20 000 531

50 376. 1999_ 239

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

U.F.R. DE BIOLOGIE

N° d'ordre 2580

<u>THESE</u>

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I discipline: GENIE ENZYMATIQUE, BIOCONVERSION ET MICROBIOLOGIE

présentée par

Grégory BOEUF



INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE SUR LES PEROXYDASES APOPLASTIQUES DE *CICHORIUM INTYBUS*. ETUDE BIOCHIMIQUE ET MOLECULAIRE DE L'ISOPEROXYDASE CICPX.

Date de soutenance: 14 Octobre 1999

Co-directeurs de thèse: B. Legrand et S. Rambour

JURY

M. S. RAMBOUR Me R. GOLDBERG M. C. PENEL M. L. BELINGHERI Professeur Professeur Professeur Maître de conférences UST Lille Université Paris 7 Université Genève UST Lille Président Rapporteur Rapporteur Examinateur

Cette Thèse a été réalisée dans le laboratoire de Physiologie et Génétique Moléculaire Végétale de l'U.S.T. de Lille, dirigé par le Professeur S. Rambour, que je remercie très particulièrement pour m'y avoir acceuilli et confié ce projet.

Ma profonde gratitude s'adresse, à mon directeur de thèse, Monsieur B. Legrand, qui par ses connaissances, ses conseils et sa disponibilité, a largement contribué à la réussite de ce travail. De plus, ses suggestions et ses critiques m'ont facilité la rédaction des différents articles et de ce manuscrit.

Je suis très reconnaissant envers Madame R. Goldberg et Messieurs C. Penel et L. Belingheri qui ont bien voulu faire partie de mon jury et ont accepté d'examiner ce mémoire.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Hocquet des établissements "OK graines" à Raillencourt, qui m'a fourni gracieusement les racines tubérisées de chicorée nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je tiens à saluer spécialement tous les étudiants du laboratoire: Anne (pour m'avoir raccompagné plus d'une fois chez moi, avec Christophe, et pour avoir toujours pensé à moi lorsque tu devais te débarrasser d'un bibelot), Axelle, Béa, Delphine (pour ton tiroir magique et encore un grand merci pour ton aide en bio mol), Rachel (j'espère que cochon se souviendra toujours du goût particulier de mes endives), Sophie, Eric (pour mes épilations gratuites), Jeff (pour ton impressionnante chance au Risk), Laurent, Olivier (pour m'avoir appris à surfer, maintenant je suis devenu "baléze"), Robert (pour tes dépannages en info). Je les remercie pour l'amitié dont ils ont fait preuve et je leur souhaite bonne chance pour la suite de la longue aventure qu'est la vie...

Je tiens aussi à exprimer ma sympathie à tout le personnel du laboratoire pour l'aide qu'il m'a apportée.

Je ne saurait oublier mes parents qui m'ont permis de réaliser cette thèse, et m'ont soutenu tout au long de mes études. Qu'ils en soient vivement remerciés par la présentation de ce mémoire.

TABLE DES MATIERES

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
1.1 PRESENTATION GENERALE DE LA PEROXYDASE	\diamond
1.2 STRUCTURE DES PEROXYDASES	Ý
1.3 <u>VOIES DE SYNTHESE DES PEROXYDASES</u>	
1.3.1 Biosynthèse de la glycoprotéine	
1.3.2 Biosynthèse de l'hème	
1.3.2.1 Formation de l'acide δ-amino lévulinique12	
1.3.2.2 Formation de la protoporphyrine IX	
1.3.2.3 <u>Devenir de la protoporphyrine IX</u>	
1.4 LOCALISATION DES PEROXYDASES	Je
1.5 ROLES PHYSIOLOGIQUES DES PEROXYDASES	\swarrow
1.5.1 <u>Catabolisme auxinique</u> 16	
1.5.2 <u>La lignification</u> 17	
1.5.2.1 Rôle des peroxydases dans le processus de lignification18	
1.5.2.2 Formation de l' H2O2 et son rôle dans la lignification	
1.5.2.3 Autres participations des peroxydases dans la rigidification des	
<u>parois</u> 20	
1.6 <u>REPONSE_AUX_STRESS</u>	
INTRODUCTION GENERALE	

CHAPITRE I		5
------------	--	---

2.1 <u>INTRODU</u>	J <u>CTION</u>	26
2.2 <u>RESULTA</u>	ATS: Article I	29
Influenc	e of light conditions on development, ap	poplastic
peroxida	ase activities and peroxidase isoenzymes	in chicory root
explant	5	
	Abstract	
	Introduction	
	Material and methods	
	Results	
	Discussion	
	References	
2.3 <u>RESULTA</u>	ATS COMPLEMENTAIRES	
2.3.1 <u>I</u>	Développement des explants racinaires	
2.3.2 <u>I</u>	Evolution de la lignification	
2.4 DISCUSS	ION COMPLEMENTAIRE	40
CHAPITRE II .		42
3.1 <u>INTRODU</u>	J <u>CTION</u>	43
3.2 <u>RESULT</u>	<u>ATS:</u> Article II	44
Effects	of NAA on the development, apoplastic	peroxidase
activitie	s, peroxidase isoenzymes, chlorophyll ar	nd lignin contents
in chico	ry root explants	
	Abstract	45
	Introduction	46
	Material and methods	47

ł

Kesuits	
Discus	sion51
Refere	nces53
3.3 <u>RESULTATS COMP</u>	LEMENTAIRES
3.3.1 Influen	<u>ce de l'ANA sur la morphologie des explants</u>
racinair	<u>es</u> 55
3.3.2 Influen	ce de l'ANA sur la lignification des explants
racinair	<u>ves</u> 55
3.4 DISCUSSION COME	PLEMENTAIRE
CHAPITRE III	
4.1 <u>INTRODUCTION</u>	
4.2 <u>RESULTATS:</u> Article	e III62
Purification and cha	aracterization of a basic peroxidase from the
medium of cell sus	pension cultures of chicory
medium of cell sus Abstra	pension cultures of chicory act63
medium of cell sus Abstra Introd	pension cultures of chicory act
medium of cell sus Abstra Introd Materia	pension cultures of chicoryactactional and methodsaction
medium of cell sus Abstra Introd Materia Result	pension cultures of chicory act
medium of cell sus Abstra Introd Materia Result Discus	pension cultures of chicory act
medium of cell sus Abstra Introd Materia Result Discus Refere	pension cultures of chicory act
medium of cell sus Abstra Introd Materia Result Discus Refere 4.3 <u>DISCUSSION COM</u>	pension cultures of chicory act
medium of cell sus Abstra Introd Materia Result Discus Refere 4.3 <u>DISCUSSION COM</u>	pension cultures of chicory act
medium of cell sus Abstra Introd Materia Result Discus Refere 4.3 <u>DISCUSSION COMM</u>	pension cultures of chicory act
medium of cell sus Abstra Introd Materia Result Discus Refere 4.3 <u>DISCUSSION COMI</u>	pension cultures of chicory act
medium of cell sus Abstra Introd Materia Result Discuss Refere 4.3 <u>DISCUSSION COME</u> CHAPITRE IV	pension cultures of chicory act
medium of cell sus Abstra Introd Materia Result Discus Refere 4.3 DISCUSSION COMM CHAPITRE IV 5.1 INTRODUCTION 5.2 MATERIEL ET MET	pension cultures of chicory act

5.2.2 Quantification des ARN totaux
5.2.3 <u>Contrôle de la qualité des ARN totaux</u>
5.2.4 <u>Purification des ARN messagers</u>
5.2.5 Amplification d'un ADNc par la technique de RT-PCR à
<u>partir des ARNm</u> 89
5.2.6 <u>Clonage d'ADNc</u> 90
5.2.6.1 Ligation du fragment amplifié dans le plasmide pCR [©] 2.190
5.2.6.2 <u>Transformation de la souche bactérienne INVαF</u> 90
5.2.6.3 <u>Sélection des bactéries transformées</u>
5.2.6.4 <u>Contrôle des clones bactériens</u>
5.2.7 <u>Séquençage de l'ADNc</u> 92
5.2.7.1 <u>Réaction de séquençage</u> 92
5.2.7.2 <u>Gel de séparation</u> 93
5.3 <u>RESULTATS</u> 92
5.3.1 Amplification de trois bandes majeures par la technique de
<u>RT-PCR à partir des ARNm d'explants racinaires cultivés</u>
<u>en présence d'ANA 10⁻⁴ M</u>
5.3.2 <u>Clonages et séquençages des 3 ADNc</u>
5.4 <u>DISCUSSION</u> 96
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES
ANNEXES
REFERENCES118

ADN: Acide Désoxyribonucléique ADNc: Acide Désoxyribonucléique complémentaire AIA: Acide Indole-3-Acétique ANA: Acides 1-Naphtalène acétique ARN: Acide RiboNucléique ARNm: Acide RiboNucléique messager Cicpx: Chicorium intybus cationic peroxidase Kb: kilobase KDa: KiloDalton LTGA: Lignin Thioglycolic Acid **IEF:** IsoElectroFocalisation NAA: 1-Naphtalene Acetic Acid PCR: Polymerase Chain Reaction pI: point Isoélectrique PM: Poids Moléculaire RT-PCR: Retro Transcription- Polymerase Chain Reaction SAO: Specific Auxin Oxidase activity SGPOX: Specific Guaiacol Peroxidase activity SSO: Specific Syringaldazine Oxidase activity Tm: Temperature of melting

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 PRESENTATION GENERALE DE LA PEROXYDASE:

C'est à partir du début du XIXème siècle que les premières réactions enzymatiques, dues à la peroxydase*, ont été mises en évidence. En 1820, Planche décrit dans le journal français de pharmacologie des substances qui développent une couleur bleue en présence de gomme de gaïacum. En 1856 Schönbein observe que la présence d'H₂O₂ dilué permet d'oxyder certains composés organiques à l'aide d'extraits de plantes ou d'animaux. Le nom de peroxydase fut donné, en 1898, par Linossier qui travaillait sur des extraits de pus humain, présentant une telle activité. De nos jours, il est possible de recenser 75 à 100 nouvelles publications par jour utilisant comme mot clé "peroxydase". Durant les 10 dernières années sont parus 31 000 articles comportant les termes "peroxydase(s) de plante" dans leurs titres (Siegel 1993). La peroxydase, est une enzyme très largement répandue dans le monde vivant, on la retrouve aussi bien chez les animaux et les plantes que chez les algues, les champignons et les bactéries. Les raisons pour lesquelles la peroxydase est largement étudiée sont dûes, d'une part, à son ubiquité, et d'autre part, à la mise en œuvre facile de moyens de détection et de mesures d'activité.

