). **Ce procédé nous a permis de mesurer une activité auxine-oxydasique dans les tissus de chicorée après plusieurs jours de culture *in vitro*.** Il existe donc dans ces tissus des protecteurs d'auxine qui sont éliminés par le PVP lors de l'extraction. Ce dernier fixe donc tout ou partie des composés phénoliques dont le rôle dans la régulation de l'activité auxine-oxydasique a été largement démontré (STONIER, 1972; STONIER et al., 1979; LEE et al., 1982; GARCIA-FLORENCIANO et al. 1991 a). Nos résultats confirment ceux de POUX et OURNAC (1972), GARCIA-FLORENCIANO et al. (1991 a, b.)

Cette méthodologie pose le problème de la validité d'une telle mesure. En effet lors de l'extraction, la compartimentation des composés cellulaires est supprimée et l'extrait contient un mélange de nombreux composés qui étaient cloisonnés dans la cellule.

La compartimentation des peroxydases est bien connue (LEE, 1973; LEGRAND et DUBOIS, 1977; IMBERTY et al., 1985; GARCIA FLORENCIANO et al., 1991 b; FERRER et al., 1991 a) nous avons, par une extraction fractionnée, voulu savoir si les peroxydases solubles, liées ioniquement et/ou de façon covalente présentaient une activité auxine-oxydasique. **Nos résultats montrent un parallélisme parfait entre activité auxine-oxydasique et peroxydasique** (GASPAR et XHAUFFLAIRE, 1967; LEGRAND et DUBOIS, 1977). Ce parallélisme a fait que nous avons abandonné les mesures de l'activité auxine-oxydasique en considérant uniquement l'activité peroxydasique avec comme corollaire que toute augmentation d'activité peroxydasique était le reflet d'une augmentation du catabolisme auxinique et inversement que la diminution de l'activité peroxydasique était synonyme d'une diminution de la dégradation de l'auxine endogène.

Si une faible concentration de PVP favorise le dosage des deux activités peroxydasique et auxine-oxydasique, **des quantités plus importantes permettent une amélioration de la mesure de l'activité auxine-oxydasique mais diminuent l'activité peroxydasique**. Nous supposons que parmi les phénols fixés par le PVP, il existe non seulement des inhibiteurs de l'activité auxine-oxydasique mais aussi des activateurs de l'activité peroxydasique. Cette hypothèse permettrait d'expliquer les résultats de GARCIA-FLORENCIANO et al. (1991 b) qui montrent que les anthocyanes inhibent l'activité auxine-oxydasique dans les suspensions cellulaires de la vigne alors qu'ils n'ont aucun effet sur l'activité peroxydasique.

Il existe une relation entre activité peroxydasique et teneur en phénols des explantats de *Cichorium intybus*. L'activité peroxydasique est faible quand la teneur en phénols totaux est élevée dans les tissus et inversement quand il y a une diminution de la quantité des phénols, une augmentation de l'activité peroxydasique est observée (LEGRAND, 1987). **Il serait donc intéressant de connaître la nature des composés phénoliques fixés par le polyclar ainsi que leur action sur l'activité peroxydasique d'une part et l'activité auxine-oxydasique d'autre part.**

Nous avons constaté que les activités peroxydasique et auxine-oxydasique sont plus importantes dans les fractions solubles que dans les fractions ioniques qui elles mêmes présentent des activités peroxydasique et auxine-oxydasique plus fortes que celles des fractions covalentes. **Les peroxydases solubles sont donc les plus représentées dans les extraits de tissus de chicorée.** Ceci est vrai quelles que

soient les conditions d'éclairement et la composition du milieu de culture, par conséquent pour la suite de nos expériences seules les peroxydases solubles ont été analysées pour témoigner des modifications du catabolisme auxinique dans les tissus de *Cichorium intybus*. Ces résultats montrant l'importance de l'activité dans les fractions solubles, rejoignent ceux trouvés par ROBINSON et al. (1989) et GARCIA-FLORENCIANO et al. (1991b).

Si ROS BARCELO et al. (1987) ont trouvé que chez le lupin les isoperoxydases acides sont surtout représentées dans les fractions covalentes, chez la vigne GARCIA-FLORENCIANO et al. (1991b) ont montré que ces isoenzymes sont révélées dans la fraction soluble alors que les fractions covalentes ne présentent que des isoperoxydases basiques. **Chez la chicorée, les résultats d'électrophorèse ont mis en évidence des profils isoperoxydasiques différents selon chaque fraction.** Ainsi, la fraction soluble contient aussi bien des isoperoxydases basiques qu'acides, dans la fraction ionique ne sont présentes que les isoperoxydases basiques et la fraction covalente est représentée essentiellement par des isoperoxydases acides.

**Une activité auxine-oxydasique a été mesurée dans chacune des fractions même dans la fraction covalente** dont les isoperoxydases sont pour la plupart acides qui sont généralement connues comme des isoenzymes intervenant dans le processus de lignification. Des résultats identiques ont été trouvés par CHIBBAR et VAN HUUSTEE (1984) sur les cellules d'arachide et PRESSEY (1990) sur la tomate. Par conséquent *in vitro* n'importe quelle isoperoxydase est capable de dégrader l'AIA, en est-il de même *in vivo*? Le problème reste entier.

Un autre problème se pose, celui du nombre des isoperoxydases et du choix des co-substrats. Pour nos expériences, la révélation des isoperoxydases de chicorée sur gel d'amidon a été réalisée en présence de gaïacol ou de benzidine. Il est évident que la benzidine permet une meilleure résolution des isoperoxydases et que l'utilisation d'autres co-substrats aurait donné des résultats, peut être, différents. En effet, certains isoperoxydases présentent des affinités plus ou moins grandes selon le donneur d'électrons utilisé (ROS BARCELO et al., 1987; FERRER et al., 1991a; CALDERON et al., 1992). Ceci aboutit parfois à des résultats contradictoires puisque ROS BARCELO (1987) montre que des isoperoxydases acides, donc réputées comme intervenant dans les étapes de synthèse de lignine, ne réagissent pas avec la syringaldazine alors qu'elles oxydent le gaïacol. De même TIGIER et al. (1991) ont montré une activité gaïacol-peroxydase et AIA-oxydase de toutes les isoperoxydases alors que l'activité syringaldazine-peroxydase n'était décelable que dans quelques isoperoxydases basiques. Enfin, PANG et al. (1989) ont montré qu'*in vitro*, les peroxydases pariétales oxydent la syringaldazine alors qu'*in vivo*, seules les isoperoxydases impliquées dans le processus de lignification interviennent dans cette oxydation.

**Dans notre cas, l'utilisation de donneurs d'électrons différents ne se justifiait pas puisque notre but était de comparer les profils isoperoxydasiques en fonction de la morphogenèse.**

Nous avons pu orienter, en modifiant la composition des milieux de culture, la différenciation des tissus de chicorée et notre étude a alors porté sur l'évolution de l'activité peroxydasique et des profils isoperoxydasiques au cours de la callogénèse, de la caulogénèse et la rhizogénèse.

Il faut d'abord noter que le développement des explantats se traduit dans tous les cas par l'apparition d'un cal dans lequel des méristèmes se forment. L'émergence des organes est relativement décalée dans le temps: **les premiers bourgeons sont visibles au dixième jour alors que les racines n'apparaissent qu'au seizième jour de culture.** Comme nous voulions étudier les modifications métaboliques précoces susceptibles d'orienter la différenciation, nos analyses ont été faites avant l'émergence des organes.

La croissance exprimée par la masse de matière fraîche augmente considérablement pour les explantats cultivés sur les milieux rhizogène et callogène et faiblement sur le milieu caulogène. Nous avons montré une entrée d'eau considérable dans les deux premiers cas, entrée d'eau due à la présence de fortes concentrations en ANA dans les milieux concernés (HACKETT et THIMANN, 1952; KETELAPPER, 1953).

Si nous choisissons comme critère de croissance la masse de matière sèche, nous constatons sur le milieu callogène une diminution de la croissance. Ce milieu de culture ne contient pas de glucose et la perte de la masse de matière sèche pourrait s'expliquer par une hydrolyse des fructosanes qui constituent la principale réserve de carbohydrates dans les racines tubérisées de *Cichorium intybus* (environ 15 % de la masses de matière fraîche).

Par conséquent la masse de matière fraîche et de matière sèche sont des critères qui reflètent assez mal la croissance, par contre les mesures des teneurs en protéines au cours des premiers jours de culture peuvent être interprétées comme des modulations de la croissance au cours du développement.

Nous pouvions escompter, compte tenu des corrélations entre croissance et peroxydase (LEGRAND et DUBOIS, 1977, SANCHEZ et al., 1989; ZHENG et VAN HUUSTEE, 1992) des diminutions d'activité peroxydasique quand la croissance était forte et inversement des activités peroxydasiques fortes pour une croissance faible. Les résultats des études cinétiques de l'activité peroxydasique nous ont montré au contraire des variations typiques suivant l'orientation morphogène. Cela signifie que ces

variations ne sont pas liées uniquement à la croissance mais bien au phénomène de différenciation. Par exemple, un pic d'activité peroxydasique est décelable au sixième jour de culture sur le milieu caulogène, alors que sur le milieu rhizogène ce pic intervient au douzième jour. Par contre, sur le milieu callogène, où seule une prolifération cellulaire intervient, les variations d'activité peroxydasique sont faibles sans pic d'activité.

Par conséquent, un pic d'activité peroxydasique précède toujours l'émergence des organes, il est donc caractéristique de la différenciation et laisse supposer une intervention des peroxydases au cours de ce phénomène. De plus, le moment d'apparition du pic est caractéristique de l'organe néoformé.

Les moment d'apparition différents des pics pourraient être reliés à l'ontogenèse des organes. En effet, le processus de bourgeonnement passe par différentes étapes. Généralement, la néoformation de bourgeons débute par une activation et une dédifférenciation cellulaire. Une activité mitotique et l'induction des nodules méristématiques sont observées par la suite.

ATTFIELD et EVANS (1991) ont montré que chez *Nicotiana tabacum* les cellules du parenchyme palissadique et de la gaine périvasculaire se divisent pour former les nodules méristématiques qui seront à l'origine des primordiums caulinaires. Les divisions cellulaires commencent au quatrième jour et les nodules des cellules en division contenant les trachéides sont observés au huitième jour. Au neuvième jour les méristèmes apparaissent et les primordiums caulinaires deviennent visibles au douzième jour.

Chez les explantats racinaires de la chicorée on peut constater une période d'activation cellulaire suivie d'une phase de préparation à la différenciation cellulaire se terminant au troisième jour, par l'apparition des premières cellules méristématiques à l'origine des futurs bourgeons (ROGER et VASSEUR, 1983). C'est durant cette période que l'activité peroxydasique augmente dans nos explantats jusqu'à un maximum après lequel les bourgeons commencent à devenir visibles.

L'évolution particulière de l'activité peroxydasique au cours du bourgeonnement rejoint celle trouvée par THORPE et al.(1978) chez le tabac, VON ARNOLD et GRONROOS (1986) chez *Picea abies* et LEGRAND (1987) chez la chicorée.

Au cours de la rhizogenèse, de nombreuses études ont montré que l'origine ainsi que la durée de ce processus morphogène varient en fonction de l'espèce végétale. Dans la plante, existent des cellules pré-rhizogènes qui ont la propriété de répondre en premier à toute stimulation conduisant à la néoformation de racines (CHRIQUI, 1985).

Généralement, les racines ont une origine profonde (à proximité des faisceaux vasculaires). Les primordiums racinaires prennent naissance à partir du phloème (SATO, 1955) mais aussi dans les cellules du parenchyme des rayons phloémiens chez *Hydrangea macrophylla* (MOLNAR et LACROIX, 1972) et chez *Hedera helix* (GIROUARD, 1967) ou encore dans les cellules parenchymateuses près du cambium interfasciculaire du Pois (BOLLMARK et al., 1988), ou à partir de la gaine périvasculaire et les cellules du parenchyme vasculaire chez le tabac (ATTFIELD et EVANS, 1991).

Chez *pinus sylvestris*, GRÖNROOS et VAN ARNOLD (1985) ont montré que les primordiums racinaires peuvent aussi apparaître dans les cals et ils ont montré que le processus de callogenèse et de rhizogenèse ont tous les deux un aspect histocytologique similaire. Ils ont observé la formation de tissu vasculaire composés de trachéides courtes à partir desquels se développent les racines. FUKUDA et KOMARINE (1982) ont montré que ces trachéides se forment au niveau des parois secondaires qui se lignifient. Donc, si la néoformation d'organes, *in vitro*, débute par la formation de trachéides, ceci devrait se refléter au niveau des isoperoxydases plus particulièrement celle impliquées dans le processus de lignification.

Le peu de variations constatées concernant les isoperoxydases acides chez la chicorée ne nous permettent pas d'aboutir aux conclusions de GASPARD (1981) qui montre que la période d'induction de la rhizogenèse est caractérisée par une augmentation de l'activité peroxydasique totale due à une augmentation des isoperoxydases cationiques et anioniques et la période d'initiation correspond à une chute de l'activité peroxydasique accompagnée d'une diminution des isoperoxydases cathodiques et d'une accentuation continue des isoperoxydases anioniques jouant un rôle au cours de la dernière étape de la synthèse de lignine.

**En ce qui concerne les isoperoxydases cationiques, des variations d'activité ont été observées. Toutefois, aucune différence des profils isoperoxydasiques ne peut être décelée entre explantat caulogène ou rhizogène. Nous avons pu montrer qu'un tissu orienté vers la prolifération cellulaire uniquement présente moins d'isoperoxydases (absence de deux isoperoxydases basiques C<sub>2</sub> et C<sub>5</sub>) que lorsqu'il différencie des organes et ceci rejoint les observations de KEVERS et al., 1981 démontrant que chez la betterave à sucre le nombre d'isoperoxydases est moins important dans les conditions non organogènes.**

Les résultats trouvés montrent que si on considère uniquement la condition de lumière qui est favorable au bourgeonnement et à la rhizogenèse, il apparaît que **les isoperoxydases ne peuvent pas servir de marqueur moléculaires de la nature de l'organe néoformé; par contre les profils des cinétiques d'activité peroxydasique présentent des pics qui sont des marqueurs spécifiques de**

**l'organogenèse** (GASPAR 1981; MONCOUSIN et GASPAR, 1983; KRSNIK-RASOL, 1991).

Les facteurs physiques (lumière, obscurité) peuvent jouer un rôle sur la morphogenèse et exercent une influence sur l'activité peroxydasique (LEGRAND, 1987; DRUART, 1982; MONCOUSIN, 1982; CHENG et REISCH, 1989, SAITOU et al., 1992). Dans les tissus de *Cichorium intybus*, la lumière favorise aussi bien la caulogenèse que la rhizogenèse. Cet effet favorable de la lumière sur le bourgeonnement a déjà été signalé par MURASHIGE (1974) sur l'orchidée et LEGRAND (1974) sur les tissus étiolés d'endive. Par contre nos résultats sont en désaccord avec ceux trouvés chez les pousses de *Malus* (DRUART et al., 1982; JAMES, 1983; ZIMMERMAN, 1984; VAN DER KRIEKEN et al., 1992) qui ont montré que la lumière réduit plutôt la formation de racines adventives et chez la vigne (CHENG et REISCH, 1989) où la régénération des pousses feuillées est inhibée par la lumière.