La fonction première de la peroxydase (donneur: H_2O_2 oxydoréductase; EC 1.11.1.7) est d'oxyder un substrat aux dépens de l' H_2O_2 . La réaction peut-être simplifiée sous la forme suivante:



R.

Le nombre important de co-substrats utilisables par la peroxydase en fait un cas assez unique dans les études enzymologiques. Elle est en effet capable d'oxyder: le gaïacol, la benzidine, l'ABTS (acide 2,2'-azino-di-3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonique), l'acide ferrulique, le pyrogallol, les précurseurs de la lignine, l'AIA (acide indole-3-aldehyde), l'acide ascorbique... et cette liste n'est pas exhaustive.

^{*} Si au début de cette présentation nous parlons de "la peroxydase", nous verrons que ce singulier s'avérera insuffisant par la suite.

a QLSATFYDTTCPNVTSIVR-GVMDQRQRTDARA GAKIIRLHFHDCFVNGCDGSILLD --- TDGTQTEKDAP---ANVGAGGFDIV-DDIKTA DINGTETE ONS PN S- R YE- IAGALOS TP----- PAC--- F.A - VNSAIDAET M SL n G ħ -N STER FON S- R YP- I RM A A NS SN -DTIVNEL SPIASL TP D- TSFTG ON GPNR S- R T- IN S TTN S.S. LL T KS KSAVS-SQP N S.L.F. 8 LENVCPG-VVSCADILALASEIGVVLAKGPSWQVLFGRKDSLTANRSGANSDIPSPFETLAVMIPQFTNKG-MDLT DLVALSGANTFG RA VIDT NIS I ARDS AKLE OTYN AL SAR FT LT A DN TO OK NO N-FT R EM A V F h L TI AQQS T G R PL R Q FLDL ANL A F POLKOS R V LNRSS KN V SA R-T I ARDS QLG N N KV R AK SQAA N A SMS SQL SS SAV LSTR- M I QS VKA -RCGTFEQ-RLFNFNGSGNPDLTVDATFLQTLQ-GICFQG-GNNGATFTNLDISTPNDFDNDDYFTNLQSNQGLLQTDQELFSTSGSA-TIAI S YCTSGNV ------ AQ ----- NCSATLTDSDLQQ T- TM -KV YD NN IMFS V T--- D - T G Q R- IND Y SNTL LN Y R L PLN- LS LVDF LR TI K YV EEQK IS SPNATD PL VN -RA VY ETN------IN A A- RQRS PRAA SGD NLAP NSATS S K MAQR HS V -NG TDS ---B -- VNRYAGSOTOFFDDFVSSMIKLGNISPLTGTNGQIRTDCKRVN 5 F TD SNDVSV LG AAA M DLP SA AQ E DV S "PTSVASM C -RSF N TOT NA EA DRM T Q LN RV SNS d - RG SN PSS NS AAA M D SS E KV GKT

Figure 1: Alignement de séquences d'acides aminés de peroxydases déduites à partir de l'ADNc de (a) vicotiana tabacum (Lagrimini et al. 1987). (b) Solanum tuberosum (Roberts et al. 1988), ou du séquençage lirect de la protéine de (c) Armoricia rusticana (Welinder 1979). (d) Brassica napus (Mazza et Welinder 980). Seuls les acides aminés différents de ceux de Nicotiana tabacum sont indiqués. Les encadrements précisent les emplacements autours des 2 histidines impliquées dans l'attachement à l'hème. Les astérisques ndiquent les résidus asparagines intervenant probablement dans l'attachement des chaînes carbohydratées. D'après Hendriks T. 1989. Dans occurrence and properties of petunia peroxidase a. Thèse.) L'une des particularités de la peroxydase est qu'elle se présente le plus souvent sous forme d'isoenzymes. Theorell (1940) avait déjà pu mettre en évidence, par électrophorèse à partir d'une purification partielle d'extrait de raifort, deux peroxydases. Au cours des années, le nombre des isoperoxydases révélées est de plus en plus important, et par exemple, 11 isoperoxydases ont été séparées chez le tabac (Lee 1972). Cette multiplicité d'isoenzymes rend complexes les études menées sur les fonctions des peroxydases.

Ce grand nombre d'isoenzymes de peroxydase serait dû à la présence, chez de nombreuses espéces végétales, de plusieurs gènes de peroxydases (Rick 1983; Hendriks 1985; Quiros et McHale 1985; Endo et Morishma 1983; Brewbaker et al. 1985).

Les points isoélectriques des différentes isoenzymes s'étendent sur une grande échelle comprise entre 3 et 10. Elles sont distribuées classiquement dans deux groupes. Le premier est constitué des peroxydases acides ou anioniques, le second des peroxydases basiques ou cationiques, la limite entre les deux groupes se situant aux environs d'un point isoéléctrique de 6,0. La masse moléculaire varie elle aussi, elle est en moyenne de l'ordre de 40 000 Daltons, la majorité des peroxydases ayant une masse moléculaire comprise entre 32 000 et 45 000 Daltons.

1.2 <u>STRUCTURE DES PEROXYDASES:</u>

Les peroxydases ont une structure complexe. Tout d'abord, elles sont constituées d'une chaîne unique d'environ 300 acides aminés. L'alignement de différentes séquences d'acides aminés de peroxydases, déduit soit directement de la protéine ou d'un ADNc, montre que le pourcentage d'homologie varie de 35 à 50% selon les espèces. Cette homologie est particulièrement plus élevée, au alentour de 90%, au niveau des résidus histidine impliqués dans l'attachement de l'hème (figure 1).

Chez les plantes le pourcentage de glycosylation des peroxydases se situe aux alentours de 1 à 25% de leur poids moléculaire. Welinder (1979) chez la peroxydase du raifort, rapporte l'existence de 8 sites d'attachement de chaînes de sucres chacune étant N-glycosylée. L'asparagine est probablement le résidu permettant leur attachement à la protéine. Les fonctions assignées aux glycanes sont de l'ordre de 5 chez les animaux (Olden et al.1985): maintien de la

conformation et de la solubilité, protection contre les attaques protéolytiques, médiation dans l'activité biologique, intervention dans l'externalisation de la glycoprotéine et implication dans le développement de l'embryon et dans la différenciation. Chez les plantes, tout porte à croire que les glycanes sont dotés des mêmes rôles (Chrispeels 1991).

Les peroxydases sont aussi constituées d'une partie hémique, c'est à dire une protoporphyrine IX associée à un atome de fer, comme la myoglobine, l'hémoglobine et le cytochrome C.

Les propriétés d'absorption de l'hème à 405 nm et de la protéine à 280 nm ont permis d'établir un rapport, ou valeur de 'Reinheits Zahl' (RZ= A_{405nm}/A_{280nm}), très souvent utilisé pour définir le degré de pureté d'une peroxydase isolée à partir d'un extrait brut (Shannon et al. 1966; Maldonado et van Huystee 1980).

La présence de calcium dans la peroxydase du raifort (HPRc) a été établie depuis quelques années (Haschke et Freidhoff 1978). La présence de calcium permettrait le maintien de la structure protéique à proximité de l'hème (Ogawa 1979). La perte du calcium cause non seulement l'altération de la conformation protéique, mais aussi des changements majeurs dans l'hème chez la peroxydase cationique d'arachide (Rodriguez-Maranon et al. 1993).

La structure des peroxydases peut-être schématisée comme suit:





Figure 2: Voies de biosynthèse de l'acide δ amino-lévulinique

1.3 VOIES DE SYNTHESE DES PEROXYDASES:

Les peroxydases comme nous venons de le voir sont de structures complexes, elles sont formées d'une glycoprotéine associée à une partie hèmique.

1.3.1 Biosynthèse de la glycoprotéine:

Nous n'entrerons pas ici dans les détails de la transcription et de la traduction qui se déroulent comme pour n'importe quelle protéine. Une fois ces deux étapes franchies le polypeptide résultant subit des tranformations post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Les résultats obtenus par Lew et Shannon (1973) et par van Huystee (1976) suggèrent que la biosynthèse des peroxydases est semblable à celle des glycoprotéines chez les animaux.

1.3.2 Biosynthèse de l'hème:

L'hème est une molécule formée d'une protoporphyrine IX à laquelle est chélaté un atome de fer. La voie de biosynthèse de la protoporphyrine IX est longue. Elle débute par la condensation de deux molécules d'acide δ -amino lévulinique qui peut suivre 2 voies de biosynthèse.

1.3.2.1 Formation de l'acide δ-amino lévulinique:

La première voie de biosynthèse (figure 2), ou cycle de Beale, observée dans les chloroplastes des plantes supérieures et des algues vertes, et dans certaines bactéries, notamment les eubactéries (*Escherichia coli, Bacillus subtilis*), les cyanobactéries (*Synechocystis*) et les archaebactéries, se déroule par la fixation du tRNA glutamate sur le



Figure 3: Formation de la protoporphyrine IX à partir de l'acide δ amino-lévulinique

glutamate. Elle est responsable, chez les végétaux, de la synthèse des chlorophylles (Weistein et Beale 1983).

La seconde, ou cycle de Shemin, a lieu dans certaines bactéries et dans les mitochondries des levures et des cellules animales. C'est une dérivation du cycle de Krebs au niveau du succinyl-CoA qui se condense avec le glycocolle (figure 2). Elle est responsable de la synthèse de l'hème du cytochrome *c* oxydase (Weistein et Beale 1983).

Cependant, le fait que les plantes possèdent à la fois des mitochondries et des chloroplastes permet de considérer que les deux voies de biosynthèse coexistent. Les quelques études consacrées à la biosynthèse de la moitié hémique des peroxydases chez les plantes (Gaspar et al. 1982; Chibbar et van Huystee 1986; Penel et al. 1992) ne permettaient pas de conclure à l'implication plus importante d'une voie par rapport à l'autre. Dernièrement Bisbis et al. (1998) ont démontré que ces deux voies métaboliques étaient capables de synthétiser l'hème des peroxydases.

1.3.2.2 Formation de la protoporphyrine IX:

Quel que soit le chemin suivi pour la synthèse de l'acide δ -amino lévulinique, de nombreuses réactions interviennent dans le symplasme pour arriver à la formation de la protoporphyrine IX (figure 3).