**Les explantats racinaires de *Cichorium intybus* cultivés à l'obscurité présentent toujours une activité peroxydasique supérieure à celle des tissus éclairés. Cette différence se traduit, dans les conditions d'induction de l'organogenèse, par l'expression à l'obscurité d'une isoperoxydase basique à forte migration électrophorétique (C<sub>5</sub>). L'absence de cette isoperoxydase à la lumière pourrait s'expliquer d'une part par le fait qu'elle soit masquée par les composés phénoliques qui sont synthétisés en grande quantité lorsque les tissus sont éclairés ou d'autre part par la répression à la lumière du gène de cette isoenzyme. La première hypothèse trouve ses sources dans la littérature, où l'absence d'une isoperoxydase ne serait pas forcément liée à sa non synthèse, mais plutôt à sa non révélation suite à une inactivation par les composés phénoliques (LEGRAND et al., 1976; SRIVASTAVA et VAN HUYSTEE, 1977; CASTILLO et al., 1981). Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait disposer d'anticorps spécifiques de l'isoperoxydase et qui ne reconnaissent pas des groupements glycosylés qui seraient communs à d'autres peroxydases ou même d'autres protéines.**

**Par ailleurs, il semblerait que cette isoperoxydase C<sub>5</sub> soit spécifique du tissu racinaire, car à partir de tissus de feuille étioyée de *Cichorium intybus*, cultivé à l'obscurité, LEGRAND (1987) n'a pas constaté cette isoenzyme supplémentaire.**

Les expériences de morphogenèse sont menées à partir de milieu de compositions très différentes. Nous pouvions alors nous demander si les variations peroxydasiques observées étaient directement corrélées aux programmes



## morphogénétiques ou au contraire induites par les composants du milieu.

Les effets des sucres sur la production de bourgeons sont différents selon le matériel végétal. Chez le tabac (BARG et al., 1976, BROWN et al., 1979), la carotte (NEUMANN et GARCIA, 1974) des concentrations élevées de saccharose inhibent la formation de pousses feuillées par contre elles la favorisent chez *Populus* (DOUGLAS, 1985) et chez le tabac (KAUL et SABHARWAL, 1971; FOSSARD et al., 1974; THORPE, 1974). Il n'existe donc pas de règle générale et ces résultats contradictoires peuvent être attribuées soit à la différence génétique des lignées utilisées (LINSMAIER et SKOOG, 1965; EDELMAN et HANSON, 1971) soit pour une même espèce à des différences des conditions expérimentales. Par exemple BADILA et al. (1991) trouvent un effet stimulant du saccharose sur la néoformation de bourgeons de chicorée, mais ces auteurs expérimentent sur des explantats de grande taille dont le contenu en substrats métabolisables et phytohormones endogènes proportionnellement plus important que nos petits explantats doit influencer le développement.

Chez *Cichorium intybus*, nos résultats montrent que l'influence du glucose sur le bourgeonnement se traduit par une diminution du nombre de bourgeons à mesure que sa concentration augmente. La lumière favorise le bourgeonnement, mais ceci n'est vrai que si le glucose est présent à des concentrations faibles puisqu'à l'obscurité, on constate le phénomène inverse.

La variation des teneurs en glucose endogène dans les tissus de chicorée pourrait être l'un des facteurs intervenant dans la différence de l'inhibition du bourgeonnement par de fortes concentrations en glucose entre les explantats cultivés à la lumière ou maintenus à l'obscurité. En effet, quand ils sont cultivés à la lumière, les tissus racinaires deviennent chlorophylliens dès le deuxième jour de culture et par conséquent le glucose ajouté au milieu de culture en plus de celui synthétisé par photosynthèse aboutit à des concentrations supraoptimales ce qui expliquerait l'inhibition de la formation des bourgeons. Par contre, lorsque les explantats racinaires sont cultivés à l'obscurité l'augmentation de la teneur en sucres exogènes compense l'absence de photosynthèse et donc les concentrations dans les tissus sont trop faibles pour inhiber le bourgeonnement. Cette explication serait corroborée par les résultats de BADILA et al. (1991) qui ont montré que lorsque l'héméropériode est réduite à 9 heures, l'adjonction de saccharose (2 à 5 %) à un effet favorable sur la néoformation de bourgeons floraux à partir d'explantats racinaires de *Cichorium intybus* sans que le nombre moyen de bourgeons par explantats soit supérieur à celui trouvé sous une héméropériode de 16h. Les sucres compensent donc partiellement l'effet de la lumière en jours courts.

Lorsque la teneur en sucre du milieu de culture est augmentée, nous avons pu constater que la diminution de capacité de bourgeonnement des explantats était précédée dans les premiers jours de culture par une diminution de l'activité peroxydasique. Ceci confirme les résultats de LEGRAND (1987) montrant qu'une forte activité peroxydasique, en début de culture, conduit à un nombre important de bourgeons néoformés alors qu'inversement si l'activité peroxydasique est diminuée, dans notre cas par de fortes concentrations en glucose, le nombre de bourgeons néoformés est plus faible. **Les profils isoperoxydasiques par contre ne sont pas affectés par la présence du glucose dans le milieu de culture.**

**Le glucose n'intervient donc pas sur l'orientation de la morphogenèse, il ne modifie que le nombre de bourgeons néoformés, et en diminuant l'activité peroxydasique aux fortes concentrations, il diminue le catabolisme de l'auxine endogène qui défavorise la caulogenèse.**

Chez *Cichorium intybus*, la présence d'ANA dans le milieu de culture **inhibe complètement la formation de bourgeons**. Ce résultat confirme celui trouvé par LEFEBVRE et al. (1992) à partir des tissus de chicorée. Par contre la **néoformation de racines adventives à partir des petits explantats racinaires est optimale en présence de  $10^{-6}$  M**. Des concentrations élevées provoquent uniquement l'apparition de cals sans aucune manifestation organogène apparente.

Les cytokinines ont été définies comme des composés qui, en présence de concentration optimale d'auxine, induisent la division cellulaire (LETHAM, 1978). Ces phytohormones interviennent également dans la croissance et la différenciation cellulaire. Elles agissent également sur de nombreux processus physiologiques liés à la croissance et au développement des plantes (SKOOG et AMSTRONG, 1970) notamment durant la rhizogenèse. Dans certains cas, les cytokinines sont considérées comme inhibitrices de l'enracinement, cependant, chez certaines espèces, un faible apport de ces hormones peut permettre un bon enracinement.

Dans nos expériences, la combinaison d'autres facteurs hormonaux tels que l'acide gibbérellique et/ou la kinétine à l'ANA a montré que **les associations ANA-Kinétine et ANA-AG<sub>3</sub> augmentent le nombre d'explantats produisant des racines** ce qui confirme les résultats de SENE et al. (1983), alors que l'association de ces trois hormones le diminue. Nous proposons donc de simplifier le milieu de rhizogenèse signalé par SENE et al. (1983) (contenant les trois hormones précitées) en

utilisant l'ANA à la concentration  $10^{-6}$  M associé soit à la kinétine ( $10^{-7}$ ) M ou à l'acide gibbérellique ( $10^{-5}$  M). Il faut également signaler qu'au cours de toutes les expériences réalisées, **le processus de rhizogenèse est favorisé en présence de glucose.**

La production de racines n'est donc améliorée de manière notable que lorsque les explantats racinaires de *Cichorium intybus* bénéficient d'un apport équilibré en glucides, auxines et cytokinines. La lumière, l'acide gibbérellique ou la kinétine associé à l'ANA sont par ailleurs capables de promouvoir la formation des racines. L'effet favorable de la lumière sur la rhizogenèse a été signalé également par SENE et al., (1983).

**L'activité peroxydasique est considérablement inhibée par de fortes concentrations d'acide naphthyl-acétique provoquant la formation de cals ce qui se traduit par l'absence de deux isoperoxydases basiques C<sub>2</sub> et C<sub>5</sub>,** quelles que soient les conditions d'éclairement. Or on a déjà vu que lorsque les explantats racinaires sont cultivés sur le milieu callogène, l'activité peroxydasique est faible et ces deux isoperoxydases sont également absentes. Ceci nous laisse supposer que c'est cette hormone qui est responsable de l'inhibition de l'activité peroxydasique et du nombre réduit d'isoperoxydases d'explantats cultivés sur le milieu callogène. L'isoperoxydase C<sub>5</sub> ne serait donc pas uniquement réprimée par la lumière, mais aussi par une forte concentration d'ANA.

Chez la chicorée nous avons constaté que les cytokinines ne sont pas indispensables à l'initiation des bourgeons. Toutefois nous avons pu montrer que la nature et la concentration de ces cytokinines agissent considérablement sur la capacité de bourgeonnement et le nombre moyen de bourgeons produits par explantat. En présence de la BAP les tissus racinaires perdent leur capacité de produire des bourgeons, tandis que la kinétine et la 2 IP augmentent le nombre moyen de bourgeons néoformés par explantat. Ces résultats contradictoires pourraient être attribués soit à la modification du rapport endogène auxine-cytokinine, soit à une sensibilité différente des tissus racinaires aux différentes cytokinines, ou à leur capacité de les métaboliser (NIEDERWIESER et van STADEN, 1992). AUER et al. (1992) qui ont étudié le métabolisme de la BAP en relation avec ses effets sur la caulogénèse de *Petunia*, ont montré que la base libre BAP n'était pas décelable pendant la phase d'induction et ils ont postulé que le pool des conjugués BAP serait une forme de réserve à court terme de la cytokinine active. **L'évolution typique de l'activité peroxydasique au cours du bourgeonnement n'est pas retrouvée en présence de BAP.** En effet, plus faible en début de culture, cette activité continue d'augmenter après le sixième jour. Des résultats similaires ont été trouvés par BHARTI et LALORAYA (1981) sur les cotylédons du concombre et qui ont suggéré que l'augmentation tardive de l'activité peroxydasique n'est pas une action directe de la

benzyladenine mais peut-être le résultat de quelques réactions secondaires déclenchées par cette hormone ou par ses produits métaboliques.

La réaction rapide induite par la kinétine et la 2 IP et la réponse tardive à la BAP sur l'activité peroxydasique pourraient également être liées aux affinités différentes des récepteurs concernant le type de cytokinine utilisée. Mais il est difficile d'argumenter uniquement sur la différence de métabolisme de la kinétine, 2 IP et la BAP. Plusieurs autres facteurs tels que le taux d'absorption, l'affinité des récepteurs, la modification du rapport auxine/cytokinine sont probablement à prendre en considération.

Afin de mieux comprendre le mode d'action de ces différentes cytokinines, **il serait nécessaire de réaliser, au cours d'expériences de transferts, des applications séquentielles de chacune d'entre elles et d'analyser les teneurs endogènes de leurs formes libres et conjuguées.**

Conjointement, les profils isoperoxydasiques sont influencés par la nature et la concentration des différentes cytokinines et particulièrement par la **BAP qui exerce un effet inhibiteur sur l'expression d'isoperoxydases.** Contrairement à ce qu'ont trouvé RUCKER et MARKOTA (1977) chez le tabac où une augmentation de la concentration de BAP entraîne l'augmentation d'activité de certaines isoperoxydases, **chez la chicorée la présence de cette hormone à forte concentration entraîne l'absence d'une isoperoxydase basique (C<sub>2</sub>).** La régulation de l'expression de cette isoperoxydase semble tout à fait spécifique de la BAP puisqu'en présence de la kinétine et la 2 IP elle est exprimée. Toutefois, il faut signaler que l'effet inhibiteur de la BAP est temporaire puisqu'après le sixième jour de culture l'isoperoxydase C<sub>2</sub> est exprimée. Cette expression tardive pourrait s'expliquer par un retard dans le signal de transduction.

Donc l'expression de l'isoperoxydase C<sub>2</sub> semble indépendante du phénomène de bourgeonnement, mais est contrôlée par la concentration et la nature de la cytokinine. Par contre, **l'isoperoxydase C<sub>3</sub> dont l'activité est proportionnelle au pourcentage d'explantats caulogènes serait directement impliquée au cours de cette différenciation et en serait un marqueur biochimique.**

L'enracinement des bourgeons est parfois un problème délicat créant une barrière à l'obtention de vitroplants. Nous avons donc recherché les conditions optimales d'enracinement des bourgeons néoformés de chicorée. Les résultats les plus spectaculaires n'ont été obtenus qu'en présence de saccharose (10 g.l<sup>-1</sup>) et d'ANA (10<sup>-7</sup> M) appliqués pendant toute la durée de la culture. La présence constante des hormones

n'est pas toujours nécessaire (MONCOUSIN et GASPAR, 1983; BERTHON et al., 1990).

En nous inspirant de la stratégie mise au point par GASPAR et al. (1990) qui consiste, par des changements dans la composition des milieux et/ou des conditions de culture, à mimer le profil caractéristique de l'activité peroxydasique au cours de la rhizogenèse, nous avons tenté d'améliorer l'enracinement spontané, mais faible des bourgeons chlorophylliens de chicorée.

Par des expériences de transfert, nous avons augmenté sensiblement les capacités rhizogènes des bourgeons chlorophylliens. Ce transfert intervenait au sixième jour au moment où nous avons décelé le pic d'activité peroxydasique, pic qui d'après GASPAR (1981) est un indicateur de l'instant propice au transfert. Ce procédé, c'est-à-dire **la transplantation des bourgeons cultivés au préalable en présence d'ANA sur un milieu dépourvu de régulateur de croissance, nous a permis d'améliorer sensiblement l'enracinement des bourgeons**. Des résultats similaires ont été trouvés par GASPAR et al. (1977 a), MONCOUSIN et GASPAR (1983), BEKKAOUI et al. (1984), BERTHON et al. (1987, 1989, 1990).

Par ailleurs, **si on ajoute au milieu de transfert de la rutine, le pourcentage de bourgeons présentant des racines est augmenté**. Ce résultat est à rapprocher de ceux de GASPAR et al. (1977 a), MOSELLA et MACHEIX (1979), MOSELLA et al. (1980), MONCOUSIN et GASPAR (1983), GASPAR et al. (1985), BERTHON et al. (1987, 1989) pour qui les composés phénoliques ajoutés à la fin de la phase d'induction ont un effet stimulateur sur la rhizogenèse car ils diminuent l'activité peroxydasique. La rutine aurait donc un effet bénéfique sur l'enracinement en agissant comme protecteur de l'auxine (TOMASZEWSKI et THIMANN, 1966; LEE, 1980).

Chez *Cichorium intybus*, nous avons constaté que **les bourgeons étiolés, c'est-à-dire néoformés sur des explantats racinaires cultivés continuellement à l'obscurité, s'enracinent à 100 %**. Ces résultats confirment ceux de HERMANN et HES (1963); SACHS (1865) qui ont montré que les tissus étiolés forment, lorsqu'ils sont bouturés, plus de racines que les tissus chlorophylliens à condition cependant que l'absence de la photosynthèse soit compensée par un apport glucidique exogène.

**Si les profils isoperoxydasiques à partir des deux types de bourgeons sont les mêmes, l'activité peroxydasique est moins importante dans les bourgeons étiolés que dans les bourgeons chlorophylliens**. L'auxine serait donc moins dégradée dans les bourgeons étiolés ce qui expliquerait l'augmentation des explantats s'enracinant. De plus, **l'émergence des racines intervient au huitième jour pour les bourgeons étiolés alors qu'elles ne sont visibles qu'au seizième jour pour les bourgeons chlorophylliens**. Corrélativement, **le pic d'activité**

n'est pas toujours nécessaire (MONCOUSIN et GASPARD, 1983; BERTHON et al., 1990).

En nous inspirant de la stratégie mise au point par GASPARD et al. (1990) qui consiste, par des changements dans la composition des milieux et/ou des conditions de culture, à mimer le profil caractéristique de l'activité peroxydasique au cours de la rhizogenèse, nous avons tenté d'améliorer l'enracinement spontané, mais faible des bourgeons chlorophylliens de chicorée.

Par des expériences de transfert, nous avons augmenté sensiblement les capacités rhizogènes des bourgeons chlorophylliens. Ce transfert intervenait au sixième jour au moment où nous avons décelé le pic d'activité peroxydasique, pic qui d'après GASPARD (1981) est un indicateur de l'instant propice au transfert. Ce procédé, c'est-à-dire la **transplantation des bourgeons cultivés au préalable en présence d'ANA sur un milieu dépourvu de régulateur de croissance, nous a permis d'améliorer sensiblement l'enracinement des bourgeons**. Des résultats similaires ont été trouvés par GASPARD et al. (1977 a), MONCOUSIN et GASPARD (1983), BEKKAOUI et al. (1984), BERTHON et al. (1987, 1989, 1990).

Par ailleurs, si on ajoute au milieu de transfert de la rutine, le **pourcentage de bourgeons présentant des racines est augmenté**. Ce résultat est à rapprocher de ceux de GASPARD et al. (1977 a), MOSELLA et MACHEIX (1979), MOSELLA et al. (1980), MONCOUSIN et GASPARD (1983), GASPARD et al. (1985), BERTHON et al. (1987, 1989) pour qui les composés phénoliques ajoutés à la fin de la phase d'induction ont un effet stimulateur sur la rhizogenèse car ils diminuent l'activité peroxydasique. La rutine aurait donc un effet bénéfique sur l'enracinement en agissant comme protecteur de l'auxine (TOMASZEWSKI et THIMANN, 1966; LEE, 1980).

Chez *Cichorium intybus*, nous avons constaté que **les bourgeons étiolés, c'est-à-dire néoformés sur des explantats racinaires cultivés continuellement à l'obscurité, s'enracinent à 100 %**. Ces résultats confirment ceux de HERMANN et HES (1963); SACHS (1865) qui ont montré que les tissus étiolés forment, lorsqu'ils sont bouturés, plus de racines que les tissus chlorophylliens à condition cependant que l'absence de la photosynthèse soit compensée par un apport glucidique exogène.

Si **les profils isoperoxydasiques à partir des deux types de bourgeons sont les mêmes, l'activité peroxydasique est moins importante dans les bourgeons étiolés que dans les bourgeons chlorophylliens**. L'auxine serait donc moins dégradée dans les bourgeons étiolés ce qui expliquerait l'augmentation des explantats s'enracinant. De plus, **l'émergence des racines intervient au huitième jour pour les bourgeons étiolés** alors qu'elles ne sont visibles qu'au seizième jour pour les bourgeons chlorophylliens. Corrélativement, **le pic d'activité**

**peroxydasique intervient respectivement au troisième jour et au sixième jour pour les bourgeons étiolés et les bourgeons chlorophylliens.**

Ces variations d'activité peroxydasique, ainsi que celles trouvées au cours de la néoformation de racines à partir des explantats racinaires, sont à rapprocher de celles trouvées sur les boutures des plantes en rosette de *Cynara scolymus* (MONCOUSIN et GASPARD, 1983), des pousses feuillées de *Malus domestica* (DRUART et al., 1982), de tige de *Vitis riparia* (MONCOUSIN et al., 1989). Par ailleurs, il est intéressant de signaler qu'à partir de **tissus complètement différents à savoir les explantats racinaires et la base des bourgeons, nous avons trouvé une évolution d'activité peroxydasique parallèle avant l'émergence des racines.**

Toutefois, il est intéressant de signaler, qu'à partir des bourgeons étiolés, une diminution de l'activité peroxydasique a été observée au cours des 24 heures qui suivent l'enracinement. Cette chute précoce d'activité peroxydasique pourrait être interprétée par le fait que les bourgeons étiolés que nous avons utilisés se trouvent déjà induits et possèdent donc une aptitude préalable à l'enracinement (selon le concept de GASPARD, 1981). Cette hypothèse a déjà été émise par MONCOUSIN (1987) qui trouve également une chute d'activité peroxydasique spécifique au cours des premières heures qui suivent le bouturage des microboutures de vigne. Une telle diminution a été également signalée au cours de la rhizogenèse adventive de *Malus* (MONCOUSIN, 1986 c).

DRUART et al. (1982) ont signalé qu'un traitement à l'obscurité pendant la phase d'induction augmente le taux d'enracinement, par contre pour MONCOUSIN et GASPARD (1983) l'obscurité favorise la formation de racines lorsqu'elle est appliquée pendant la période d'initiation. Chez la chicorée, le traitement des bourgeons chlorophylliens à l'obscurité puis à la lumière montre que 3 jours seulement d'obscurité appliquée au début de la culture provoquent une augmentation significative du nombre de bourgeons enracinés par contre des durées plus longues l'inhibent. Toutefois, les traitements des bourgeons chlorophylliens par l'obscurité ne modifient pas le moment d'apparition du pic, mais par contre au delà de 6 jours d'obscurité nous ne constatons plus la chute correspondant à la période d'"initiation", ce qui se traduit par un nombre beaucoup plus faible de bourgeons enracinés.

---

Selon la composition du milieu de culture, les explantats racinaires de *Cichorium intybus*, cultivés *in vitro*, peuvent produire soit des racines, soit des bourgeons, soit des cals.

Dans la mesure où il était couramment admis que, chez les végétaux, certaines isoperoxydases ont une fonction auxine-oxydasique et participent donc à une régulation de la balance hormonale, le but initial de notre travail était de mesurer les variations des activités auxine-oxydasique et peroxydasique ainsi que les modifications des profils isoperoxydasiques au cours de la différenciation organogène d'explantats racinaires de chicorée de Bruxelles.

Au début de notre entreprise, la mesure de l'activité auxine-oxydasique s'est révélée être difficile et l'utilisation du polyvinylpyrrolidone insoluble nous a permis de lever cette difficulté. Un parallélisme parfait entre activité peroxydasique et activité auxine-oxydasique a été démontré, ce qui nous a conduit à ne nous intéresser qu'aux variations de l'activité peroxydasique, comme reflet des variations du catabolisme auxinique au cours des phénomènes de différenciation.

En effet, dans les conditions de culture qui induisent la néoformation d'organes, des pics d'activité peroxydasique apparaissent et sont caractéristiques du type d'organe néoformé: selon que les explantats produisent des bourgeons ou des racines, le moment de l'apparition du pic varie. Par contre les profils isoperoxydasiques sont identiques qu'il s'agisse de caulogenèse ou de rhizogenèse. Il apparaît donc que dans nos conditions expérimentales aucune isoperoxydase ne soit spécifique de la nature de l'organe néoformé. Cependant les conditions d'éclairement jouent apparemment un rôle sur la régulation de certaines isoperoxydases puisque l'isoperoxydase C<sub>5</sub> ne s'exprime qu'à l'obscurité dans les conditions organogènes. L'effet dépresseur de la lumière sur cette isoperoxydase mériterait une étude approfondie afin d'évaluer s'il s'agit d'une action pré ou post traductionnelle. Curieusement la présence de fortes teneurs en ANA dans le milieu de culture d'explantats cultivés à l'obscurité, mime l'effet de la lumière puisqu'elle entraîne également l'absence de l'isoperoxydase C<sub>5</sub>.

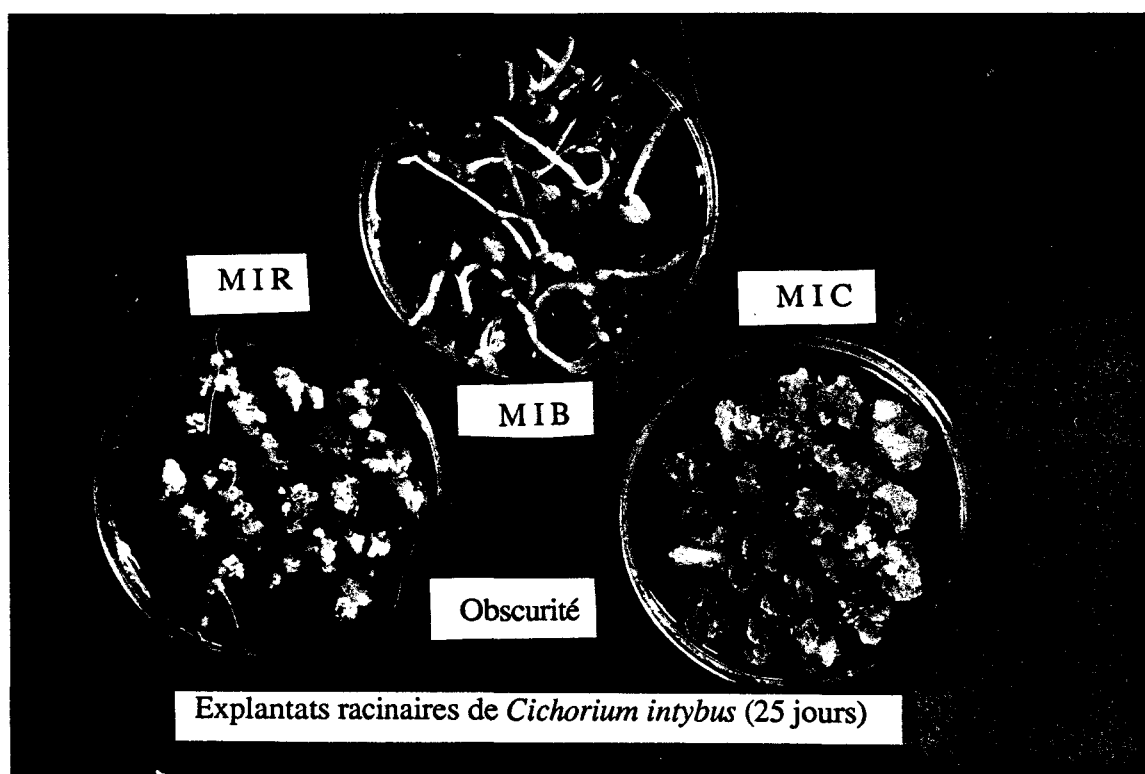
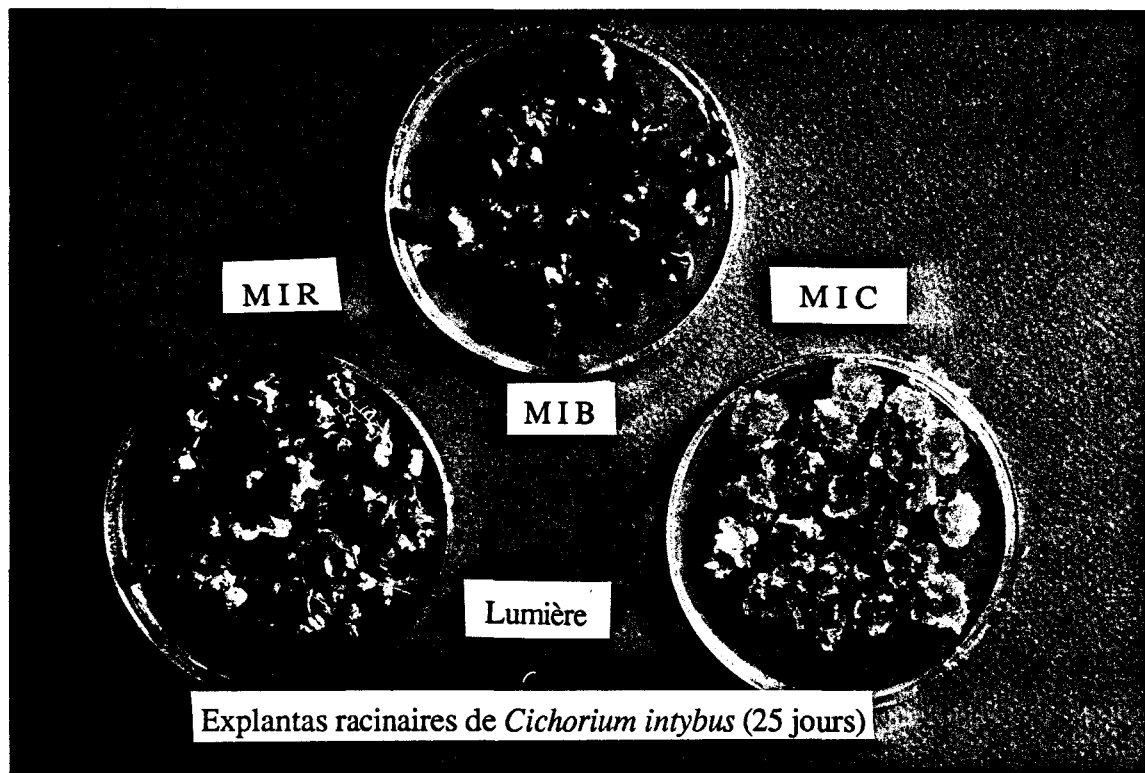
Il est intéressant de noter que les cytokinines n'agissent pas toutes de la même façon sur le bourgeonnement et sur le profil isoperoxydasique. D'une part, la kinétine et la 2 IP qui favorisent le bourgeonnement semblent agir également sur l'expression de l'isoperoxydase C<sub>3</sub> que nous avons considéré comme un marqueur de l'intensité du bourgeonnement. D'autre part, seule la BAP empêche l'expression de l'isoperoxydase C<sub>2</sub>, ce qui serait un effet spécifique de cette cytokinine. Ce résultat mérite d'être approfondi.



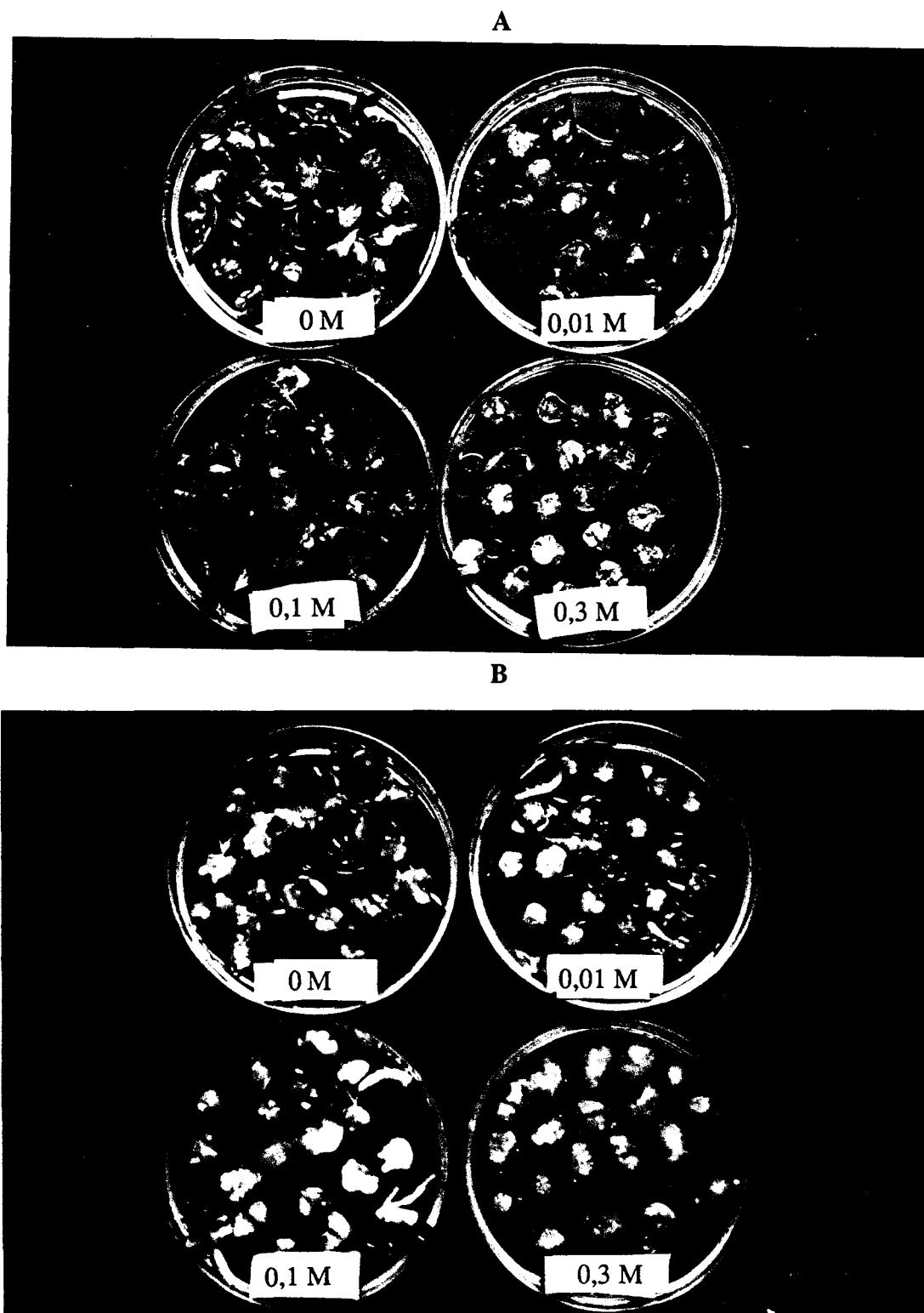
De même, le fait que la lumière, tout comme de fortes teneurs en ANA agissent sur C<sub>5</sub> laisse supposer qu'il peut exister des points communs dans la transduction des deux types de signaux, mais la confirmation de ce genre d'hypothèse nécessite encore un très gros travail.