1.3.2.3 Devenir de la protoporphyrine IX:

La molécule de protoporphyrine IX peut, selon le métal inséré en son centre, être utilisée dans des voies de biosynthèse assez diverses. Par exemple l'insertion d'un atome de sélénium conduira à la formation d'une glutathion-peroxydase, celle d'un atome de cuivre mènera à l'acide ascorbique-oxydase et celle d'un atome de magnésium aux chlorophylles. Dans le cas des peroxydases c'est l'addition d'un atome de fer qui aboutira à la formation de l'hème (figure 4).



Figure 4: Devenir de la protoporphyrine IX selon le métal chélaté en son centre

1.4 LOCALISATION DES PEROXYDASES:

Grâce aux études histologiques, liées à la coloration de co-substrats, les peroxydases ont pu être localisées. Elles sont généralement présentes dans tous les tissus végétaux. Cependant, la localisation varie selon les saisons (Czaninski et Catesson 1969; Polle et al. 1994), l'espèce végétale, et le degré de différenciation des cellules (Poux 1969). La localisation cellulaire des peroxydases est néanmoins sujette à controverses. En effet lors des coupes la coloration peut facilement diffuser d'un organite à l'autre. Toutefois, en plus de la paroi pecto-cellulosique, des activités peroxydasiques ont pu être mises en évidence avec certitude dans les vacuoles, les dictyosomes et le réticulum endoplasmique. Les chloroplastes, par contre, contiennent une peroxydase, l'ascorbate peroxydase, qui utilise l'acide ascorbique comme donneur d'électrons. Des activités peroxydasiques ont également été décelées dans les mitochondries, mais Pleniscar et al. (1967) les attribueraient plutôt à des contaminations provenant d'autres composants cellulaires. Les peroxydases sont aussi trouvées dans une large proportion dans le milieu extracellulaire. En effet de nombreux auteurs se sont servis de cette capacité des peroxydases à être rélarguées dans le milieu extérieur pour mener leurs études (O'Donnell et al. 1991; Narita et al. 1995; Melo et al. 1995).

En conclusion, il est possible de dire que les peroxydases sont largement associées à la paroi des cellules végétales et au système de membranes endocellulaires.

Une source d'erreur non négligeable, lors des études histo-et cytochimiques souvent omise par les auteurs, est la présence d'inhibiteurs capables de masquer les activités peroxydasiques (Gaspar et Bouchet 1980; Knypl et Chylinska 1974; Legrand et al. 1976). Les peroxydases ont été classées en différents groupes suivant leur degré de liaison avec les éléments cellulaires. Ainsi nous pouvons distinguer:

- les peroxydases solubles regroupant:

. les peroxydases pariétales libres, recueillies par infiltration sous vide d'eau ou de solution tamponnée dans les tissus, suivie d'une centrifugation douce sans broyage préalable des tissus.

. Les peroxydases cytoplasmiques, extraites après broyage des tissus dans une solution tamponnée de faible force ionique.

- les peroxydases liées ioniquement aux membranes et aux parois, extraites par une solution tampon de force ionique plus élevée.

- les peroxydases liées de façon covalente à la paroi pectocellulosique, libérées par digestion enzymatique de celle-ci.

1.5 <u>ROLES PHYSIOLOGIQUES DES PEROXYDASES:</u>

Les processus physiologiques dans lesquels les peroxydases interviendraient sont assez nombreux: la polymérisation de la lignine (Higuchi 1981; Ros Barceló 1987) et de la subérine (Espelie et Kolattukudy 1985; Espelie et al. 1986), les réactions d'attachement des pectines (Robert et Roland 1989) et des extensines (Robert et Roland 1989), l'oxydation de l'AIA (Galston et Dalberg 1954; Goldacre 1961; Hare 1964), la formation de l'éthylène (Mattoo et Liebermann 1977) et l'oxydation des composées flavonoïques (Yamasaki 1997; Yamauchi 1997).





1.5.1 Catabolisme auxinique:

L'auxine (AIA), considérée comme une hormone chez les végétaux, joue un rôle capital dans la régulation de la croissance et du développement de la plante. Cette molécule est associée aux phénomènes d'élongation cellulaire (Heyne 1933), de différenciation cellulaire (Coppens et DeWittec 1990; Galston 1959), de dominance apicale (Thimann et Skoog 1934), de dormance (Mohan et Kolattukudy 1990), de floraison (Giacomelli et Cervigni 1964) de rythmes biologiques (Yamazaki et al. 1965). La dégradation de l'auxine est souvent corrélée aux activités peroxydasiques. Mais, l'intervention des peroxydases dans le catabolisme auxinique reste controversée, et trois hypothèses ont été émises. La première consiste à dire que les peroxydases ne sont pas à l'origine d'une telle détérioration de l'AIA et qu'une autre enzyme, l'auxine-oxydase, en serait responsable (Sequeira et Mineo 1966). La deuxième hypothèse suggère que les deux activités, peroxydasique et auxine-oxydasique, se situeraient sur une même enzyme possédant deux sites catalytiques (Ray 1960; Siegel et Galston 1967; Hoyle 1972). La dernière proposition conclut bien à la participation des peroxydasés, mais seules certaines isoenzymes seraient impliquées. Mazza et al. (1970), Ricard et al. (1972), Dencheva et Klisurka (1981) et Van Den Berg et al. (1983) proposèrent que les peroxydases cationiques seraient les meilleures candidates. Mais aucune évidence n'existe pour dire que ces actions in vitro peuvent s'appliquer in situ.

Deux voies de dégradation de l'AIA existent, l'une non-décarboxylative où les peroxydases n'entreraient pas en jeu (Reineck 1988), et l'autre décarboxylative catalysée par les peroxydases, résultant à la formation de plusieurs produits suivant les conditions de la réaction (Östin 1995). En effet, il a été constaté que la nature des produits de dégradation de l'AIA dépend du pH du milieu réactionnel et du rapport AIA/peroxydase. En milieu acide, et pour un rapport AIA/peroxydase voisin de 1, il se forme essentiellement de l'indole-3-aldéhyde. En milieu neutre, et pour un rapport AIA/peroxydase élevé, le produit majeur de dégradation est le méthylène-oxindole (figure 5).

1.5.2 La lignification:

La lignine est l'un des polymères naturels le plus abondamment rencontré dans la biosphère avec la cellulose et la chitine (Whetten et Sederoff 1995). Elle forme une trame qui interpénètre la matrice glucidique et glycoprotéique de la paroi, permettant ainsi l'augmentation de sa rigidité et de son hydrophobicité. La lignine s'accumule prioritairement dans les éléments du xylème et dans le sclérenchyme, cependant la lignification peut être induite dans n'importe quel type de cellule qui subit une blessure. Cela laisse sous-entendre que les gènes impliqués dans le processus de lignification répondent aussi bien aux signaux développementaux qu'environnementaux.

La voie de biosynthèse de la lignine n'est pas encore totalement élucidée. En effet, quelques incertitudes révélées par Neish (1968) persistent encore aujourd'hui, notamment sur la participation de certaines enzymes et sur l'ordre dans lequel les réactions ont lieu. Cependant il est actuellement admis que la lignine résulte de la co-polymérisation de trois monomères: les alcools coumarylique, coniférilique et sinapylique. L'abondance relative des trois monolignols varie entre les espèces et à l'intérieur des espèces végétales étudiées. Par exemple, les variations les plus caractéristiques sont trouvées entre les gymnospermes et les angiospermes.

Nous ne détaillerons pas ici les étapes menant à la synthèse des différents monomères de la lignine. En effet, la transformation de la L-phénylalanine en alcools p-coumarylique, coniférylique et sinapylique implique de nombreuses enzymes. La réaction est initiée par la phenylalanine ammonia-lyase (PAL), qui se trouve dans le cytoplasme (Smith et al. 1994). Peu d'études ont été réalisées sur les enzymes impliquées dans les réactions suivantes, et leur localisation n'a pas encore été déterminée avec précision. Finalement, les trois monolignols formés sont alors transportés au niveau de l'apoplasme par un mécanisme encore inconnu.





1.5.2.1 Rôle des peroxydases dans le processus de lignification:

La dernière étape du processus de lignification consiste en l'oxydation des trois cinnamyl alcools qui polymériseront spontanément pour donner un oligomère. L'assemblage de plusieurs de ces oligomères formera ultérieurement le polymère de lignine (Higuchi 1990; Hapiot et al. 1994). Deux classes différentes d'enzymes, les peroxydases et les laccases, ont été proposées dans l'oxydation des trois monolignols (figure 6A). Nous n'étudierons pas ici le cas de la laccase, où de nombreuses incertitudes règnent encore quant à sa réelle intervention dans ce processus d'oxydation. L'intervention de la peroxydase est quant à elle souvent rencontrée dans la littérature. Les arguments en sa faveur sont que les promoteurs de gènes et les transcrits des peroxydases sont exprimés dans des tissus en cours de lignification de tabac (Lagrimini et al. 1987), de tomate (Mohan et al. 1993) et de peuplier (Osakabe et al. 1994). De plus des études histochimiques (Ferrer et Ros Barceló 1994), cytochimiques (Hepler et al. 1972; Czaninski 1978; Ros Barceló 1995) et immunocytochimiques (Kim et al. 1988; Smith et al. 1994) ont révélé que les peroxydases été localisées dans des parois cellulaires en cours de lignification. Les peroxydases ont aussi une grande affinité pour l'oxydation des alcools cinnamyliques avec un Km de l'ordre de 10 à 400 µM (Takahama 1993; Ros Barceló et al 1997). Enfin, les activités peroxydasiques sont souvent corrélées avec le degré de lignification des parois (Ros Barceló 1997). Dès 1969, Geissman et Grout, ont pu synthétiser in vitro de la lignine à partir de mélanges appropriés de peroxydase, d'H₂O₂ et de cinnamyl alcools. Mais, jusqu'à présent il n'a pas encore été possible de synthétiser de la lignine native (Terashima 1990; Tollier et al. 1991; Grabber et al. 1996).

Cependant, aucun type de peroxydases, anionique ou cationique, ne peut-être corrélé spécifiquement à la lignification. L'idée que plus d'une isoenzyme de peroxydase puisse intervenir dans ce processus est en pleine émergence (Ros Barceló 1997).

1.5.2.2 Formation de l' H2O2 et son rôle dans la lignification:

De nombreuses méthodes cytochimique (Czaninski et al. 1993) ou histochimique (Olson et Varner 1993) ont révélé que des quantités importantes d' H_2O_2 se retrouvent dans les tissus en cours de lignification du xylème. Ces résultats viennent renforcer ceux déja trouvés par Catesson et al. (1978) qui suggèrent une forte corrélation entre la lignification, les teneurs en H_2O_2 , et l'activité peroxydasique. C'est pourquoi il semble indispensable que la zone de lignification produise de l' H_2O_2 .