Au cours de l'enracinement des bourgeons, l'utilisation de deux milieux de rhizogénèse nous a permis d'améliorer le pourcentage d'enracinement des bourgeons verts. Par contre, les bourgeons étiolés cultivés sur un milieu simple (sans régulateurs de croissance) s'enracinent à 100 %. Dans ce dernier cas, l'enracinement est plus rapide que dans le cas des bourgeons chlorophylliens et le moment d'apparition de pic d'activité peroxydasique pourrait être corrélée à la vitesse d'enracinement.

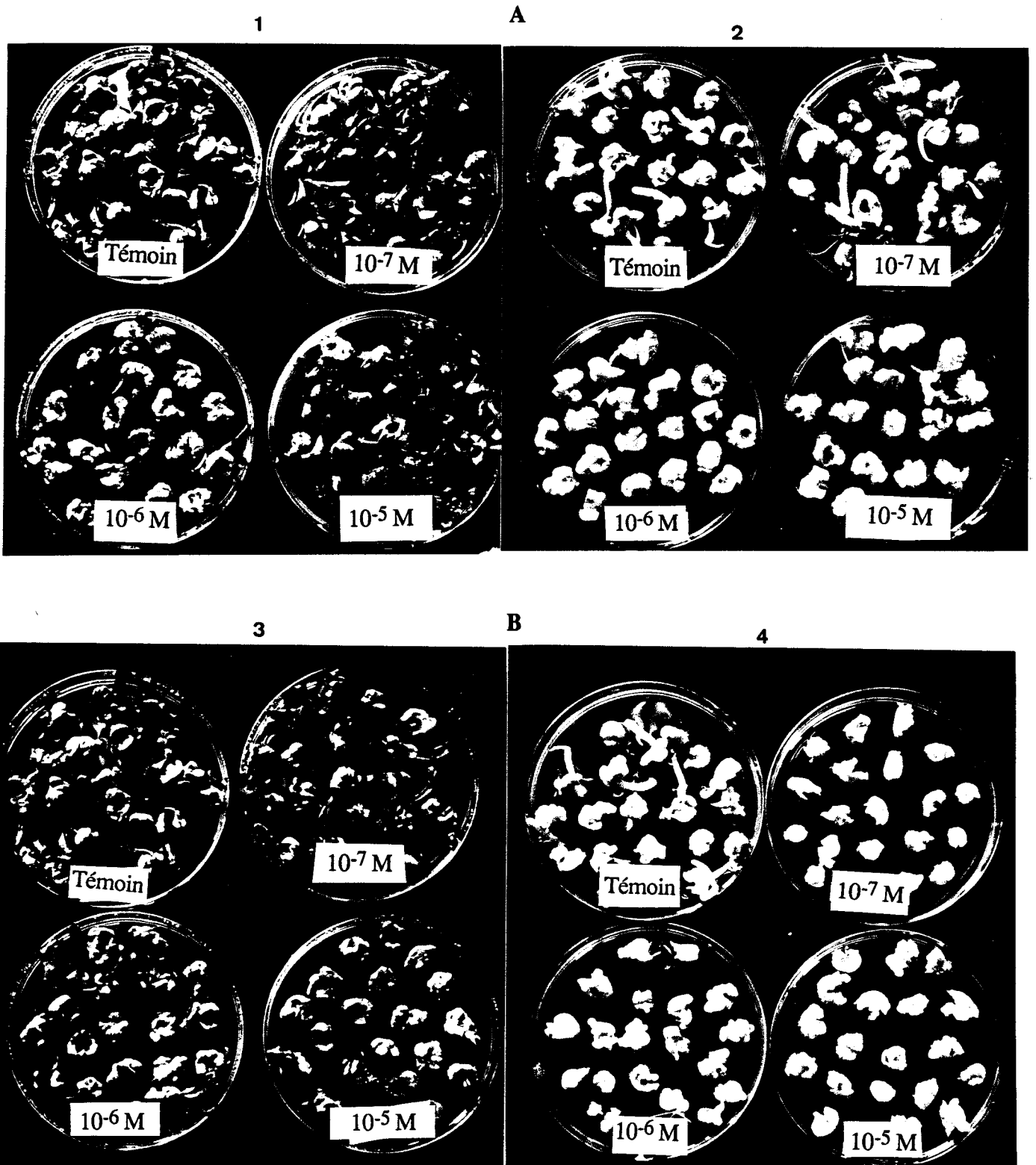
Nous sommes conscient, que vouloir expliquer la différenciation par la seule étude des variations peroxydasiques et isoperoxydasiques et les modifications des équilibres hormonaux endogènes qu'elles entraînent est insuffisante. Mais nous espérons que les résultats obtenus apporteront des éléments supplémentaires dans la compréhension de ce phénomène.



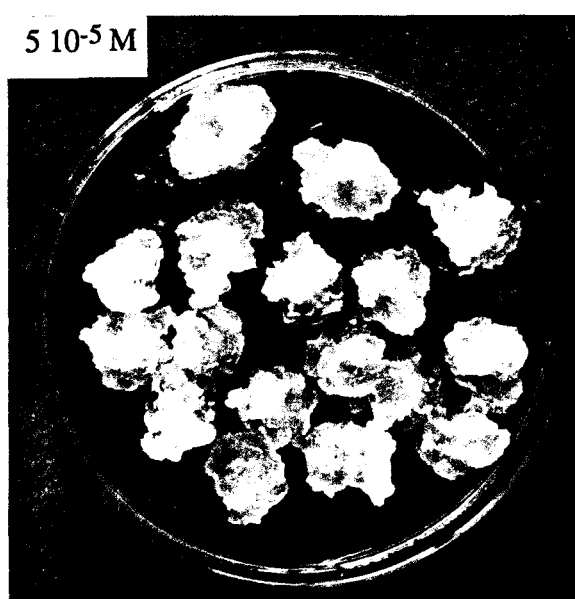
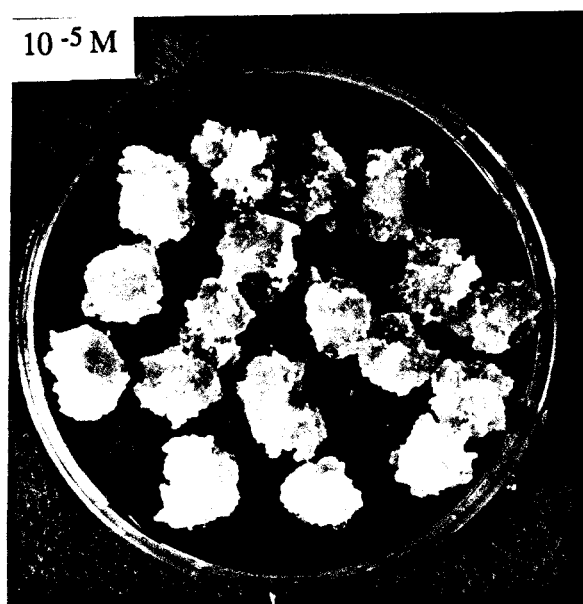
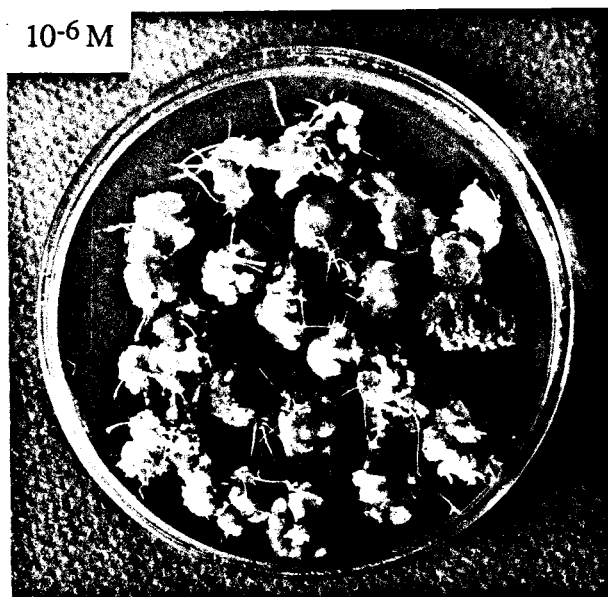
**Planche 1:** Explantats racinaires de *Cichorium intybus* cultivés pendant 25 jours à la lumière ou à l'obscurité sur des milieux induisant la formation de bourgeons (M I B), de racines (M I R) ou de cals (M I C).



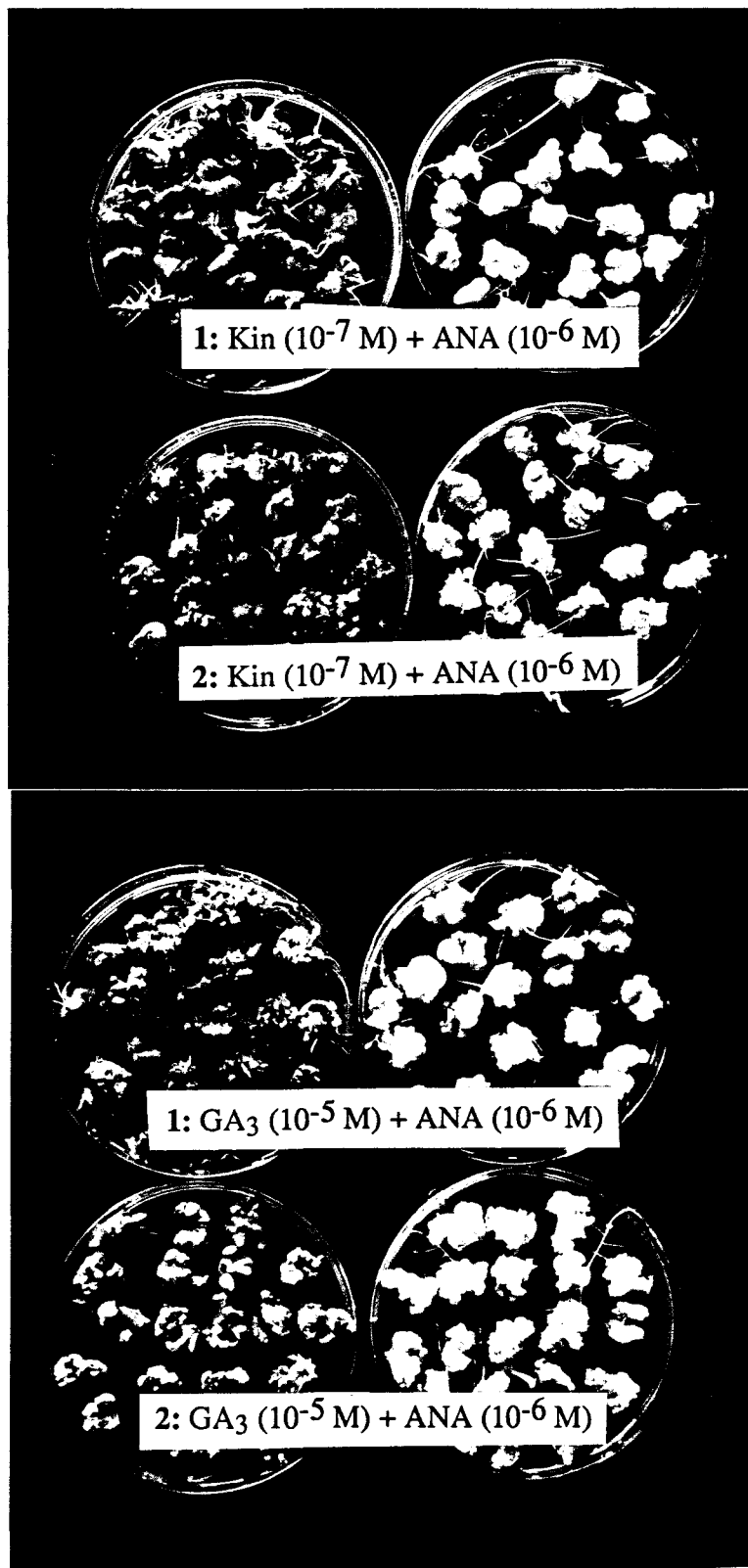
**Planche 2:** Explantats racinaires de *Cichorium intybus* cultivés pendant 25 jours à la lumière (A) ou à l'obscurité continue (B) en présence de différentes concentrations de glucose.



**Planche 3:** Explantats racinaires de *Cichorium intybus* cultivés pendant 25 jours à la lumière (1 et 3) ou à l'obscurité (2 et 4) en présence de différentes concentrations de kinétine (A) ou d'acide gibbérellique (B).



**Planche 4:** Explantats racinaires de *Cichorium intybus* cultivés pendant 25 jours à la lumière en présence de différentes concentrations d'ANA.



**Planche 5:** Explantats racinaires de *Cichorium intybus* cultivés pendant 25 jours à la lumière (à gauche) ou à l'obscurité (à droite) en présence d'ANA associé soit à la kinétine (Kin) ou à l'acide gibbérellique (GA<sub>3</sub>) en présence (1) ou en absence (2) de glucose.



Planche 6: *Cichorium intybus* obtenues après enracinement des bourgeons chlorophylliens (A) et étiolés (B).

---

ABELES F.B. and LEATHER G.R. (1971). Abscission: control of cellulase secretion by ethylene. *Planta*, **97**: 87-91.

ABELES F.B. (1973). Ethylene in plant Biology. Academic Press, London, 302p.

ABELES F. B., DUNN L. J., MORGENS P., CALLAHAN A., DINDERMAN R.E., and SCHMIDT J. (1988). Induction of 33-kd and 60 kd peroxidases during ethylene-induced senescence of cucumber cotyledons. *Plant Physiol.*, **87**: 609-615.

ACOSTA M., DEL RIO J. A., ARNAO M. B., SANCHEZ-BRAVO J., SABATER F., GARCIA-CARMONA F. and GARCIA-CANOVAS F. (1988). Oxygen consumption and enzyme inactivation in the indolyl-3-acetic acid oxidation catalysed by peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta*, **955**: 194-202.

AKASAWA S. and YONEI S. (1985). Mutation induction in *Escherichia coli* incubated in the reaction mixture of NADPH-dependent lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mutat. Res.* **149**: 321-326.

ANDERSEN J. M., OKKELS F., JORSBOE M., ULVSKOV P. and MARCUSSEN J. (1986). Plant peroxidase related to differentiation in *in vitro* cultures. In: Molecular and physiological aspects of plant peroxidases, eds, GREPPIN H., PENEL C. and GASPAR Th. Université de Genève, 353-359.

ATTFIELD E. M. and EVANS P. K. (1991). Developmental pattern of root and shoot organogenesis in cultured leaf explants of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc. *J. Exp. Bot.*, **42** (234): 51-57.

AUER C., LALOUE M., COHEN J. and COOKE T. (1992). Uptake and metabolism of benzyladenine during shoot organogenesis in *Petunia* leaf explants. *Plant Growth Regul.* **11**: 105-114.

BADILA P., MIKOU K. and PAULET P. (1991). Two distinct modes of action of light on the *in vitro* development of root explants of *Cichorium intybus* L. *J. Plant Physiol.* **138**: 370-375.



BANDURSKI R.S., SCHULZE A., LEZNICKI A., REINECKE D., JENSEN P., DESROSIERS M. and EPEL B. (1988). Regulation of the amount of IAA in seedling plants. In: KUTACEK M., BANDURSKI R.S, KREKULE J., Eds, Physiology and Biochemistry of Auxins in Plants. Acad., Praha, pp. 21-23.

BARG R. and UMIEL N. (1977). Effects of sugar concentrations on growth greening and shoot formation in callus cultures from four genetic lines of tobacco. Z. Pflanzenphysiol. Bd., 81.S. : 161-166.

BEKKAOUI F., ARNAUD Y., LARRIEU C. and MIGINIAC E. (1984). Etude comparative de la rhizogenèse *in vitro* du *Sequoia sempervirens* chez deux clones d'âges différents. Annales Rech. Sylv. 1983, AFOCEL, 5-25.

BERTHON J. Y., BOYER N. and GASPAR Th. (1987). Sequential rooting media and rooting capacity of *Sequoiadendron giganteum in vitro*. Peroxidase activity as a marker. Plant Cell Rep., 6: 341-344.

BERTHON J. Y., MALDINEY R., SOTTA B., GASPAR Th. and BOYER N. (1989). Endogenous levels of plant hormones during the course of adventitious rooting in cuttings of *Sequoiadendron giganteum in vitro*. Biochem. Physiol. Pflanzen., 184: 405-412.

BERTHON J. Y, BEN TAHAR S., GASPAR Th. and BOYER N. (1990). Rooting phases of shoots of *Sequoiadendron giganteum in vitro* and their requirements. Plant Physiol. Biochem. 28 (5): 631-638.

BHARTI S. and LALORAYA M. M. (1981). Changes in the activities of IAA oxidase, peroxidase, ascorbic acid utilization and in the endogenous level of paramagnetic  $Mn^{++}$  during benzyladenine-induced growth of excised Cucumber cotyledons. Biochem. Physiol. Pflanzen. 176: 447-453.

BHATTACHARYA N. C., KAUR N. P. and NANDA K. K. (1975). Transients in isopeoxidases during rooting of etiolated stem segments of *Populus nigra*. Biochemie und der Pflanzen, 167: 159-164.

BHATTACHARYA S. and NANDA K. K. (1978). Stimulatory effect of purine and pyrimidin losses and their role in the mediation of auxin action through the regulation of carbohydrate metabolism during adventitious root formation in hypocotyl cuttings of *Phaseolus mungo*. Z. Pflanzenphysiol., 88 (5): 283-293.

BOLER T. and KENDE H. (1979). Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. *Plant Physiol.*, **63**: 1123-1132.

BOLLMARK M., KUBAT B. and ELIASSON L. (1988). Variation in endogenous cytokinin content during adventitious root formation in pea cutting. *J. Plant Physiol.*, **132**: 262-265.

BORCHERT R. (1978). Time course and spatial distribution of phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activity in wounded potato tuber tissue. *Plant Physiol.*, **62**: 789-793.

BOUAZZA A., RAMBOUR S., GASPARD Th. and LEGRAND B. (1993). Peroxidases during the course of callusing and organ differentiation from root explants of *Cichorium intybus*. *Biologia Plantarum*, **35** (4): 481-489.

BOUZAYEN M., LATCHE A., PECH J. C. and ALIBERT G. (1987). In: MARTIN B. Eds.: *Plant vacuoles: their importance in plant cell compartmentation and their applications in biotechnology*. Plenum Press. N.Y., 449-454.

BOYER N. and DE JAEGER G. (1976). Direct or indirect role of peroxidase in ethylene biosynthesis? In: *Molecular and Physiological aspects of plant peroxidases*. GREPPIN H., PENEL C. and GASPARD Th. eds. Université de Genève: 47-660.

BOYER N., GASPARD Th. and LAMOND M. (1979). Modifications des isoperoxydases et de l'allongement des entre-noeuds de bryone à la suite d'irritation mécanique. *Z. Pflanzenphysiol.*, **93**: 459-470.

BOYER M., DESBIEZ M. O., HOFINGER M. and GASPARD Th. (1983). Effect of lithium on thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica* ethylene production and sensitivity. *Plant Physiol.*, **72**: 522-524.

BRADFORD M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.*, **72**: 248-254.

BREDEMEIJER GMM. and BLAAS J. (1983). Peroxidase in the cell walls and intercellular substance of pollinated *Nicotiana glauca* styles. *Acta Bot. Neerl.* **32**: 457-466.

BROWN D. C., LEUNG D. W. and THORPE T. A. (1979). Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. *Physiol. Plant.* **46**: 36-41.

CALDERON A., GARCIA-FLORENCIANO E., PEDRENO M. A., MUNOZ R. and ROS BARCELO A. R. (1992). The vacuolar localization of grapevine peroxidase isoenzymes capable of oxidizing 4-hydroxystilbenes. *Z. Naturforsch.*, **47c**: 215-221.

CASTILLO F. J., PENEL C., GASPAR Th. et GREPPIN H. (1981). Masquage et démasquage des isoperoxydases de *Pelargonium*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **292**: 259-262.

CASTILLO F. J., CELARDIN F. and GREPPIN H. (1984). Peroxidase assays in plants: interference by ascorbic acid and endogenous inhibitors in *Sedum* and *Pelargonium* enzyme extracts. *Plant Growth reg.*, **2**: 69-75.

CATESSON A. M., GZANINSKI Y. et MONTIES B. (1978). Histochemical characterization of cell wall peroxidase during lignification. *C. R. Acad. Sci.*, **286**: 1787-1790.

CATESSON A. M. (1980). Les tissus végétaux: ultrastructure, biogenèse, In: Les polymères végétaux. B. Monties eds., GAUTHIER VILLARS, Paris pp 1-29.

CATESSON A. M., IMBERTY A., GOLBERG R. and GZANINSKI Y. (1986). Nature, localization and specificity of peroxidases involved on lignification processus. In: Molecular and Physiological Aspects of plant peroxidase. GREPPIN H., PENEL C. and GASPAR Th., eds. 189-198.

CATESSON A. M. (1992). Plant peroxidases and cell differentiation: cyto-and histological aspects. In PENEL C., GASPAT Th. et GREPPIN H. *Plant peroxidases 1980-1990: Topics and detailed literature on molecular, biochemical, and physiological aspects*. Université de Genève. 117-124.

CHANDRA G. R., WORLEY J. F. GREGORY L. E. and CLARK H. D. (1973). Effect of 6-benzyladenine on the initiation of adventitious roots on mung bean hypocotyl. *Plant, Cell Physiology*, **14**: 1209-1212.

CHEN G-X. and ASADA K. (1989). Ascorbate peroxidase in tea leaves: Occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant cell Physiol.*, **30** (7): 987-998.

CHENG Z.-M. and REISCH B. I. (1989). Shoot regeneration from petioles and leaves of *Vitis X labruscana* 'Catawba'. *Plant Cell Rep.*, **8**: 403-406.

CHEN G-X., SANO S. and ASADA K. (1992). The amino acid sequence of ascorbate peroxidase from tea has a high degree of homology to that of cytochrome c peroxidase from yeast. *Plant Cell Physiol.*, **33**: 109-116.

CHIBBAR R. N., GURUMURTI K. and NANDA K. K. (1979). Changes in IAA oxidase activity in rooting hypocotyl cuttings of *Phaseolus mungo* L. *Experientia*, **35**: 202-203.

CHIBBAR R. N. and VAN HUYSTEE R. B. (1984). Characterization of peroxidase in plant cells. *Plant Physiol.*, **75**: 956-958.

CHIBBAR R.N. and VAN HUYSTEE R. B. (1986). Immunochemical localization of peroxidase in cultured peanut cells. *J. Plant Physiol*, **123**: 477-486.

CHRIQUI D. (1985). Induction de prolifération cellulaire des cellules pré-rhizogènes: auxine et polyamines. *Bull. Soc. Fr., Actual. Bot.* (1): 127-141.

CORDEWENER J., BOOJI H., VAN DER ZANDT H., VAN ENGELEN F., VAN KAMMEN A. and DE VRIES (1991). Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by secreted cationic peroxidase isozymes. *Planta*, **184**: 478-486.

DARIMONT E. et GASPAR Th. (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., SCHWACHHOFER and GASPAR Th. (1973). Isoperoxydases et hydroxyproline dans les parois cellulaires des racines de lentille. *Biochim. Biophys. Acta*, **321**: 461-466.

DAWSON J. H. (1988). Probing structure-fonction relations in heme containing oxygenases and peroxidases. *Sciences*, **240**: 433-439.

DENCHEVA A. and KLISURSKA D. (1982). Interaction between peroxidase and IAA-oxidase in the course of growth and differentiation of plant cell. *Physiol. Vég.*, **20**: 384-385.

DE JAEGER G., BOYER N. and GASPAR Th. (1985). Thigmomorphogenesis in *Bryonia dioica*: changes in soluble and wall peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase activity, cellulose, lignin content and monomeric constituents. *Plant Growth Regul.*, **3**: 133-148.

DESBIER M. O., BOYER N. and GASPAR Th. (1981). Hypocotyl growth and peroxidases of *Bidens pilosus*. Effect of cotyledonary prickings and lithium pretreatment. *Plant Physiol.*, **68**: 41-43.

DOLPHIN D., FORMAN A., BORG D. C., FRAJER J. AND FELTON R. H. (1971). Compound I of catalase and horse radish peroxidase: II cation radical. *Proceeding of the national Academy of Sciences USA*, **63**(3), 614-618.

DOUGLAS G.C. (1985). Formation of adventitious buds in stem internodes of *Populus hybrid* TT 32 cultured *in vitro* : Effects of sucrose, zeatin, IAA and ABA. *J. Plant Physiol.* **121**: 225-231.

DRUART P., KEVERS C. BOXUS P. and GASPAR Th. (1982). *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxydases. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.*, **108**: 426-436.

DUNFORD H.B. (1986). Catalytic mechanisms of plant peroxidases with emphasis on reactions of compounds I and II. *Molecular and Physiological aspects of plant peroxidases*. Eds. GREPPIN H., PENEL C. et GASPAR Th. Université de Genève, 15-23.

DUNFORD H.B. (1987). Free radicals in iron-containing systems, *Free Radical in Biology and Medecine*, **3**: 405-421.

DUNFORD H.B. (1990). Horse radish peroxidase; structure and kinetic properties. In *peroxidases, Chemistry and Biology*. EVERSE J. and GRISHAM M. B. Eds., CRC Press, New-York.

DUNFORD H.B. (1993). Mechanism of action of horseradish peroxidase: there is no water bound to the iron and the active site is accessible. In *Plant peroxidase Newsletter* (2); PENEL C., GASPAR Th. and GREPPIN H. Université de Genève, pp 11-13.

DUPILLE E., LATCHE A., ROQUES C. et PECH J. C. (1992). Stabilisation *in vitro* et purification de l'enzyme formant l'éthylène chez la pomme. *C. R. Acad. Sci. Paris*, t. 315, Série III: 77-84.

EDELMAN J. and HANSOL A. D. (1971). Sucrose suppression of chlorophyll synthesis in carrot callus cultures. *Planta*, **98**: 150-156.

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

ESPELIE K. E. and KOLATTUKUDY P. E. (1985). Purification and characterization of an abscisic acid-inducible anionic peroxidase associated with suberization in potato (*Solanum tuberosum*). Arch. Biochem. Biophys., **240**: 539-545.

ESPELIE K. E., FRANCESCHI V. R. and KOLATTUKUDY P. E. (1986). Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue. Plant Physiol., **81**: 487-492.

FERRER M. A., CALDERON, A. A., MUNOZ R. and ROS BARCELO A. (1990). 4-methoxy-naphtol as specific substrate for kinetic, zymographic and cytochemical studies on plant peroxidase activities. Phytochemical Analysis, **1**: 63-69.

FERRER M. A., MUNOZ R. and ROS BARCELO A. (1991) a. A biochemical and cytochemical study of cuticle-associated peroxidases in *Lupinus*. Annals of Botany, **67**: 561-568.

FERRER M. A., PEDRENO M. A., MUNOZ R. and ROS BARCELO A. (1991) b. Soluble peroxidase gradients in lupin hypocotyls and the control of the level of polarly transported indolylacetic acid. J. Plant Growth Regul., **10**: 139-146.

FINZEL B. C., POULOS T. L. and KRAUT J. (1984): Crystal structure of yeast cytochrome c peroxidase refined at 1,7 Angström resolution. J Biol Chem. **259**: 13027-13036.

FLEURIET A. (1982). Expression et régulation du métabolisme des dérivés hydroxycinnamiques au cours de la croissance, de la maturation et de la réponse aux blessures de la tomate cerise (*Lycopersicon esculentum* var. cerasiforme). Thèse d'état. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 269 p.

FLEURIET A. and DELOIRE A. (1982). Aspects histochimiques et biochimiques de la cicatrisation des fruits de tomate blessés. Z Pflanzenphysiol., **107**: 259-268.

FORCHETTI (de) S. M. and TIGIER H. A. (1990). Indole-3-acetic oxidase and syringaldazine oxidase activities of peroxidase isoenzymes in soybean root nodules. Physiol. Plant., **79**: 327-330.

FOSSARD R. A., MYNT A. and LEE E.C.M.(1974). A broad spectrum tissue culture experiment with tobacco (*Nicotiana tabacum*) pith callus. Physiol. Plant. **31**: 125-130.

FRY S. C. (1979). Phenolic components of the primary cell wall and their possible role in the hormonal regulation of growth. Planta, **146**: 343-351.

FRY SC. (1982). Isodityrosine: a new cross-linking amino acid from plant cell-wall glycoprotein. *Biochem. J.*, **204**: 449-455

FRY SC. (1986). Polymer-bound phenols as naturel substrates ofperoxidases. In: GREPPIN H, PENEL C., GASPAR Th., eds, *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. Université de Genève, pp. 169-182.

FRY SC. (1988). *The growing Plant Cell Wall: Chemical and Metabolic Analysis*. Longmann Scientific and Technical, NY, 323-pp.

FRY SC. (1990). Roles of the primary cell wall in morphogenesis. In: NIJKAMP HJJ ,VAN DER PLAS LHW , VAN AARTRIJK J., eds, *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Kluwer Acad. Publ., DORDRECHT, 504-513.

FUJIYAMA K., TAKEMURA H., SHINMYO A., OKADA H. and TAKANO M. (1990). Genomic DNA structure of two new horseradish peroxidase-encoding genes. *Gene* **89**: 163-169.

FUKUDA H. and KOMARINE A. (1982). Lignin synthesis and its related enzymes as markers of tracheary-element differentiation in single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Planta*, **155**: 423-430.

GALSTON A. W., BONNER J. and BAKER S. S. (1953). Flavoprotein and peroxidase as components of indole acetic acid oxidase system of *Peas*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **42**: 456-470.

GALSTON A. W. and HILMAN W. S. (1961). The degradation of auxin. *Handb. d. Pflanzenphysiol*, **14**: 647-670.

GARCIA-FLORENCIANO E., CALDERON A. A., MUNOZ R. and ROS BARCELO A. (1991) a. Epigenetic control of extracellular auxin catabolism in grapevine cells cultured in suspension. *Vitis*, **30**: 57-69.

GARCIA-FLORENCIANO E., CALDERON A. A., PEDRENO M. A., MUNOZ R. and ROS BARCELO A. (1991) b. The vacuolar localization of basic isoperoxidases in grapevine suspension cell cultures and its significance in indole-3-acetic acid catabolism. *Plant Growth Regul.*, **10**: 125-138.

GASPAR Th., PILET P. E. and BASTIN M. (1964). Effecteurs auxines-oxydasiques: Définition et indices. *Physiol. Vég.*, **2**: 221-231.

GASPAR Th. (1965). Catabolisme auxinique et effecteurs auxines-oxydasiques: étude comparée chez *Lens culinaris* et *Stavia splendens*. Bull. Soc. Roy. Sci. Liège. **78**: 391-537.

GASPAR Th. and XHAUFFLAIRE A. (1967). Effect of kinetin on growth, auxin catabolism, peroxidase and catalase activities. *Planta*, **72**: 252-257.