L'origine de l' H_2O_2 reste encore assez vague. Deux lieux de production sont souvent cités: la paroi ou la membrane plasmique. Dans le premier cas, Elstner et Heupel (1976) ont suggéré que les peroxydases elles-mêmes pouvaient, par le biais de l'oxydation du NADH, générer de l' H_2O_2 , qui sera plus tard utilisé par les peroxydases pour oxyder les alcools cinnamyliques. Bien que cette hypothèse ait reçu de nombreux supports (Halliwell 1978; Mäder et al. 1980; Goldberg et al. 1985), la faible quantité de NADH trouvée dans la paroi doit nous inciter à une certaine prudence. D'autres systèmes tels que ceux impliquant la di(poly)amine oxydase (Angelini et Federico 1989) ou l'oxalate oxydase (Zhang et al. 1995) peuvent aussi produire de l' H_2O_2 , cependant dans certains cas ces systèmes enzymatiques ne montrent aucune association avec des tissus en cours de lignification.

Une autre localisation d'un système générant de l' H_2O_2 a été mise en évidence, dans les membranes plasmiques, par Bolwell et al. (1995). Une NAD(P)H oxydase est alors impliquée. Plus récemment, Ogawa et al. (1997) montrent que cette enzyme est couplée à une superoxyde dismutase, analogue à celle trouvée dans les phagocytes (Cross et Jones 1991; Henderson et Chapell 1996).



Figure 7: Schéma résumant l'intervention des peroxydases dans la voie de biosynthèse de la lignine, dans les liaisons entre les pectines et dans les liaisons entre les extensines. Les peroxydases interviendraient aussi potentiellement dans la synthèse de l'H2O2..

1.5.2.3 Autres participations des peroxydases dans la rigidification des parois:

Il a été montré que les peroxydases participent aussi *in vitro* à la liaison des extensines par oxydation des tyrosines (Fry 1987; Zheng et van Huystee 1991) (figure 6B), ou dans la liaison des polysaccharides (pectine, hémicellulose) par oxydation de l'acide férulique (figure 6C). Par le biais des peroxydases, la cellule mettrait ainsi en place un système de réticulation covalent très stable au niveau de sa paroi.

Un schéma récapitulatif (figure 7) reprend les différentes hypothèses exposées dans ce paragraphe 1.5.2.

1.6 <u>REPONSE AUX STRESS:</u>

Selon les auteurs la notion de stress est assez différente. Alors que certains considèrent qu'un stress apparaît à partir du moment ou des dommages d'ordre cellulaire ou membranaire ont lieu, d'autres envisagent le stress comme l'altération des voies métaboliques (Castillo 1992). Les changements d'activités enzymatiques, et plus particulièrement celles des peroxydases, ont fréquement été utilisées comme marqueurs de stress.

La pollution de l'air (Markkola et al. 1990; Castillo 1992), les changements de température (Bricage 1982; Hull et al. 1997), la présence de métaux lourds (Clijsters et al. 1984; Barabas et Erdei 1994), la salinité (Mittal et Dubey 1991; Converso et al. 1997), la sécheresse (Mali et Mehta 1977; Sairam et al. 1997), la radiation par les UV (Panagopoulos et al. 1990; Dai et al. 1997), l'attaque de pathogènes (Lagrimini et Rothstein 1987; Doke et al. 1996; Repka et Fischerova 1997) et la blessure (Sherf et Kolattukudy 1993; Lagrimini 1991; Diaz et Merino 1998) sont des stress environnementaux pour lesquels des changements d'activité peroxydasique ont été observés.

L'inhibition de croissance et l'augmentation progressive de la lignification constituent les réponses produites par le végétal lors d'un stimulus mécanique, du genre



Figure 8: Suggestion des voies communes de réactions dans quelques compartiments cellulaires en réponse à différentes stimuli physiques ou chimiques. (D'après Gaspar et al. 1985).

thigmomorphogénétique (Boyer et al. 1979), ou durant la présence d'agents polluants (Heath 1980; Castillo 1994). En fait la paroi cellulaire est la première barrière contre les attaques externes. Ces réponses mécaniques s'accompagnent d'une première augmentation de l'activité des peroxydases basiques après quelques minutes, suivie après quelques heures par une hausse de l'activité des peroxydases acides. Kevers et Gaspar (1985) ont montré qu'une hyperhydricité provoquait aussi l'augmentation des peroxydases basiques mais, dans ce cas, suivie d'une baisse des peroxydases acides corrélées à une diminution de la lignification.

Gaspar et al. (1985) ont proposé un schéma résumant l'éventuelle participation des deux types de peroxydases, acides et basiques, au cours de réponses physiologiques induites par un stress (figure 8).

INTRODUCTION GENERALE

Ce manuscrit regroupe les différents résultats obtenus au cours de ma thèse. Ils seront présentés en 4 chapitres reliés, les uns aux autres, par des transitions sous forme d'introduction. **Le premier chapitre** sera consacré aux influences des conditions d'éclairement sur les activités peroxydasiques apoplastiques, sur les isoperoxydases et sur les teneurs en chlorophylles et en lignine d'explants racinaires de *Cichorium intybus* L. L'introduction permettra de comprendre pourquoi des milieux de culture sans phytohormone ont été utilisés. Les parties matériel et méthodes, résultats et discussion qui en découlent seront présentées sous forme d'un article (article I) paru dans le journal *Physiologia Plantarum*.

Une étude histologique complémentaire permettra de confirmer l'hypothèse avancée lors du premier article, qui suggère que, les explants racinaires produiraient au cours de leur développement une couche cellulaire périphérique lignifiée. Ces résultats complémentaires seront discutés, et les deux paragraphes seront rapportés sous une forme conventionnelle

Les effets des conditions d'éclairement, sur les activités peroxydasiques apoplastiques, les isoperoxydases et les teneurs en chlorophylles et en lignine, étant connus, les effets de l'ANA, sur les paramètres précédents, seront alors étudiés dans le **deuxième chapitre**. Les parties matériel et méthodes, résultats et discussion seront mentionnées sous forme d'un article (article II) soumis au journal *Physiologia Plantarum*. Des résultats histologiques complémentaires viendront appuyer ceux décrits dans cet article et seront suivis d'une discussion.

La purification et la caractérisation de la Cicpx exprimée dans les explants cultivés en présence d'ANA, seront alors développées lors d'un **troisième chapitre**. L'introduction montrera pourquoi cette purification a dû être effectuée à partir des suspensions cellulaires et non à partir des explants racinaires. Le matériel et les méthodes utilisés ainsi que les résultats obtenus et la discussion seront présentés sous forme d'un article (article III) soumis au journal *Plant Physiology and Biochemistry*. Une discussion viendra compléter les hypothèses émises dans l'article.

Le **quatrième chapitre** traitera des travaux de biologie moléculaire. Lors de l'introduction nous poserons d'abord les problèmes rencontrés, puis, nous indiquerons la stratégie établie afin de les contourner. Ce chapitre sera alors présenté sous un plan habituel, matériel et méthodes, résultats et discussion. Nous verrons alors comment un ADNc de peroxydase a pu être généré par RT-PCR à partir d'explants racinaires cultivés en présence d'ANA 10⁻⁴ M.

La **conclusion générale** et les **perspectives** regrouperont les hypothèses formulées dans l'ensemble du manuscrit. Elles permettront de synthétiser les influences des différentes conditions de culture sur les isoperoxydases et les conséquences physiologiques qui en découlent, et de rassembler les hypothèses que nous avons déduites des travaux de purification et de biologie moléculaire. De plus, les perspectives de recherche, permettant d'approfondir ou de confirmer les nombreuses hypothèses avancées, seront envisagées.





Figure 9: (A) Racine tubérisée de chicorée avant forçage; (B) coupe transversale de la racine tubérisée montrant l'emplacement du cambium (Cb). Barre = 2 cm.

2.1 INTRODUCTION:

Le matériel végétal utilisé au cours de ma thèse est la chicorée de Bruxelles (*Cichorium intybus* L. var Witloof, cv Bea), plante de la famille des asteracées cultivée comme bisannuelle. Au champ, durant la première année, il se forme une racine tubérisée (Figure 9A). Lors du cycle naturel, les réserves accumulées lors de la première année dans la racine tubérisée, sous forme de fructosanes et de composés azotés (protéines de réserves, acides aminés surtout sous forme d'arginine), sont remobilisées au printemps suivant pour fournir l'énergie et les matériaux nécessaires à la formation de la hampe florale et des graines. Cependant, ce cycle peut-être interrompu, en fin de première année, par la récolte des racines tubérisées. Celles-ci sont alors conservées à basse température (0°C), puis forcées par culture hydroponique en chambres climatisées (18°C) à l'obscurité et sous un degré d'humidité constant. Après trois semaines de ce traitement, un bourgeon étiolé se développe et constitue l'endive commercialisée.

La majorité de mes travaux s'est déroulée à partir d'explants racinaires prélevés au niveau de la zone cambiale des racines tubérisées (Figure 9B). Ces explants racinaires servent depuis plusieurs années dans notre laboratoire comme modèle végétal permettant l'étude de l'influence de facteurs physiques (lumière et obscurité) et chimiques (glucose, phytohormones) au cours de la différenciation organogène. En parallèle des mesures d'activité peroxydasique ont été réalisées, afin de mettre en évidence des corrélations entre l'organogénèse et les peroxydases. Par exemple, il a été montré que le glucose diminue l'activité peroxydasique quand des concentrations supérieures à 0,01 M été additionnées au milieu de culture d'explants cultivés à la lumière (Legrand et al. 1991), une baisse du nombre de bourgeons neoformés était alors observée. Par contre à l'obscurité les effets du glucose sur l'activité peroxydasique et sur la néoformation de bourgeons étaient moins prononcés. D'autres travaux portant sur l'activité peroxydasique au cours de la formation de cals, de bourgeons ou de racines à partir des explants racinaires de chicorée ont été réalisés (Bouazza et al. 1993). L'emploi de milieux de cultures complexes contenant des phytohormones, des sucres et des vitamine amenait des changements des profils isoperoxydasiques. Notamment, le milieu de culture induisant la formation de

racines et contenant, entre autre, de l'ANA (10^{-6} M), de la kinétine (10^{-7} M), de l'acide gibbérellique (10^{-5} M) et du glucose (0,055 M), conduisait à une activité plus importante des isoperoxydases cationiques qu'un milieu de culture provoquant la formation de cals, et contenant de l'ANA (5.10^{-5} M), de la kinétine (10^{-7} M) et de l'inositol (100 mg.l⁻¹).

Afin d'étudier les seuls effets des conditions d'éclairement sur l'activité des peroxydases, nous avons choisi un milieu de culture simple dépourvu de régulateurs de croissance.

Les résultats de l'article I vont donc nous permettre de voir comment la lumière et l'obscurité influencent les activités peroxydasiques. Ces dernières étant corrélées au processus de catabolisme auxinique et de lignification, des investigations sur les activités auxine-oxydase et syringaldazine-oxydase ainsi que des déterminations de teneurs en lignine ont été effectuées.

Nous avons alors montré, que des explants racinaires de chicorée cultivés en lumière continue avaient une masse de matière fraîche, des teneurs en lignine et en chlorophylles plus élevées que ceux cultivés à l'obscurité totale. Des valeurs intermédiaires ont été trouvées quand les conditions d'éclairement étaient inversées après 6 jours de culture. Les activités peroxydasiques ont été mesurées à partir de fluide apoplastique avec comme co-substrat, le gaïacol, l'AIA et la syringaldazine. Il y avait alors une relation inversée entre l'activité spécifique auxine-oxydasique et la croissance des explants. L'activité spécifique syringaldazine-oxydase était quant à elle corrélée positivement aux teneurs en lignine. Des analyses par isoélectrofocalisation ont montré que le fluide apoplastique contenait des isoperoxydases acides et basiques, lesquelles voyaient leurs expressions varier selon les conditions d'éclairement. Par exemple, l'isoperoxydase de pI 7,0 n'était exprimée que lorsque les explants étaient cultivés 12 jours à l'obscurité. Quand les explants étaient cultivés à la lumière durant les 6 premiers jours, l'activité spécifique syringaldazine-oxydasique et les teneurs en lignine étaient importantes et les isoperoxydases de pI 4,0; 6,6; 7,6 et 8,1 étaient fortement exprimées. Inversement, quand les 6 premiers jours se déroulaient à l'obscurité, l'activité spécifique auxine-oxydasique était importante et les isoperoxydases de pI 4,5; 6,7 et 6,8 étaient plus fortement exprimées. Les isoperoxydases de pI 7,8 et 7,9 étaient fortement exprimées quand les explants étaient cultivés au moins 6 jours à l'obscurité.
En conclusion de cet article une hypothèse fût émise. Les explants répondraient à la blessure créée au moment de la mise en culture, par la mise en place au cours de leur développement, d'une couche cellulaire superficielle lignifiée. Une étude histologique complémentaire a donc permis, d'une part, de voir comment la lumière et l'obscurité influencent la morphologie des explants, et d'autre part, de vérifier grâce à une mise en évidence de la lignine, que ces explants sont bien capables de constituer cette couche cellulaire lignifiée.

2.2 <u>RESULTATS:</u>

Article I (Publié dans Physiologia Plantarum)

Influence of light conditions on development, apoplastic peroxidase activities and peroxidase isoenzymes in chicory root explants

G. Boeuf, B. Legrand and S. Rambour

PHYSIOLOGIA PLANTARUM 000: 000–000. 1999 Printed in Ireland—all rights reserved

Copyright © Physiologia Plarztarum 1999 ISSN 0031-9317

Page

Influence of light conditions on development, apoplastic peroxidase activities and peroxidase isoenzymes in chicory root explants

G. Boeuf, B. Legrand* and S. Rambour

Laboratoire de Physiologie et Génétique Molèculaire Végétales, Bâtiment SN2, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France

*Corresponding author, e-mail: bernard.legrand@univ-lille1.fr

Received 1 February 1999; revised 25 February 1999

Cichoriam intybus L. (cv. Bea) root explants grown in continuous light had a higher fresh weight, lignin and chlorophyll content than explants grown in darkness. Intermediary values were found when the light conditions were switched after 6 days. Peroxidase activities (EC 1.11.1.7) were measured in the apoplastic fluid with guaiacol, indoleacetic acid (IAA) and syringaldazine as substrates. There was an inverse relationship between specific IAA oxidase activity and explant growth. Specific syringaldazine oxidase activity (SSO) correlated with the lignin content. Analysis by isoelectric focusing (IEF) showed that the apoplastic fluid contained both cationic and

Introduction

Various peroxidases (EC 1.11.1.7), located in vacuole, cytosol and cell wall of the plant cell (Siegel 1993), are involved in many physiological processes (Gaspar et al. 1982). They particularly participate in the metabolism of indole-3-acetic acid and in lignification. Several investigators have found a positive correlation between peroxidase and indoleacetic acid (IAA) oxidase activities (Pressey 1990, Quesada et al. 1992, Huang et al. 1997) as well as between peroxidase activity and lignin content (Sato et al. 1993, Ros Barceló 1997). However, peroxidases are isoenzymes whose specific roles have not been fully elucidated. It has been suggested that cationic peroxidase isoenzymes are associated with IAA degradation (Van den Berg et al. 1983, Gaspar 1986) and anionic peroxidase isoenzymes with lignin biosynthesis (Catesson et al. 1986, Gaspar 1986, Sato et al. 1993, Polle et al. 1994). Cell wall peroxidases comprise both anionic and cationic isoenzymes (Morales and Ros Barceló 1997) and are present both as covalent wall-bound and as soluble apoplastic enzymes (Otter and Polle 1997). Peroxidases anionic peroxidase isoforms, whose expression differed according to culture conditions. Isoform isoelectric point (pl) 7.0 was only detectable when the explants were cultured for 12 days in darkness. When explants were grown for the first 6 days in light, SSO and lignin content were high and the isoforms pl 4.0, 6.6, 7.6 and 8.1 were highly expressed. Conversely, when the first 6 days were in darkness, specific IAA oxidase activity was high and the isoforms pl 4.5, 6.7 and 6.8. were most strongly expressed. The isoperoxidases pl 7.8 and 7.9 were strongly expressed when the explants were cultured for at least 6 days in darkness.

involved in lignification have been localized in both the cell wall (Sato et al. 1993) and the free space of the wall (Mäder et al. 1975, Imberty et al. 1985, Polle et al. 1994), whereas the peroxidases implicated in IAA oxidation are reported to be located in the cytosol (Ros Barceló et al. 1990).

The effect of light on peroxidase activity has been investigated (Gaspar et al. 1982), Soluble peroxidase activities increased more in chicory root explants cultured in darkness than in continuous light (Bouazza et al. 1993). These differences were accompanied by modifications in the peroxidase isoenzyme patterns. However, since the growth media were supplemented with growth regulators, it was difficult to determine whether the modifications in the peroxidase isoenzyme patterns were caused by the phytohormones or the light conditions.

Therefore, the aim of our investigation was to study the influence of light and dark periods on development, i.e. on growth, chlorophyll and lignin content, apoplastic proteins, peroxidase activities and peroxidase isoenzymes in *Cicho*-

Physiol. Plant, 000, 1999

1

Abbreviations – LTGA: lignin thioglycolic acid; SAO: specific auxin oxidase activity; SGPOX: specific guaiacol peroxidase activity; SSO: specific syringaldazine oxidase activity

rium intybus root explants cultured on a medium without phytohormones. Peroxidase activities were measured as guaiacol peroxidase, IAA oxidase and syringaldazine oxidase. Syringaldazine was found to be a specific substrate for peroxidases involved in the lignification process (Goldberg et al. 1983). The apoplastic fluid was used as the source of peroxidase to avoid the grinding of tissues that liberate phenolic compounds which inhibit soluble peroxidase activity (Legrand 1977).

Materials and methods

Plant material and growth conditions

C. intybus (cv. Bea) mature roots harvested in the field were peeled and surface sterilized by calcium hypochlorite (70 g 1^{-1}) for 20 min, then rinsed three times with sterile water. The explants (6 mm diameter, 2 mm height) were removed from the vascular cambium and grown in Petri dishes containing 0.01 *M* glucose in addition to the macro and microelements of Heller's medium (Heller 1953) solidified by agar (6 g 1^{-1}). Explants were cultured at 20°C in four different light conditions: (1) 12 days in continuous light (10 W m⁻²); (2) 12 days in total darkness; (3) 6 days in darkness followed by 6 days in light; and (4) 6 days in light followed by 6 days in darkness.

Determination of chlorophyll

Root explants were harvested and ground in acctone 80% (v/v). The suspension obtained was vacuum filtered. After centrifugation (5000 g for 10 min) of the filtrate, total chlorophyll content was measured in the supernatant according to Bruinsma (1963).

Determination of lignin

Root explants were harvested and ground in liquid nitrogen prior to methanol extraction. Relative lignin levels were determined in 50 mg of the alcohol-insoluble residue using the thioglycollic acid method (Bruce and West 1989). The lignin thioglycolic acid (LTGA) formed was dissolved in 10 ml 0.5 M NaOH and the lignin content was expressed as ΔA_{250} .

Extraction of apoplastic washing fluid

Twenty explants were transferred into 20 ml of infiltration buffer (66 mM KH₂PO₄, Na₂HPO₄, pH 6.8). After vacuum infiltration (20 min), the explants were briefly dried, placed into a modified MacrosepTM centrifugal concentrator (Filtron Technology Corporation, Northborough, MA, USA) and centrifuged at 1 000 g for 20 min. The apoplastic washing fluid was recovered and constituted the enzymatic extract.

Protein assay

2

Protein was measured according to Bradford (1976) using the Bio-Rad protein reagent with bovine serum albumin as standard.

Pag

Enzyme assays

Peroxidase activity was measured using two different substrates. Guaiacol peroxidase activity (GPOX) was measured by the absorbance increase at 470 nm during 3 min in 5 ml of the incubation mixture (25°C) containing 3.125 ml phosphate buffer (66 mM KH2PO4, Na2HPO4, pH 6.1), 1.25 ml guaiacol (90 mM), 0.625 ml H_2O_2 (65.2 mM) and 20 μ l of the enzyme extract. Syringaldazine oxidase activity (SO) was measured by the increase in absorbance at 530 nm after 1 min in 4 ml incubation mixture (25°C) containing 2.66 ml phosphate buffer (66 mM KH2PO4, Na2HPO4, pH 7.5), 0.66 ml H_2O_2 (65.2 mM), 0.66 ml syringaldazine (50 μ M) and 20 μ l of the enzyme extract. Measurement of IAA oxidase activity (AO) was carried out in 10 ml reaction mixture (25°C) containing 5.9 ml phosphate buffer (66 mM KH2PO4, Na₂HPO₄, pH 6.1), 1 ml MnCl₂ (1 mM), 1 ml 2.4dichlorophenol (1 mM), 2 ml IAA (1 mM) and 0.1 ml of the enzyme extract. Photocolorimetric determination of IAA was according to Pilet (1957). Enzymatic activities were expressed as specific activity in ΔA_{470} mg⁻¹ protein min⁻¹ for specific guaiacol peroxidase activity (SGPOX), in ΔA_{530} mg⁻¹ protein min⁻¹ for specific syringaldazine oxidase activity (SSO) and in μg IAA destroyed mg⁻¹ protein min⁻¹ for specific auxin oxidase activity (SAO).