GASPAR Th., PENEL C. and GREPPIN H. (1975). Peroxidase and isoperoxidase in relation to root and flower formation. *The Plant Biochem. Journal*, **2** (i): 33-47.

GASPAR and VAN HOOFF (1976). Application d'un test peroxydasique dans le choix des plantes d'asperge à propager *in vitro*. *Revue Agricult.*, **3**: 583-592.

GASPAR Th., SMITH D. et THORPE T. A. (1977) a. Arguments supplémentaires en faveur d'une variation inverse du niveau auxinique endogène au cours des deux premières phases de la rhizogenèse. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **285**: 327-330.

GASPAR Th., THORPE T. A. and TRAN THANH VAN M. (1977) b. Changes in isoperoxidases during differentiation of cultured tobacco epidermal layers. *Acta Hortic.*, **78**: 61-73.

GASPAR Th., PENEL C., TRAN THANH VAN M. and GREPPIN H. (1979). Des isoperoxydases comme marqueurs de la différenciation cellulaire chez les végétaux. Xème RENCONTRE DE MERIBEL, 175-196.

GASPAR Th. (1981). Rooting and flowering : two antagonistic phenomena from a hormonal point of view. In : Jeffcoat, B. (Eds) : Aspects and Prospects of Plant Growth regulators. Monograph 6, British Plant Growth Regulation Group, Wantage pp. 39-49.

GASPAR Th., PENEL C., THORPE T. and GREPPIN H. (1982). Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiochemical roles in higher plants. Université de Genève. Centre de Botanique.

GASPAR Th., PENEL C., CASTILLO FJ and GREPPIN H. (1985) : A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiol Plant* **64**: 418-423.

GASPAR Th. (1986). Integrated relationships of biochemical and physiological peroxidase activities. In: GREPPIN H., PENEL C., GASPAR Th.. Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. Université de Genève, pp. 455-468.



GASPAR Th., KEVERS C., DEBERGH P., MAENE L. and PAQUES M., BOXUS Ph. (1986). Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: BONGA J.M., DURZAN D.J. Eds, Tissue Culture in Forestry. Martinus Nijhoff/ Dr. W. Junk Publ., Dordrecht.

GASPAR Th. and HOFINGER M. (1988). Auxin métabolism during adventitious rooting. In Adventitious root formation in cuttings (t. D. DAVIS, B. E. HAISSIG? N. SANKHLA, eds) pp. 117-131. Dioscorides Press, Portland.

GASPAR Th., KEVERS C., HAUSMAN J. F. and BERTHON J. Y. (1990). Rooting *in vitro*: fundamental data for new strategies. Meeting of the Belgian Association of plant physiology Gembloux, Belgium, 1 Juin 1990. Arch. Int. Physiol. Biochem., 98: 6.

GASPAR T., PENEL C., HAGEGE D. and GREPPIN H. (1991). Peroxidases in plant growth, differentiation and development processus. In LOBARZEWSKI J., GREPPIN H., PENEL C. et GASPAR Th.. Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. Université de Genève.

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.

GILLHAM, D. J. and DODGE A. D. (1986). Hydrogen-peroxide-scavenging systems within pea chloroplasts. Planta, 167: 246-251.

GIROUARD R. M. (1967). Initiation and development of adventitious roots in stem cutting of *Hedera helix*. Anatomical studies of the juvenile growth phase. Can. J. Bot., 45: 1877-1881.

GOLDBERG R., CATESSON A. M. and CZANINSKI Y. (1983). Some properties of syringaldazine-oxidase, a peroxidase specifically involved in the lignification processus. Z Pflanzenphysiol., 110: 267-279.

GOLDBERG R., LE T. and CATESSON A. M. (1985). Localization and properties of cell wall enzyme activities related to the final stages of lignin biosynthesis. J. Exp. Bot., 36: 503-510.

GOLDBERG R., IMBERTY A., LIBERMAN M. PRAT R. (1986). Relationships between peroxidatic activities and cell wall plasticity. In GREPPIN H., PENEL C., GASPAR Th., eds, Molecular and physiological aspects of plant peroxidases. Université de Genève. p. 208-220.

GOLDBERG R., LIBERMAN M., MATHIEU C., PIERRON M., CATESSON A. M.; (1987). Development of epidermal cell wall peroxidases along the mung bean hypocotyl: Possible involvement in the cell wall stiffening process. *J. Exp. Bot.*, **38**: 1378-1390.

GOLDBERG R., LIBERMAN M., MATHIEU C., PIERRON M., CATESSON A. M. (1991). Cell wall peroxidases and lignification: tissue and substrate specificity. In LOBARZEWSKI J., GREPPIN H., PENEL C., GASPAT Th., eds, *Biochemical, molecular and physiological aspects of plant peroxidases*. Université de Genève. p. 209-220.

GRAMBOW H. J. and LANGENBECK-SCHWICH (1983). The relationship between oxidase activity, peroxidase activity, hydrogen peroxide, and phenolic compounds in the degradation of indole-3-acetic acid *in vitro*. *Planta*, **157**: 131-137.

GRAMBOW H. J. (1986). Pathway and mechanism of the peroxidase catalysed degradation of indole-3-acetic acid. In GREPPIN H., PENEL C., GASPAT Th., Eds, *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. Université de Genève.

GRAMBOW H. J. (1988). Aspects of IAA metabolism. In: KUTACEK M., BANDURSKIR.S., KREKULE J., Eds, *Physiology and Biochemistry of Auxins in plants*. Acad. praha, 77-84.

GRIFFING L. R. and FOWKE L. C. (1985). Cytochemical localization in soybean suspension culture cells and protoplasts: Intracellular vacuole differentiation and presence of peroxidase in coated vesicles and multivesicular bodies. *Protoplasma*, **128**: 22-30.

GRISON R., DUBOUCHET J. and MOREAU M. (1975). Variations of isoperoxidase activity after experimental infections of carnations by *Phialophora cinerescens* *Phytopathol. Z.*, **84**:259-270.

GRISON R. and PILET P. E. (1985). Properties of syringaldazine oxidase in maize roots. *J. Plant Physiol.*, **118**: 201-208.

GROB K. and MATILE P. (1980). Comparison of ascorbic acid in vacuoles of horseradish root cells. *Z. Pflanzenphysiol*, **98**: 235-243.

GRÖNROOS R. and VAN ARNOLD S. (1985). Initiation and development of wound tissue and roots on hypocotyl cuttings of *Pinus sylvestris in vitro*. *Physiol. Plant.*, **64**: 393-401.

GROSS G. G., JANSE C. and ELSTNER E. F. (1977). Involvement of malate, monophenols and superoxide radical in hydrogen peroxide formation by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.). *Planta*, **136**: 271-276.

GURUMURTI K. and NANDA K. K. (1974). Changes in peroxidases isoenzymes of *Phaseolus mungo* hypocotyl cuttings during rooting. *Phytochemistry*, **13**: 1089-1093.

HACKETT D. P. and THIMANN K. V. (1952). The nature of auxin-induced water uptake by potato tissue. *Amer. J. Bot.*, **39**: 553-558.

HALL J. and SEXTON R. (1972). Cytochemical localization of peroxidase activity in root cells. *Planta*, **108**: 103-120.

HAMILTON A. J., LYCETT G. W. and GRIERSON D. (1990). Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants *Nature*, **346**: 284-287.

HARKIN J. H. and OBST J. R. (1973). Lignification in trees: indication of exclusive peroxidases participation. *Sciences*, **180**: 296-297.

HAZELL P. and MURRAY D. R. (1982). Peroxidase isoenzymes and leaf senescence in sunflower *Helianthus annuus* L. *Z Pflanzenphysiol*, **108**: 87-92.

HELLER R. (1953). Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot.* **14** : 1-223.

HENDRIKS T. and VAN LOON L. C. (1990). *Petunia* peroxidase a is localized in the epidermis of aerial plant organs. *J. Plant Physiol*, **136**: 519-525.

HENRISSAT B., SALOHEIMO M., LAVAITTE S. and KNOWLES JKC. (1990). Structural homology among the peroxidase enzyme family revealed by hydrophobic cluster analysis. *Proteins: Strc Func Gen* **8**: 251-257.

HERMAN D. E. and HESS C. E. (1963). The effect of etiolation upon the rooting of cuttings. *Combined Proceedings of the International Plant Propagation Society*, **13**: 42-62.

HOFINGER M., GASPAR Th. and MENARD D. (1980). Effect de l'acide indolylacrylique, de la kinétine, de l'acide abscissique et du méthylène-oxyndole sur la croissance et la production d'éthylène par des racines de lentilles. *C. R. Acad. Sci. Paris, série D*, **290**: 139-142.

- HOYLE M.C. (1972). Indoleacetic acid oxidase: a dual catalytic enzyme. *Plant Physiol.* **50**: 15-18.
- HU Ch., SMITH R. and VAN HUYSTEE R. (1989). Biosynthesis and localization of peanut peroxidases. A comparison of the cationic and the anionic isozymes. *J. Plant Physiol.* **135**: 391-397.
- IMBERTY A., GOLDBERG R., CATESSON A. M. (1984). Tetramethylbenzidine and p-phenylenediamine-pyrocatechol for peroxidase histochemistry and biochemistry: two new, non-carcinogenic chromogens for investigating lignification process. *Plant Sci. Lett.*, **35**: 103-108.
- IMBERTY A., GOLBERG R. and CATESSON A.M. (1985). Isolation and characterization of *Populus* isoperoxidases involved in the last step of lignin formation. *Planta*, **164**: 221-226.
- JACOB H. J. and BOPP M. (1990). Peroxidase catalysed IAA catabolism as one part of auxin regulation in *Funaria hygrometrica*. *J. Plant Physiol.*, **137**: 88-94.
- JAMES D.J. (1983). Adventitious root formation *in vitro* in apple rootstocks (*Malus pumila*) I. Factors affecting the length of the auxin-sensitive phase in M. 9. *Physiol. Plant*, **57**: 149-153.
- JOERSBO M., ANDERSEN J. M., OKKELS F. T. and PEDERSEN M.G. (1989) a .Effect of extracellular peroxidases on growth of carrot and sugar beet suspension cells. *J. Plant Physiol.*, **135**: 369-372.
- JOERSBO M., ANDERSEN J. M., OKKELS F. T. and RAJAGOPAL R. (1989) b. Isoperoxidases as markers of somatic embryogenesis in carrot cell suspension cultures. *Physiol. Plant.*, **76**: 10-16.
- JOHNSON-FLANAGAN A. M., OWENS J. N. (1985). Peroxidase activity in relation to suberization and respiration in white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) seedling roots. *Plant Physiol.* **79**: 103-107.
- KAUL K. and SABHARWAL P. S. (1971). Effects of sucrose and kinetin on growth and chlorophyll synthesis in tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* **47**: 691-695.
- KAY L. E. and BASILE D. V. (1987). Specific peroxidase isoenzymes are correlated with organogenesis *Plant Physiol.*, **84**: 99-105.

KEILIN D. and HARTREE E. F. (1951). Purification of horse-radish peroxidase and comparison of its properties with those of catalase and methemoglobin. *Biochem. J.*, **49**: 88-104.

KENDE H. (1989). Enzymes of ethylene biosynthesis *Plant Physiol.*, **91**: 1-4.

KENTEN R. H. (1955). The oxidation of indole-3-acetic acid by waxpod bean root sap and peroxidase system. *Biochem. J.*, **59**, 110-121.

KETELAPPER H. J. (1953). The mechanism of the action of indol-3-acetic acid on the water absorption by *Avena* coleoptile sections. *Acta Bot. Neder.*, **2** : 388-392.

KEVERS C., COUMANS M., De GREEF W., JACOBS M. and GASPAR Th. (1981). Organogenesis in habituated sugarbeet callus: Auxin content and protectors, peroxidase patterns and inhibitors. *Z. Pflanzenphysiol*, **101**: 79-87.

KEVERS C., COUMANS M., COUMANS-GILLES M.F. and GASPAR Th. (1984). Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiol. Plant*, **61**: 69-74.

KEVERS C. and GASPAR Th. (1985) a. Soluble, membrane and wall peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase and lignin changes in relation to vitrification of carnation tissue cultured *in vitro*. *J. Plant Physiol.*, **118**: 41-48.

KEVERS C. and GASPAR Th. (1985) b. Vitrification of carnation in *in vitro* changes in ethylene production, ACC level and capacity to convert ACC to ethylene. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **4**: 215-223.

KEVERS C., GOLDBERG R., VANDEN DRIESSCHE T. and GASPAR Th. (1992). A Relationship between ascorbate peroxidase activity and the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid into ethylene. *J. Plant Physiol.*, **139**: 379-381.

KOCHBA J., LAVEE S. and SPIEGEL-ROY P. (1977). Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic 'Shamouti' orange ovular callus lines. *Plant, Cell Physiol.*, **18**: 463-467.

KOLATTUKUDY P. E. (1987). Lipid-derived defensive polymers and waxes and their role in plant-microbe interaction. In P.K. STUMPT, E.E. CONN, eds, *The Biochemistry of Plants*. Academic Press, New York, **9**: 291-314.

KRSNIK-RASOL M., JELASKA S. and SERMAN D. (1982). Isoperoxidases-Early indicators of somatic embryoid differentiation in pumpkin tissue. *Acta Bot. Croat.* **41**: 33-39.

KRSNIK-RASOL M., JELASKA S. and DRASKO SERMAN (1986). Peroxidases in Pumpkin embryogenetic callus lines. *Acta Bot. Croat.*, **45**: 83-89.

KRSNIK-RASOL M. (1991). Peroxidase as a developmental marker in plant tissue culture. *Int. J. Dev. Biol.* **35**: 259-263.

LAGRIMINI L. M., BURKHART W, MOYER M. and ROTHSTEIN S. (1987). Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue -specific expression. *Proc Natl Acad. Sci. USA*, **84**: 7542-7546.

LAGRIMINI L. M., BRADFORD S. and ROTHSTEIN S. (1990). Peroxidase-induced wilting in transgenic tobacco plants. *Plant Cell*, **2**: 7-18.

LARSEN P. (1951). Formation, occurrence and inactivation of growth substances. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **2**: 169-198.

LEE T. T. (1973). On extraction and quantitation of plant peroxidase isoenzymes. *Physiol. Plant*, **29**: 198-203.

LEE T. T. (1980). Effect of phenolic substances on metabolism of exogenous indole-3-acetic acid in maize stems. *Physiol. Plant*, **50** : 107-112.

LEE T. T., STARRATT A. N. and JEVNICAR J. J. (1982). Regulation of enzymic oxidation of indole-3-acetic acid by phenols: structure-activity relationships. *Phytochemistry*, **21** (3): 517-523.

LEFEBVRE R. (1979). Influence de l'éclaircissement sur le bourgeonnement de fragments de racines d'endive (*Cichorium intybus* L) cultivés *in vitro*. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **289**: 271-274.

LEFEBVRE R., VASSEUR J., BACKOULA E. et COUILLEROT J. P. (1992). Participation du métabolisme glucidique à l'orientation organogène de tissus du *Cichorium intybus* cultivés *in vitro*. *Can. J. Bot.*, **70**: 1897-1902.

LEGRAND B. (1974). Influence des conditions d'éclairément sur la néoformation des bourgeons par les tissus de feuilles d'endive cultivés *in vitro* et sur l'activité peroxydasique de ces tissus. C. R. Acad. Sci. Paris, **278**: 2425-2428.

LEGRAND B. (1976). Répartition des catalases et peroxydases dans des fragments de racine de carotte cultivés *in vitro*. Rev. Gen. Bot., **76**: 469-475.

LEGRAND B., GASPAR Th., PENEL C. and GREPPIN H. (1976). Light and hormonal control of phenolic inhibitors of peroxidase in *Cichorium intybus* L. The Plant Biochem. J., **3**: 119-127.