Isoelectric focusing gels

Equivalent amounts of guaiacol peroxidase activity were loaded in each well and peroxidase isoenzymes were separated by isoelectric focusing. Electrophoresis was carried out with the LKB multiphor apparatus in the pH range 3.5-9.5 (Ampholine® PAGplate, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) according to the Pharmacia Biotech instruction manual. The pH gradient across the gel was estimated by measuring the pH of portions of the gel diluted in distilled water. The gels were stained for peroxidase activity with 0.04% (w/v) benzidine in acetate buffer (100 mM NaOH, 230 mM CH₃COOH, pH 4.5) and 10% (v/v) H₂O₂ (65.2 mM), rinsed with distilled water, then dried at room temperature and scanned with a Microtek MSF-300G scanner. The proportion of each isoperoxidase was calculated as the band intensity minus the background intensity with a macro developed in our laboratory, used in the public domain NIH Image program (developed at the US National Institutes of Health and available from the Internet by anonymous FTP from zippy.nimh.gov or on floppy disk from the National Technical Information Service, Springfield, VA, part number PB95-500195GEI).

The results of determinations of lignin, chlorophyll, proteins and enzymatic activities were expressed as the mean of three independent replications of three analyses.

Results

Growth of root explants

The growth of the explants cultured in the absence of any growth regulator was characterized, from the third day, by a slight swelling of the cut area, indicating recovered cam-

Apoplastic volume

Apoplastic volume increased more after 12 days in light than in darkness (Fig. 1B). This increase still occurred after transfer from darkness to light but not from light to darkness.



Fig. 1. Effect of light (\Box) and darkness (\bullet) on fresh weight (A), apoplastic volume (B), chlorophyll content (C) and lignin content (D) of chicory root explants. Data are means \pm sD of three independent extractions.

Physiol. Plant. 000, 1999

Chlorophyll content

Light induced an increase in the chlorophyll content whereas in darkness chlorophyll was not synthesized (Fig. 1C).

Lignin content

Lignin content increased more when the explants were in light for 12 days rather than in darkness (Fig. 1D). Similar effects were observed during days 6-12 after the transfers.

Apoplastic proteins

During the 12 days of culture, the apoplastic proteins increased more in light than in darkness (Fig. 2A). The transfer from darkness to light induced an increase in apoplastic proteins whereas transfer from light to darkness induced a decrease in these proteins.

Specific gualacol peroxidase activity

SGPOX increased during the time of the culture (Fig. 2B). This increase was higher in darkness than in light. Moreover, darkness during days 6-12 induced a greater increase than light during the same period.

Specific syringaldazine oxidase activity

SSO increased more when the explants were in light for 12 days than in darkness for the same period (Fig. 2C). Similarly, light during days 6-12 caused a greater increase than darkness during this period.

Specific IAA oxidase activity

SAO during the 12 days of culture was always lower in light than in darkness (Fig. 2D). After 6 days, there was essentially no further increase or, in the case of the transfer from darkness to light, a marked decrease in SAO.

Isoelectric focusing

Apoplastic fluid from 0-, 6- and 12-day-old explants was submitted to isoelectric focusing (IEF) and peroxidase activities were revealed on the gel (Fig. 3). In all the samples tested, the enzyme activities were distributed in two groups according to the isoelectric point (pI). The anodic group comprised isoenzymes of pI ranging from 4.0 to 4.5, and the cationic group comprised isoenzymes of pI ranging from 6.0 to 8.1. Eleven isoforms were revealed. Anodic isoforms (Table 1) represented 89% of the total activity when explants were grown for 12 days in continuous light, but only 70% in explants cultured for 12 days in continuous darkness. These isoforms represented 82 and 83% in explants cultured in 6 days darkness/6 days light and 6 days light/6 days darkness, respectively. Among the anionic isoforms, the pI 4.0 isoform was present under all light conditions, whereas the pI 4.5 isoform was strongly expressed only in explants first grown

3



Fig. 2. Effect of light (\Box) and darkness (\bullet) on apoplastic proteins (A), specific gualacol peroxidase activity (SGPOX) (B), specific syringaldazine oxidase activity (SSO) (C) and specific auxin oxidase activity (SAO) (D) from chicory root explants. Data are means \pm sD of three independent extractions.

for 6 days in darkness. All the cationic isoforms, except isoform pI 7.0 which was only expressed in explants cultured for 12 days in darkness, were detected whatever the light conditions. These isoforms only differed quantitatively according to the light conditions. Thus, isoforms pI 7.8 and 7.9 occurred at a low level in explants grown for 12 days in light and at a high level in explants grown for at least 6 days in darkness. On the other hand, expression of isoforms pI 6.7 and 6.8 was only enhanced when the first 6 days were in darkness. Conversely, the earlier the light period occurred,

4



Fig. 3. Effect of light conditions on the activity of different apoplastic peroxidase isoenzymes from chicory root explants. The get was stained with benzidine/H₂O₂. Lane 1, 12 days light; lane 2, 12 days darkness; lane 3, 6 days darkness + 6 days light; lane 4, 6 days light + 6 days darkness. Each lane was loaded with a sample volume giving a ΔA_{470} of 0.03 min⁻¹.

the higher were the activities of peroxidase isoenzymes pI 6.6, 7.6 and 8.1.

: .

Discussion

In chicory root explants, light induced a greater increase in fresh weight (Fig. 1A), apoplastic volume (Fig. 1B), chlorophyll content (Fig. 1C), lignin content (Fig. 1D), level of apoplastic proteins (Fig. 2A), SSO (Fig. 2C) and anodic isoforms (Table 1) than in the dark. Nevertheless, light induced a smaller increase in both SGPOX (Fig. 2A) and

Table 1. Effects of light conditions on the percentage of both anionic and cationic isoenzymes in total apoplastic peroxidase activity. The results were deduced from scanned isoelectric focusing (IEF) with a macro developed in the laboratory. Data are means \pm sp of three independent analyses.

Light condition	Peroxidase isoenzymes (%)			
· · ·	Anionic	Cationic		
12 days light	89±3	11±3		
12 days darkness	70 ± 1	30 ± 1		
6 days darkness +6 days light	82 ± 1	18 ± 1		
6 days light + 6 days darkness	83 ± 1	17±1		

Physiol. Plant. 000, 1999

Pag

SAO (Fig. 2D) than in the dark. The greater increase in fresh weight in light might be related to more numerous cell divisions than in the dark, in the absence of phytohormones. Thus, the low SAO in light probably allowed the maintenance of a high level of endogenous IAA, which enhanced cellular proliferation and the subsequent increase in the fresh weight of root explants. Moreover, such a proliferation in light should increase the intracellular space, as shown by the increase in the apoplastic volume. In darkness the converse should occur.

The use of either guaiacol/H2O2 or benzidine/H2O2 to stain IEF gels did not reveal any difference between the peroxidase isoenzyme patterns. Moreover, the apoplastic fluid of the chicory root explants contained both anionic and cationic peroxidase isoenzymes (Fig. 3), as also in Norway spruce (Polle et al. 1994). IAA oxidation was shown to be mediated by cationic isoforms (Van den Berg et al. 1983, Gaspar 1986). Indeed, a close relationship between high expression of cationic peroxidase isoenzymes, notably pI 6.8, 7.8 and 7.9, and high auxin oxidase activity was observed when the explants were grown in darkness (Fig. 2D). Isoform pI 7.0 which was only detectable in explants grown after 12 days in darkness, might be related to the IAA catabolism as well. More surprising was the increased expression of the anionic isoform pI 4.5 concomitant with the enhancement of SAO. This peroxidase isoenzyme, which was highly expressed in explants first cultured for 6 days in darkness, could be involved in auxin destruction. Acidic peroxidase isoenzymes were actually shown to oxidize IAA in cell walls as well as in the free intercellular spaces of lupin (Ros Barceló et al. 1989, Ferrer et al. 1992). Therefore, IAA oxidation could occur not only in the cytosol but also in the apoplasm of the plant cell.

Cutting root explants induced cellular activation followed by numerous cell divisions (data not shown). This implies the synthesis of new cell wall material which accounts for the observed increase in the level of apoplastic proteins (Fig. 2A). Of these, syringaldazine oxidase (SSO) (Fig. 2C) could have caused a large increase in lignin content (Fig. 1D), as indicated by the positive correlation between lignin content and SSO. Our data are in accordance with those of Liu et al. (1996) who found a positive effect of light on the lignin content of soybean hypocotyl. In maize coleoptile (Parvez et al. 1997) as in the soybean hypocotyl, deposition of lignin was accompanied by an inhibition of elongation. In chicory explants, cellular proliferation rather than cellular elongation occurred (data not shown) and the lignification of root explants did not impede their growth. According to our data, IAA oxidation and the lignification processes in C. intybus tissues cultivated in light or in darkness are negatively correlated. In light, when the former was inhibited the latter were activated. The converse occurred in darkness.

Anionic peroxidases have been linked to lignification in cell walls of poplar stems (Goldberg et al. 1983, Imberty et al. 1985) and in the apoplastic space of transgenic tobacco and tomato (Lagrimini 1991, Lagrimini et al. 1993). In chicory explants grown in light, both the level of lignin content (Fig. 1D) and the SSO (Fig. 2C) were higher and the anionic isoforms (Fig. 3) accounted for 90% of the total activity. In darkness the lignin content and SSO were low

Physiol. Plant. 000, 1999

and the anionic isoforms accounted for only 70%. Nevertheless, involvement of cationic peroxidases in lignification was reported in Zinnia elegans (Sato et al. 1993), castor bean (Bruce and West 1989) and peach fruit (Abeles and Biles 1991). Moreover, Polle et al. (1994) indicated that peroxidase isozymes with pIs of 7.1 and 8.1 were correlated with lignification in Norway spruce. In chicory explants, isoforms pI 6.6, 7.6 and 8.1 seemed to be involved in lignification. because their activities on IEF gel were higher in light than in darkness.

In cell walls, excreted cationic peroxidases might be retained by electrostatic interactions with pectins, while anionic peroxidases may diffuse through the various cell wall layers (Ferrer et al. 1992). This could explain why, in light and in darkness, the percentage of the cationic peroxidases involved in total activity was lower than that of anionic peroxidases. In light, cell wall formation was high and the interactions between pectin and cationic peroxidase isoforms were increased.

In light-grown explants, synthesis of chlorophyll was induced, which may promote a high metabolic activity. Light also inhibits the peroxidase isoenzymes involved in IAA degradation and stimulates those involved in lignification. Finally, cell proliferation and lignification may constitute a response to wounding induced by the culturing of the explants which produce protective cell layers more rapidly in light than in darkness.

Acknowledgements - We thank R. Roszak (Lab. de Physiologie et Génétique Moléculaire Végétales, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France) for his help during the utilization of the NIH Image and particularly for the development of a measuring macro.

References

- Abeles FB, Biles CL (1991) Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. Plant Physiol 95: 269-273
 Bouazza A, Rambour S, Gaspar T, Legrand B (1993) Peroxidases during the course of callusing and organ differentiation from root explants of Cichorium intybus. Biol Plant 35: 481-489 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quanti-
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254
 Bruce RJ, West CA (1989) Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. Plant Physiol 91: 889-897
 Bruinsma J (1963) The quantitative analysis of chlorophylls a and b
- in plant extracts. Photochem Photobiol 2: 241-249
- In plant extracts. Photochem Photobiol 2: 241-249
 Catesson AM, Imberty A, Goldberg R, Czaninski Y (1986) Nature, localization and specificity of peroxidases involved in lignifica-tion processes. In: Greppin H, Penel C, Gaspar T (eds) Molecu-lar and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. University of Geneva, Geneva, pp 189-198. ISBN 2-88164-001-X
 Ferrer MA, Pedreño MA, Muñoz R, Ros Barceló A (1992) Consti-tution influence of induce of induce of action and provide the second of the second s
- tutive isoflavones as modulators of indole-3-acetic acid oxidase activity of acidic cell wall isoperoxidases from lupin hypocotyls. Phytochemistry 31: 3681-3684
- Gaspar T (1986) Integrated relationships of biochemical and physiological peroxidase activities. In: Greppin H, Penel C, Gaspar T (eds) Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. University of Geneva, Geneva, pp 455-468. ISBN 2-88164-001-
- Gaspar T, Penel C, Thorpe T, Greppin H (1982) Peroxidases 1970-1980: A Survey of their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants. Université de Genève, Genève, pp 1 - 324

5

Pa

- Goldberg R, Catesson AM, Czaninski Y (1983) Some properties of
- syringaldazine oxidase, a peroxidase specifically involved in the lignification processes. Z Pflanzenphysiol 110: 267-279 Heller R (1953) Recherche sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. Ann Sci Nat Bot Biol Veg 14: 1-221
- Huang Z, Jye Ger L, Jye Ger M (1997) Changes of enzyme activity during pollen germination in maize, and possible evidence of lignin synthesis. Aust J Plant Physiol 24: 329-335
- Imberty A, Goldberg R, Catesson AM (1985) Isolation and charac-terization of *Populus* isoperoxidases involved in the last step of lignification. Planta 164: 221-226
- Lagrimini LM (1991) Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. Plant Physiol 96: 577-583
- Lagrimini LM, Vaughn J, Erb A, Miller SA (1993) Peroxidase overproduction in tomato: Wound-induced polyphenol deposi-tion and disease resistance. Hort Sci 28: 218-221
 Legrand B (1977) Action de la humière sur les peroxydases et sur la
- teneur en composés phénoliques de tissus de feuilles de Cicho-
- rium intybus L. cultivés in vitro. Biol Plant 19: 27-33 Liu ZH, Liu HY, Wang HY (1996) Effect of light on endogenous
- Liu ZH, Liu HY, Wang HY (1996) Effect of light on endogenous indole-3-acetic acid, peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase in soybean hypocotyls. Bot Bull Acad Sin 37: 113-119
 Mäder M, Meyer Y, Bopp M (1975) Lokalisation der peroxidase-isoenzyme in protoplasten und zellwänden von Nicotiana tabacum L. Planta 122: 259-268
 Morales M, Ros Barceló A (1997) A basic peroxidase isoenzyme from vacuoles and cell walls of Vitis vinifera. Phytochemistry 45: 229-232
- 229-232
- Otter T, Polle A (1997) Characterisation of acidic and basic apo-plastic peroxidases from needles of Norway spruce (Picea abies, L., Karsten) with respect to lignifying substrates. Plant Cell Physiol 38: 595-602

Edited by P. Nissen

6

- Parvez MM, Wakabayashi K, Hoson T, Kamisaka S (1997) White light promotes the formation of diferulic acid in maize coleoptile cell walls by enhancing PAL activity. Physiol Plant 99: 39-48
- Pilet PE (1957) Dosage photocolorimétrique de l'acide beta-indolyiacétique: Application à l'étude des auxines-oxydases. Rev Gén Bot 64: 106-122 Polle A, Otter T, Seifert F (1994) Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abées* L.). Plant
- Physiol 106: 53-60
- Pressey R (1990) Anions activate the oxidation of indoleacetic acid by peroxidases from tomato and other sources. Plant Physiol 93: 798-804
- Quesada MA, Sánchez-Roldán C, Heredia A, Valpuesta V, Buko-vac MJ (1992) Peroxidase and IAA oxidase activities and peroxidase isoenzymes in the pericarp of seeded and seedless 'Redhaven' peach fruit. J Plant Growth Regul 11: 1-6 Ros Barceló A (1997) Lignification in plant cell walls. Int Rev Cytol
- 176: 87-132
- Ros Barceló A, Muñoz R, Sabater F (1989) Subcellular location of basic and acidic soluble isoperoxidases in Lupinus. Plant Sci 63: 31-38
- Ros Barceló A, Pedreño MA, Ferrer MA, Sabater F, Muñoz R (1990) Indole-3-methanol is the main product of the oxidation (1990) Indole-3-methanoi is the main product of the Galdarion of indole-3-acetic acid catalyzed by two cytosolic basic isoperox-idases from Lupinus. Planta 181: 448-450 Sato Y, Sugiyama M, Gorecki RJ, Fukuda H, Komamine A (1993)
- Interrelationship between lignin deposition and the activities of peroxidase isoenzymes in differentiating tracheary elements of Zinnia. Planta 189: 584-589
- Siegel BZ (1993) Plant peroxidases-an organismic perspective. Plant Growth Regul 12: 303-312
- Van den Berg BM, Chibbar RN, van Huystee RB (1983) A comparative study of a cationic peroxidase from peanut and an anionic peroxidase from petunia. Plant Cell Rep 2: 304-307

Physiol. Plant. 000, 1999

2.3 <u>RESULTATS COMPLEMENTAIRES:</u>

2.3.1 Développement des explants racinaires:

Les explants prélevés à l'emporte pièce (6 mm de diamètre) au niveau du cambium (Cb) de la racine tubérisée sont de couleur blanchâtre (figure 10). Aprés 1 journée de culture de légers changements sont déja visibles. Les explants ne sont plus circulaires, et de plus ceux placés à la lumière montrent une faible coloration verte tandis qu'à l'obscurité ils deviennent légèrement jaunâtres. Après 3 jours, l'expansion de la taille et du volume des explants commence à être bien visible, la lumière induit une franche coloration verte, tandis que l'obscurité augmente le jaunissement. Ces phénomènes de développement et de coloration vont s'accentuer au cours de la culture. Il est à noter que les $11^{ème}$ ou $12^{ème}$ jours sont souvent les moments d'émergence de bourgeons. Cette caulogenèse est plus importante à la lumière qu'à l'obscurité.

2.3.2 Evolution de la lignification:

A partir d'explants racinaires prélevés après 0, 1, 3, 6, 9 et 12 jours de culture en lumière continue ou à l'obscurité totale dans les conditions décrites au chapitre I (cf. matériel et méthodes de l'article I), nous avons mis en évidence la présence de lignine par le test au phloroglucinol/HCl. Des coupes à main levée ont alors été effectuées, et placées dans une solution de phloroglucinol à 2% (p/v éthanol 90°) additionnée de quelques gouttes d'HCl à 50%. Après 10 minutes, lorsque la coloration rouge est stabilisée, les coupes sont photographiées.

Au jour 0 la lignine est localisée dans les vaisseaux de la racine tubérisée (figure 11). Après 1 journée de culture, de la lignine est déja décelée en quelques points sur le pourtour des explants, plus nombreux d'ailleurs à la lumière qu'à l'obscurité. Aprés 3 jours, les dépôts de lignine deviennent plus importants et sont localisés d'avantage à la périphérie de l'explant. Ils restent





Obscurité



Lumière

Obscurité

Figure 10: Evolution de la morphologie des explants racinaires de chicorée après 0,1,3,6,9 et 12 jours de culture à la lumière ou à l'obscurité. Cb = Cambium. Barre = 0,2 cm.





Obscurité



Lumière

Obscurité



Figure 11: Localisation de la lignine après coloration au phloroglucinol/HCl, sur des coupes à main levée réalisées à partir d'explants racinaires de chicorée cultivés 0,1,3,6,9 et 12 jours à la lumière ou à l'obscurité. Barre = 0,2 cm. cependant toujours plus faibles à l'obscurité qu'à la lumière. Cette lignification sur les contours des explants s'accroît progressivement, jusqu'à totalement entourer les explants qui ont passé 9 jours à la lumière et à fortiori ceux qui y sont restés 12 jours. A l'obscurité, cette lignification périphérique totale de l'explant n'est jamais observée même aprés le 12^{ème} jour de culture.

2.4 **DISCUSSION COMPLEMENTAIRE:**

Comme nous pouvons le constater, les explants racinaires répondent à la blessure provoquée lors de leur mise en culture par l'installation progressive d'une couche cellulaire lignifiée périphérique. Cette réponse est relativement rapide puisqu'après seulement un jour de culture de nouvelles cellules lignifiées apparaîssent. Nous pouvons alors supposer que ces dernières jouent le rôle d'une barrière mécanique, celle-ci pouvant être comparée à une cicatrisation. Les coupes montrent aussi que la lignification est plus importante à la lumière qu'à l'obscurité. Cela est peut-être à mettre en relation avec le fait que la production de composés phénoliques, donc de monolignols, est alors plus importante à la lumière qu'à l'obscurité, comme Legrand et al. (1976) l'avaient déjà montrée à partir d'explants de feuille du bourgeon étiolé de chicorée. Cette présence en concentration importante de monolignols, associée à une forte activité syringaldazine-oxydasique, expliqueraient donc la mise en place plus importante de la couche cellulaire périphérique lignifiée à la lumière qu'à l'obscurité.