LEGRAND B. et DUBOIS J. (1977). Evolution des peroxydases et auxines-oxydases au cours de la croissance d'une suspension cellulaire de silène (*Silene alba* (Miller) E.H.L. Krause). C.R. Acad. Sci. Paris, **285**: 661-664.

LEGRAND B. et DUBOIS J. (1978). Influence des régulateurs de croissance sur la prolifération, l'activité peroxydasique et les isoperoxydases de la suspension cellulaire de *Silene alba*. Biolog. Plantarum, **20** (2): 107-123.

LEGRAND B. (1987). Les peroxydases et leur régulation au cours de la néoformation de bourgeons par des tissus de *Cichorium intybus* L. cultivés *in vitro*. Thèse univ. U.S.T. Lille. 219 p.

LEGRAND B. and BOUAZZA A (1991). Changes in peroxidase and IAA-oxidase activities during adventitious bud formation from small root explants of *Chicorium intybus* L; influence of glucose. J. Plant Physiol., **138**: 102-106.

LETHAM D. S. (1978). Cytokinins. In: Phytohormones and related compounds: a comprehensive treatise (D. S. Letham, P. B. GOODWIN and T. J. V. HIGGINS, eds). Elsevier/north-Holland, Amsterdam. Vol. Ipp. 205-263.

LINSMAIER E. M. and SKOOG F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. **18** : 100-126.

LOOMIS W.D. and BATAILLE J. (1966). Plant phenolic compound and the isolation of plant enzymes. Phytochemistry. **5**: 429-438.

LOWRY C., ROSEBOROUGH W., FARR A. and RANDALL R. (1951). Protéin mesurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**: 265-275.

LUDWIG-MULLER J., RAUSCH T., LANG S. and HILGENBERG W. (1990). Plasma membrane bound high pI peroxidase isoenzymes convert tryptophan to indole-3-acetadoxime. *Phytochemistry*, **29**: 1397-1400.

MACHACKOVA I., GANCEVA K., ZMERHAL Z. (1975). The role of peroxidase in the metabolism of indole-3-acetic acid and phenols in wheat. *Phytochem.*, **114**: 1251-1254.

MACHACKOVA I. and ZMRHAL Z (1981). Is peroxidase involved in ethylene biosynthesis? *Physiol. Plant*, **53**: 479-482.

MADER M., UNGEMACH J. and SCHLOSS P. (1980). The role of peroxidase isoenzyme groups of *Nicotiana tabacum* in hydrogen peroxide formation. *Planta*, **147**: 467-470.

MADER M. and FUSSL R. (1982). Role of peroxidase in lignification of tobacco cells. II. Regulation by phenolic compounds. *Plant Physiol.*, **70**: 1132-1134.

MADER M. and WALTER C. (1986). *De-novo* synthesis and release of peroxidases in cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, **169**: 273-277.

MADER M. (1992). Compartmentation of peroxidase isoenzymes in plant cells. In C. penel, Th Gaspar, H. Greppin. *Plant peroxidases 1980-1990. Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects.* Université de Genève.

MAKINO R., UNO T., NISHIMIRA Y., IIZUKA T., TSUBOI M. and ISHIMURA Y. (1986). Coordination structures and reactivities of compound II in iron and manganese horseradish peroxidases. *The Journal of Biological Chemistry*, **261**(8), 8376-8382.

MARKWALDER H. U. and NEUKOM H. (1976). Di-feriluc acid as a possible cross link in hemicellulose from wheat germ. *Phytochem.*, **15**: 836-837.

MAZZA G., RICARD J. and BOUCHET M. (1970). Potentiels de demi-réduction et activité "auxin-oxydasyque" de peroxydases de Navet (*Brassica napus* L). *C.R. Acad. Sci., Paris*, **270**: 2492-2494.

McDOUGALL G.J. (1992). Plant peroxidases and cell differentiation. In PENEL C.,GASPAR Th , GREPPIN H.. *Plant peroxidases 1980-1990. Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects.* Université de Genève.



McDOUGALL G.J., DAVIDSON D. and MILLAM S. (1992). Alterations in surface-associated peroxidases during callus development and shoot formation in explants of *Linum usitatissimum*. J. Plant Physiol., **140**: 195-200.

McDOUGALL G., MILLAM S. and DAVIDSON D. (1993). Alterations in surface-associated peroxidases during *in vitro* root development of explants of *Linum usitatissimum*. Plant Cell, Tiss. and Org. Cult., **32**: 101-107.

McKEON T. S. and YANG S. F. (1988). Biosynthesis and metabolism of ethylene. In: DAVIES P. J., Eds, Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, pp. 94-112.

MEUDT W.J. and STECHER K.J. (1972). Promotion of peroxidase activity in the cell wall of *Nicotiana*. Plant Physiol., **50**: 157-160.

MOHAN R. and KOLATTUKUDY P.E. (1990). Differential activation of expression of a suberisation-associated anionic peroxidase gene in near-isogenic resistant and susceptible tomato lines by elicitors of *Verticillium albo-artrum*. Plant Physiol., **921**: 276-280.

MOLNAR J. M. and LACROIX L. J. (1972). Studies of the rooting of cutting of *Hydrangea macrophylla*: enzyme changes. Can. J. Bot., **50**: 315-322.

MONCOUSIN C. (1982). Contribution à la caractérisation biochimique et physiologique de la phase juvénile de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) au cours de sa multiplication végétative conforme et accélérée en culture *in vitro*. Thèse Docteur-Ing., Université de Paris-Sud, 237 p.

MONCOUSIN C. and GASPAR Th. (1983). Peroxidase as a marker for rooting improvement of *Cynara scolymus* L. cultured *in vitro*. Biochem. Physiol. Pflanzen, **178** : 263-271.

MONCOUSIN C. (1986 a). Peroxidase as a marker for rooting improvement of clones of *Vitis* cultured *in vitro*. In GREPPIN H., PENEL C. and GASPAR Th. eds. Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. Université de Genève; pp 379-385.

MONCOUSIN C. (1986 b). Biochemical events in mono-nodal stem cuttings of *Vitis* hybrid during *in vitro* adventitious rooting. I.A.P.T.C. Congress, Minneapolis.

MONCOUSIN C. (1986 c). Evolution du contenu auxinique endogène au cours de l'enracinement *in vitro* de bouture de *Malus*. Colloque arbres fruitiers et biotechnologies, Moët-Hennessy, Paris.

MONCOUSIN C. (1987). Evolution de l'AIA, des composés phénoliques, de l'activité spécifique des peroxydases et de la production d'éthylène, au cours de la rhizogenèse, sur les microboutures de vigne (*V. riparia* Michx. x *V. rupestris* Scheele). Thèse de doctorat d'état, Université de Nancy I, 168 p.

MONCOUSIN C., FAVRE J.M. and GASPAR Th. (1989). Changes in peroxidase activity and endogenous IAA levels during adventitious rooting in vine cuttings. In Physiology and Biochemistry of auxins in plants, Kutacek M., BANDURSKI R. S. et KREKULE J. Eds. Academia, Praha, 331-337.

MORISHIMA I., TAKAMUKI Y. and SHIRO Y. (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., MIKAMI B., YAMASHITA H., LEE J. Y., AIBARA S., SATO M., KATSUDE Y. and TANAKA N. (1991). Primary and crystal structures of horseradish peroxidase isozyme E5. In: LOBARZEWSKI J., GREPPIN H., PENEL C., GASPAR Th., Eds, Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of plant peroxidases. Université de Genève, pp. 81-88.

MOSELLA C. L. and MACHEIX J. J. (1979). Le microbouturage *in vitro* du pêcher (*Prunus persia* Batsch) : influence de certains composés phénoliques. Compt rend. Acad. Sci. Paris, **289** : 567-570.

MOSELLA C. L., MACHEIX J. J. and JONARD R. (1980). Les conditions du microbouturage *in vitro* du pêcher (*Prunus persia* Batsch) : influences combinées des substances de croissance et de divers composés phénoliques. Physiol. Vég., **18**: 597-608.

MURASHIGE T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant. Physiol., **25**: 135-166.

MURASHIGE T. and SKOOG F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., **15**: 473-497.

NAKANO Y. and ASADA K. (1980). Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. Plant Cell Physiol., **21**: 1295-1307.

NAKANO Y. and ASADA K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. **22**: 867-880.

NAKANO Y. and ASADA K. (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts, its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydro-ascorbate radical. *Plant Cell Physiol.*, **28**: 131-140.

NANDA K. K. BHATTACHARYA N. C. and KAUR N. P. (1973 a). Effect of morphactin on peroxidases and its relationship to rooting hypocotyl cuttings of *impatiens balsamina*. *Plant, cell Physiol.*, **14**: 207-221.

NANDA K. K. BHATTACHARYA N. C. and KAUR N. P. (1973 b). Disc electrophoretic studies of IAA oxidases and their relationship with rooting of etiolated stem segments of *Populus nigra*. *Physiologia Plantarum*, **29**: 422-444.

NEGRUTIU I., JACOBS M. and GASPAR Th. (1979). leaf formation and peroxidases from *Arabidopsis callus*. *Z. Pflanzenphysiol.*, **91**: 119-126.

NEUMANN K.H. and DE GARCIA H. (1974). Über den "Einflu" der saccarosekonzentration auf die entwicklung von embryonen aus zellsuspensionen von *Daucus carota* L. *Z. Pflanzenphysiol.* **74** : 85-90.

NIEDERWIESER J. and van STADEN J. (1992). Interaction between benzyladenine, naphthaleneacetic acid and tissue age on adventitious bud formation on leaf sections of *Lachenalia* hybrids. *S. Afr. J. Bot.* **58**: 13-16.

ONO H., MASUDA C. and NAGAYOSHI I. (1980). The formation of a root-specific isoperoxidase as an indicator of root primordium differentiation in pith of tobacco. *Science Report of the Faculty of Agriculture, Kobe University*, **14**: 85-91.

PANG A., CATESSON A. M., FRANCESCH C., ROLANDO C., GOLDBERG R. (1989). On substrate specificity of peroxidases involved in the lignification process. *J. Plant Physiol.* **135**: 325-329.

PANG A. (1990). Caractérisation des isoperoxydases pariétales de tabac impliquées dans la lignification. Spécificité des donneurs d'électrons. Thèse, Université Paris VI, 93 p.

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.

PAUL K. G., OHLSSON and S. WOLD (1986). The formation of peroxidase compound I with alkyhydro-peroxides-multiple regression or pattern recognition analysis. Molecular and physiological aspects of plant peroxidases. Eds GREPPIN H., PENEL C. and GASPAR Th., Université de Genève, 25-41.

PENEL C. and GREPPIN H. (1979). Effect of calcium on subcellular distribution of peroxidases. *Phytochemistry*, **18**: 29-33.

PENEL C., GASPAR Th. and GREPPIN H. (1984). Hormonal control of enzyme secretion by plant cells. In SS Purohit, Eds, Hormonal Regulation of plant Growth and Development. Agro Bot Publ India, pp. 145-168.

PEREZ-RODRIGEZ D., CATESSON A.M. (1982). L'alimentation du parenchyme vasculaire de radis en survie: évolution ultrastructurale et activités peroxydasiques pariétales. *Ann. Sci. Nat. Bot.*, Paris, 13ème série, **4**: 168-188.

PERREY R., HAUSER MT. and WINKM. (1989). Cellular and subcellular localization of peroxidase isozymes in plants and cell suspension cultures from *Lupinus polyphyllus*. *Z Naturforsch* **44**: 931-936.

PICKERING J.W., POWELL B. L., WENDER S. H. and SMITH E. C. (1973). Ferulic acid: a substrate for two isoperoxidases from *Nicotiana tabacum* tissue cultures. *Phytochem.*, **12**: 2639-2643.

PILET P.E. (1957). Dosage photolorimétrique de l'acide beta-indolyl-acétique: application à l'étude des auxines-oxydases. *Rev. Gén. Bot.*, **64**: 106-122.

PILET P. E. et GASPAR Th. (1968). Le catabolisme auxinique. Monographie de physiologie végétale n° 1. Masson Eds, 148 p.

POUX C. et OURNAC A. (1972). Détermination de la peroxydase dans le raisin. *Ann. Technol. Agric.* **21** (1): 47-67.

PRESSEY R. (1990). Anions activate the oxidation of indoleacetic acid by peroxidases from tomato and other sources. *Plant Physiol.*, **93**: 798-804.

PYTHOUD F. and BUCHALA A.J. (1989). Peroxidase activity and adventitious rooting in cuttings of *Populus tremula*. *Plant Physiol. Biochem.*, **27**: 501-510.

QUOIRIN M., BOXUS P. and GASPAR Th. (1974). Root initiation and isoperoxidases of stem tip cuttings from mature *Prunus* plants. *Physiol. Vég.*, **12** : 165-174.

RATHMELL W.G. and SEQUEIRA L. (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.

REINECKE D. M. and BANDURSKI RS. (1988). Auxin biosynthesis and metabolism. In: DAVIES PJ., Eds, *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, pp. 24-42.

RICARD J. and JOB D. (1974). Reaction mechanisms of indole-3-acetate degradation by peroxidases. A stopped flow and low-temperature spectroscopy study. *Eur. J. Biochem.*, **44**: 359-374.

RIDGE I. and OSBORNE D. (1970). Hydroxyproline and peroxidases in cellwalls of *Pisum sativum*: regulation by ethylene. *J. Exp. Bot.*, **21**: 843-856.

RIDGE I. and OSBORNE D.J. (1971). Role of peroxidase when hydroxyproline-rich protein in plant cell walls is increase by ethylene. *Nature, New Biology*, **229**: 205-208.

ROBERT J. E. and HOFFMAN B. M. (1981). ENDORE of horse radish peroxidase compound I. *Journal of America Chemical Society*, **103**, 7654-7656.

ROBERT E. KUTCHAN T. and KOLATTUKUDY P. E. (1988). Cloning and sequencing of cDNA for a highly anionic peroxidase from potato and the induction of its mRNA in suberizing potato tubers and tomato fruits. *Plant Mol. Biol.*, **11**: 15-26.

ROBERT E. and KOLATTUKUDY P. E. (1989). Molecular cloning, nucleotide sequence and abscisic acid induction of a suberization-associated highly anionic peroxidase. *Mol. Gen. Genet.*, **217**: 223-232.

ROBERT E. and ROLAND J. C. (1989). *Biologie végétale. Caractéristiques et stratégies évolutives des plantes. Tome I, Organisation Cellulaire*. Doin, Paris, 265 pp.

ROBINSON D.S., BRETHERICK M.R. and DONELLY J.K. (1989). The heat stability and isoenzyme composition of peroxidase in Ohane grappes. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **24**: 613-618.

ROGER V. and VASSEUR J. (1983). Etude histo-autoradiographique de la synthèse d'ADN au cours de l'initiation de bourgeons adventifs par des explantats de racine de *Cichorium intybus* cultivés *in vitro*. Rev. Cytol. Biol. Végét.-Bot., 6:129-139.

ROHWER F. and MADER M. (1981). The role of peroxidase in ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Z Pflanzenphysiol, 104: 363-372.

ROLAND J. C. (1982). Croissance. In MAZLIAK P. eds, Croissance et développement, Physiologie végétale, vol. II, Herman, Paris, pp 227-342.

ROS BARCELO A., MUNOZ R. and SABATER F (1987). Lupin peroxidases. I. Isolation and caractization of cell wall-bound isoperoxidase activity. Physiol. Plant., 71: 448-454.

ROS BARCELO A., PEDRENO M. A, MUNOZ R. and SABATER F. (1988). Lupin peroxidases. II. Binding of acidic peroxidases to cell walls. Physiol. Plant, 71: 238-244.

ROS BARCELO A., MUNOZ R. and SABATER F (1989). Substrate specificity of soluble lupin isoperoxidases. Biol. Plant, 31: 161-167.

ROS BARCELO A., PEDRENO M.A., FERRER M.A., SABATER F. and MUNOZ R. (1990) a. Indol-3-methanol is the main product of the oxidation of indole-3-acetic acid catalysed by two cytosolic basic isoperoxidases from *Lupinus*. Planta, 181: 448-450.

RUCKER W. and MARKOTAI J. (1977). Growth and isoelectric patterns of peroxidase in tobacco tissue cultures under the influence of growth regulator systems. Electrofocusing and Isotachopheresis, 213-220.

SACHS J. (1865). Über die Neubildung von Adventivwurzeln durch Dunkelheit. Verhandlungen des Naturhistorischen Vereins Preussen, Rheinland und Westphalen, 21: 110-111.

SAITOU T., KAMADA H. and HARADA H. (1992). Light requirement for shoot regeneration in horseradish hairy roots. Plant Physiol., 99: 1336-1341.

SANCHEZ-BRAVO J., ORTINO A., ACOSTA M. and SABATER F. (1989). Evaluation of indole-3-acetic acid decarboxylating activity in hypocotyl sections of etiolated *Lupinus albus* seedlings. J. Plant Physiol., 134: 517-523.

SANDBERG G., GARDESTROM P., STIBON F. and OLSSON O. (1990). Presence of indole-3-acetic acid in chloroplasts of *Nicotiana tabacum* and *Pinus sylvestris*. Planta, 180: 562-568.

SCANDALIOS J. G. (1974). Isozymes in development and differentiation. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **25**: 225-258.

SCHELL H. D.; TURCU A. and MATEESCU M. A. (1973). Preparation and properties of peroxidase covalently coupled to CNBr-activated agarose. *Rev. Roum. Biochim.*, **10**: 233-238.

SCHLOSS P., WALTER C. and MADER M. (1987). Basic peroxidases in isolated vacuoles of *Nicotiana tabacum* L. *Planta*, **170**: 225-229.

SCOPES R. K. (1968). Methods of starch gel electrophoresis of sarcoplasmic proteins. *Biochem. J.*, **107**: 139-150.

SEMBDNER G., GROSS D., LIEBISCH HW and SCHNEIDER G. (1980). Biosynthesis and metabolism of plant hormones. In: J. Mac Millan, Eds, *Molecular Aspects of Plant hormones*. *Encycl. Plant. Physiol.*, Vol. 9, Springer-Verlag, Berlin, pp. 281-344.

SENE A., VASSEUR J. et LEFEBVRE R. (1983). Sur l'aptitude de petits explantats racinaires de *Cichorium intybus* L. (var. Witloof) à produire des racines adventives en culture *in vitro*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **297**: 81-86.

SIEGEL B. Z. (1993). Plant peroxidases-an organismic perspective. *Plant Growth Regul.*, **12**: 303-312.

SKOOG F. and MILLER C.O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **11**: 118-130.

SKOOG F. and AMSTRONG D. G. (1970). Cytokinins. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **21**: 359-364.

SMITH D.R. and THORPE T.A. (1976). Rooting in cuttings of *Pinus radiata* seedlings: fluctuations in relation to selection day. *Bot. Gaz.*, **173**: 128-132.

SMITH D.R. and THORPE T.A. (1977). Root initiation in cuttings of *Pinus radiata* seedlings: effects of aromatic amino acids and simple phenylpropanoids. *Bot. Gaz.*, **138**: 434-437.

SMITHIES O. (1955). Zone electrophoresis in starch gel: Group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, **61**: 629-641.

SRIVASTAVA O.P. and VAN HUYSTEE R.B. (1973). Evidence for loose association of peroxidase, polyphenol oxidase and IAA-oxidase isozyme of peanut suspension culture medium. *Can. J. Bot.*, **51**: 2207-2215.

SRIVASTAVA O.P. and VAN HUYSTEE R.B. (1977) a. IAA-oxidase and polyphenol oxidase activities of peanut peroxidase isozymes. *Phytochem.*, **16**: 1527-1530.

SRIVASTAVA O.P. and VAN HUYSTEE R.B. (1977) b. Interactions among phenolics and peroxidase isozymes. *Bot. Gaz.*, **138**: 457-464.

STAEHELIN L. A. and CHAPMAN R. L (1987). Secretion and membrane recycling in plant cells: novel intermediary structures visualized in ultrarapidly frozen sycamore and carrot suspension-culture cells, *Planta*, **171**, 43.

STONIER T. (1972). The role of auxin protectors in autonomous growth. In : *Coll. Int. CNRS. Les cultures de tissus de plantes.* **193**: 423-435.

STONIER T., MACGLADRIE K. and SHAW G. (1979). Studies on auxin protectors. XIV. Chlorogenic acid, a low molecular weight auxin protector in sunflower. *Plant Cell Environm.*, **2**: 79-82.

TAKIO K., TITANI K., ERICSSON LH. and YONETAMI T. (1980). Primary structure of cytochrome c peroxidase. II. The complete amino acid sequence. *Arch Biochem Biophys* **203**: 615-629.

THORPE T. A. (1974). Carbohydrate availability and shoot formation in tobacco callus cultures. *Physiol. Plant.* **30** : 77-81.

THORPE T.A. and GASPAR Th. (1978). Changes in isoperoxidases during shoot formation in tobacco callus. *In vitro* **14**: 522-526.

THORPE T. A., TRAN THANH VAN M. and GASPAR Th. (1978). Isoperoxidases in epidermal layers of tobacco and changes during organ formation *in vitro*. *Physiol. Plant.* **44**: 388-394.

TIEN M. and TU C-PD (1987). Cloning of a cDNA for a ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Nature* **326**:-: 520-523.

TIGIER H. A., FORCHETTI S. M. AND MEDINA M. I. (1991). Isoperoxidases with IAA oxidase and syringaldazine oxidase activities. Isolation and kinetic properties in different leguminous tissues at different growth stages. In LOBARZEWSKI J., GREPPIN H. PENEL C. and GASPAR Th.



eds, Biochemical, Molecular, and Physiological aspects of plant peroxidases. Université de Genève, pp 343-352.

TOMASZEWSKI M. and THIMANN K.V. (1966). Interactions of phenolic acids, mettalics ions and chelating agents on auxins induced growth. *Plant Physiol.*, **41**: 1443-1454.

TRAN THANH VAN K.M. (1981). Control of morphogenesis in *in vitro* cultures. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **32**: 291-311.

VANCE C. P. and SHERWOOD R. T. (1976). Regulation of lignin formation in reed canary grass in relation to disease resistance. *Plant Physiol.*, **57**: 915-919.

VANCE C. P., ANDERSON J. O. and SHERWOOD R. T. (1976). Soluble and cell wall peroxidases un reed canary grass in relation to disease resistance and localized lignin formation. *Plant Physiol.*, **57**:920-922.

VAN DEN BERG B.M., CHIBBAR R.N. andVAN HUYSTEE R.B. (1983). A comparative study of a cationic peroxidase from peanut and an anionic peroxidase from *Petunia*. *Plant Cell Rep*, **2**: 304-307.

VAN DER KRIEKEN W.M., BRETELER H. VISSER M.H.M. and JORDI W. (1992). Effect of light and riboflavan on indolebutyric acid-induced root formation on apple *in vitro*. *Physiol. Plant*, **85**: 589-594.

VAN FLEET D. S. (1947). The distribution of peroxidase in differenciating tissues of vascular plants. *Biodynamica*, **113**: 125-140.

VAN HOOF P. and GASPAR T. (1976). Peroxidase and isoperoxidase changes in relation to root initiation of *Asparagus* cultured *in vitro*. *Sciencia Horticult.*, **4**: 27-31.

VAN HUYSTEE R.B. (1986). Biosynthesis of peroxidase, a hemo as well as a glycoprotein. In. GREPPIN H, PENEL C., GASPAR Th., Eds. *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. Université de Genève, 125-129.

VAN HUYSTEE R. B. (1990). Molecular aspects and biological functions of peanut peroxidase. In: Eversey Eds, *Peroxidase*, vol. 2, chapter 6 (pp. 155-170) CRC Press.

VASSEUR J. et LEGRAND B. (1972). Répartition des protéines, des acides nucléiques et des activités enzymatiques: auxines-oxydases, peroxydases et catalases dans les feuilles d'endive. *Rev. Gen. Bot.*, **79**: 309-317.

VASSEUR J. et SENE A. (1984).: Influence de quelques régulateurs de croissance sur la prolifération de petits explantats racinaires de *Cichorium intybus* L (var. Witloof) cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **298** : 371-374.

VASSEUR J., LEFEBVRE R. et BACKOULA E. (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.

VERVERIDIS P. and JOHN P. (1991). Compete recovery *in vitro* of ethylene-forming enzyme activity. *Phytochemistry*, **30** (3): 725-727.

VIOQUE A., ALBI M. A. and VIOQUE B. (1981). Role of IAA-oxidase in the formation of etylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Phytochemistry*, **20**: 1473-1475.

VON ARNOLD S. and GRONROOS R. (1986). Anatomical changes and peroxidase activity after cytokinin treatments inducing adventitious bud formation on embryos of *Picea abies*. *Bot. Gaz.*, **147**: 425-431.

WELINDER KG. and NORSKOV-LAURITZEN L. (1986). Structure of plant peroxidases. Preliminary fitting into the molecular model of yeast cytochrome c peroxidase. In: GREPPIN H., PENEL C., GASPAR Th., Eds, *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. Univ. Geneva, pp. 61-70.

WELINDER KG. (1991). The plant peroxidase superfamily. In: LOBARZEWSKI J , GREPPIN H., PENEL C., GASPAR Th., Eds, *Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of plant peroxidases*. University of Geneva, pp. 3-13.

WHITMORE F. W. (1978) a. Lignin-protein complex catalysed by peroxidase. *Plant Sci. Lett.*, **13**: 211-245.

WHITMORE F. W. (1978) b. Lignin-carbohydrate complex formed in isolated cell walls of callus. *Phytochem.*, **17**: 421-425.

WENT T.W. (1928). Wuchstoff and Wachstum. *Roc. Trav. Bot. neerl.*, **25**, I.

WINSTON G. W. (1990). In: ALSCHER R. G. and CUMMING J. R. Eds: Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms, 57-86. Wiley-liss, N. Y.

WESTERMARK U. (1982). Calcium promoted phenolic coupling by superoxide radical. A possible lignification reaction in wood. Sci. Techn., 16: 71-78.

WOCHOK S.Z. and BURLESON B. (1974). isoperoxidase activity and induction in cultured tissue of wild carrot. A comparison of proembryos and embryos. Physiol. Plant, 31: 73-75.

YANG S.F. and HOFFMAN N. E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 35: 155-189.

YOUNG M. and STEELINK C. (1973). Peroxidase catalysed oxidation of naturally-occurring phenols and hardwood lignins. Phytochem., 12: 2851-2861.

ZHENG X. and VAN HUYSTEE (1992). Peroxidase-regulated elongation of segments from peanut hypocotyls. Plant Science, 81: 47-56.

ZIMMERMAN R.H. (1984). Rooting apple cultivars *in vitro*:: interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin. Plant Cell Tissue Organ Cult, 3: 301-311.

---

L'expression des activités peroxydasique et auxine-oxydasique a été étudiée au cours de la morphogénèse des tissus de racine de *Cichorium intybus* cultivés *in vitro*.

Selon la composition du milieu de culture, la morphogénèse des explantats racinaires a été orientée vers la production soit de bourgeons, soit de racines ou de cals.

Après avoir adapté la technique de la mesure de l'activité auxine-oxydasique, un parallélisme entre activité peroxydasique et auxine-oxydasique a été établi quelles que soient les fractions enzymatiques utilisées: solubles, ioniques ou covalentes.

Les réponses différentes constatées au cours de la différenciation morphogène sont précédées par des variations des profils cinétiques d'activité enzymatique: alors que dans les tissus non organogènes aucun pic d'activité peroxydasique n'a été décelé, au cours de la néoformation de bourgeons ou de racines, celle-ci augmente et présente des pics précédant toujours l'émergence des organes. Le moment d'apparition de ces pics est spécifique de la nature de l'organe néoformé. Ces différences se traduisent par l'absence des isoperoxydases C<sub>2</sub> et C<sub>5</sub> dans les conditions non organogènes.

Nous avons pu montrer que la lumière ou certains régulateurs de croissance (ANA et BAP) sont capables d'induire ou de réprimer l'expression de certaines isoperoxydases. En effet, dans les conditions induisant une différenciation caulinaire ou racinaire, la culture des explantats à l'obscurité provoque l'apparition d'une isoperoxydase basique supplémentaire (C<sub>5</sub>). Cette isoperoxydase n'est plus exprimée en présence d'ANA qui, tout comme la BAP entraînent la répression d'une autre isoperoxydase basique C<sub>2</sub>. L'absence de cette dernière isoperoxydase est accompagnée d'une inhibition d'organogénèse.

Par ailleurs, lorsque le milieu de culture contient de très fortes concentrations en glucose, l'activité peroxydasique est diminuée ce qui se traduit par un nombre de bourgeons néoformés plus faible. Une corrélation entre activité peroxydasique en début de culture et capacité néoformatrice de bourgeons a été démontrée.

En ce qui concerne l'enracinement des bourgeons, nous avons montré que parmi les substances rhizogènes utilisées, l'ANA augmente d'une façon significative le pourcentage d'enracinement des bourgeons chlorophylliens et que la transplantation de ces derniers d'un milieu contenant l'ANA vers un milieu sans régulateurs de croissance ou additionné de rutine améliore le taux d'enracinement.

En jouant sur les conditions d'éclairement, nous avons montré que d'une part, lorsqu'on effectue un traitement des bourgeons chlorophylliens, en début de culture, pendant 3 jours à l'obscurité puis à la lumière, le nombre de vitroplants obtenus est exalté en absence de tout régulateur de croissance, d'autre part l'utilisation de bourgeons étiolés provoque un enracinement précoce et atteint 100 %. De plus, le pic d'activité peroxydasique obtenu à partir des bourgeons étiolés apparaît avant celui des bourgeons chlorophylliens.

-----

The peroxidase as well as IAA-oxidase activities have been studied during morphogenesis of small root explants of *Cichorium intybus* L cultured *in vitro*.

According to the culture media composition, morphogenesis was directed towards the production of either buds, roots or the calli.

After having set up the technical aspects concerning the assay of IAA-oxidase activity, a parallelism between IAA-oxidase and peroxidase activities was established whatever enzyme fractions used: soluble, ionic or covalent.

The different responses observed during morphogenic differentiation are preceded by kinetic profile variations of peroxidase activity. While, in non organogenetic tissue, no peak of peroxidase activity could be detected, during either bud or root differentiation, the peroxidase activity increased and always showed a peak preceding the organ emergence. The peak emergence moment was specific of the nature of the neoformed organ. These differences are expressed by the absence of C<sub>2</sub> and C<sub>5</sub> isoperoxidases in the non organogenic conditions.

We showed that light or some growth regulators were able to induce or suppress the expression of some isoperoxidases. Indeed, in conditions which induce a caulogenesis or rhizogenesis differentiation, the culture of roots in darkness cause to happen the appearance of a supplementary basic isoperoxidase (C<sub>5</sub>). This isoperoxidase is suppressed when explants are grown with NAA (10<sup>-5</sup> or 5 10<sup>-5</sup> M). Moreover the presence of NAA or BAP (10<sup>-5</sup> M) led to the repression of an other basic isoperoxidase: C<sub>2</sub>. The absence of this later is accompanied by an organogenesis inhibition.

A relationship between level of peroxidase activity at the early stage of the culture and the yield of bud formation have been established: a high peroxidase activity is correlated with a high capability to neoformed buds.

Concerning the rooting of neoformed buds, we have shown that among the rhizogenic substances used, the NAA increased significantly the percentage of green buds rooting and that the transfer of these explants from a medium containing NAA to an other deprived of growth regulators or containing rutine improved the rate of rooting.

Changes of light conditions on green buds cultured in hormone free conditions showed that a 3 days treatment in the dark (at the onset of the experience) increase the number of vitroplants obtained *in vitro*.

Utilisation of etiolated buds cultivated in the same conditions, lead to a precocious rooting with attained 100 %. In this case, peak peroxidase activity occurred earlier than with green buds.