Pour expliquer la caulogenèse plus importante à la lumière qu'à l'obscurité, nous pouvons émettre l'hypothèse que les explants illuminés soient chlorophylliens. Cela suggère une certaine activité photosynthétique qui induirait, entre autre, la production de quantités plus importantes de sucres nécessaires à la synthèse des pectines, qui, par le biais des peroxydases, seraient responsables de la cohésion intercellulaire des cals. Ces derniers pourront alors s'organiser en méristèmes primaires d'où émergeront des ébauches de bourgeons après 12 jours de culture.

Ces phénomènes de cicatrisation et d'organogenèse, peuvent s'expliquer par le fait que l'explant devient un élément isolé lors de sa mise en culture, et échappe donc aux interactions intercellulaires de la racine tubérisée, tels que les gradients hormonaux. L'explant devient alors autonome, et par le biais des activités auxine-oxydasiques, crée sa propre teneur en auxine endogène, qui induit des signaux intervenant sur la prolifération cellulaire. La majorité de ces cellules se retrouvant à la surface de l'explant se différencient en cellules lignifiées, tandis que certaines d'entre-elles s'organisent en méristème. Les deux phénomènes de cicatrisation et d'organogenèse semblent donc corrélés, et sont accompagnés d'activités syringaldazine-oxydase et auxine-oxydase assez importantes, dûes aux peroxydases. Chez les explants racinaires de chicorée, les peroxydases seraient donc des marqueurs biochimiques, qui, en cas d'activités importantes, pourraient traduire la mise en place de la différenciation des cellules.

CHAPITRE IL

3.1 INTRODUCTION:

Ayant établi, à partir de milieux de culture sans régulateur de croissance, l'influence des conditions d'éclairement sur les activités auxine-oxydasique et syringaldazine-oxydase ainsi que sur l'expression des isoperoxydases et sur les quantités de lignine et de chlorophylles (cf. chapitres I), nous nous sommes alors demandé comment évolueraient ces différentes activités et teneurs si un composé auxinique était ajouté aux milieux de culture d'explants cultivés à la lumière ou à l'obscurité. En effet, les auxines dont les différentes actions physiologiques sur les tissus végétaux sont bien connues, interviennent sur l'élongation et la prolifération des cellules cambiales, dans la différenciation d'organes ou encore dans les mécanismes de photo- ou géotropisme. Nous nous attendions par conséquent à observer des changements d'activité peroxydasique. Pour nos expériences, nous avons alors choisi d'ajouter au milieu de culture de base (cf. chapitre I) une auxine de synthèse, l'ANA (acide naphtalène-acétique), qui, à l'inverse de l'AIA n'est ni dégradée par les peroxydases ni par la lumière.

Le matériel et les méthodes utilisés ainsi que les résultats obtenus et la discussion qui en découle sont exposés dans l'article II.

Nos résultats ont montré que l'ANA a un impact important sur la croissance d'explants racinaires de chicorée cultivés 12 jours à la lumière ou à l'obscurité. Ces effets incluaient la diminution des teneurs en lignine et en chlorophylles ainsi que la baisse d'activités peroxydasiques, telles que la gaïacol-peroxydase, l'AIA-oxydase et la syringaldazine-oxydase, aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité. Nous avons observé une relation positive entre l'activité spécifique syringaldazine-oxydasique et les teneurs en lignine alors que l'activité spécifique AIA-oxydasique et les poids frais étaient négativement corrélés. L'ANA augmentait l'expression des isoperoxydases cationiques, et plus particuliérement celle d'un pI de 8,9 (Cicpx) pour des concentrations d'ANA plus faibles à l'obscurité qu'à la lumière. L'implication de la voie de Shemin ou de Beale, dans la biosynthèse des chlorophylles ou des peroxydases, selon les conditions de culture, a été discutée.

Une étude histologique complémentaire viendra étayer les résultats inclus dans cet article II.

3.2 <u>RESULTATS:</u>

Article II (soumis à Physiologia Plantarum)

Effects of NAA on the development, apoplastic peroxidase activities, peroxidase isoenzymes, chlorophyll and lignin contents in chicory root explants.

G. Boeuf, B. Legrand and S. Rambour

ABSTRACT

NAA had a significant impact on the growth of chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Bea) root explants cultured 12 days in light or in darkness. Its effects include the reduction of both the chlorophyll and lignin contents and peroxidase (EC 1.11.1.7) activities as guaiacol peroxidase, auxin oxidase and syringaldazine oxidase in light as well as in darkness. There was a positive relationship between the specific syringaldazine oxidase activity and the lignin content whereas the specific IAA oxidase activity and the fresh weight were negatively correlated. NAA enhanced the expression of cationic isoenzyme peroxidases, and particularly isoenzyme peroxidase pI 8.9 (Cicpx), at weaker concentrations in darkness than in light. The implication of both Shemin and Beale pathways in the synthesis of tetrapyrrole-containing compounds, i.e. chlorophylls and peroxidases, according to the culture conditions is discussed.

INTRODUCTION

Chlorophylls and peroxidases are tetrapyrrole-containing compounds, their last common intermediate is the protoporphyrin IX. Aminolevulinic acid is the common precursor of chlorophylls and hemes (Beale and Weinstein 1990), and it may be synthesized by two pathways. The Beale's pathway, found in higher plants, occurs in chloroplasts and is responsible for chlorophyll biosynthesis. The other, called Shemin's pathway, localized in mitochondria, is generally observed in bacteria, yeasts and animals.

We have found an inverse relationship between guaiacol peroxidase activity and the chlorophyll content in chicory root explants cultured under different light conditions (Boeuf et al. 1999), and with the same species, Bouazza and Legrand (1993) showed that NAA may play a role in organ differentiation. Peroxidases are involved in several processes such as auxin oxidation (Normanly 1997) and lignification (Ros Barceló 1997). The aim of this investigation was to determine the effects of NAA on the chlorophylls and the lignin contents, on guaiacol peroxidase, auxin oxydase and syringaldazine oxidase activities and also on peroxidase isoenzyme patterns.

Abbreviations - Cicpx: Cichorium intybus cationic peroxidase pI 8.9; NAA: 1-naphtalene acetic acid; SAO: specific auxin oxidase activity; SGPOX: specific guaiacol peroxidase activity; SSO: specific syringaldazine oxidase activity

MATERIAL AND METHODS.

Explants of mature *Cichorium intybus* L. (var Bea) roots harvested in the field were cultured on Heller's medium (1953) supplemented with 0.01 M glucose and 10⁻⁶, 10⁻⁵ or 10⁻⁴ M NAA. After 12 days of culture, in light or in darkness at 22°C, sixty explants were harvested. Thirty were used, after lyophilisation, for the determination of their water content. Using the remaining thirty explants, guaiacol peroxidase (GPOX), syringaldazine oxidase (SO) and auxin oxidase (AO) activities were measured, after extraction of the apoplastic washing fluid, as previously described (Boeuf et al. 1999). The level of apoplastic proteins was measured according to Bradford (1976) using the Bio-rad protein reagent with bovine serum albumin as a standard. Both the lignin (Bruce and West 1989) and the chlorophylls (Bruinsma 1963) contents were also determined.

The isoenzyme peroxidase pattern was carried out by isoelectric focusing gels. Each lane of the IEF (ampholine[®] PAGplate, pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) was loaded with a sample volume displaying a Δ A470 of 0.03 min⁻¹. The gel was stained with benzidine/H₂O₂ (Boeuf et al. 1999).

The remaining explants were cultured for a total of 30 days to determine specific morphogenetic events, such as adventitious bud and root formation or callus proliferation.

Handmade sections were carried out on explants at day 0 and at day 12 in light at the different NAA concentrations. Lignin was stained using phloroglucinol/HCl dye. The sections were soaked 10-15 min in 2% phloroglucinol (w/v) in 95% ethanol added with 50% HCl (v/v). Lignin appeared pink-red stained.

47



Figure 1: Effect of NAA on fresh weight (A), water percentage (B), chlorophyll content (C), lignin content (D) and apoplastic volume(E) of chicory root explants cultured 12 days in light (\Box) or in darkness (\blacksquare). Lane 1, day 0; lane 2, NAA 0 M; lane 3, NAA 10⁻⁶ M; lane 4, NAA 10⁻⁵ M; lane 5, NAA 10⁻⁴ M. Data are means ± SD of three independent extractions.

RESULTS

Development of root explants

After 12 days of culture, the fresh weight (Fig. 1A) was always higher in explants illuminated than in those growing in darkness. Moreover, whatever the light conditions, the fresh weight increased progressively in the presence of NAA up to a concentration of 10^{-5} M, but decreased at 10^{-4} M. The percentage of water increased progressively when increasing NAA concentrations were applied (Fig. 1B), the values were greater in light than in darkness. Four days after the initiation of the culture, chicory root explants produced calli (data not shown). Their colour and their texture varied according to the growth conditions during the course of the culture. After 12 days in light, the control produced green, compact and small calli. Gradually, as NAA concentrations increased, the calli were increasingly yellow, friable and expanded. Concentration of 10^{-4} M induced less developed calli. In darkness, callus textures were identical as described above and all the calli were white. The explants underwent organogenesis (data not shown). When cultured on a medium without NAA, they produced adventitious buds emerging around the 14th day. In the presence of 10^{-6} M NAA, neoformed roots emerged from the 20th day. No organogenesis was observed after the 30th day in presence of 10^{-5} M and 10^{-4} M NAA.

Chlorophyll and lignin contents and apoplastic volume.

All the morphological differences described above were accompanied by a loss of the chlorophyll content (Fig. 1C), particularly when the NAA concentration was increasing. Of course, in darkness chlorophyll was not detected. The lignin content (Fig. 1D) of explants cultured in light as well as in darkness, decreased progressively with increasing NAA concentrations. The apoplastic volume (Fig. 1E) increased with the fresh weight, increasing with the softness of the calli.



Figure 2: Effect of NAA on apoplastic proteins (A), SGPOX (B), SAO (C) and SSO (D) of chicory root explant cultured 12 days in light (\Box) or in darkness (\blacksquare). Lane 1, day 0; lane 2, NAA 0 M; lane 3, NAA 10⁻⁶ M; lane 4, NAA 10⁻⁵ M; lane 5, NAA 10⁻⁴ M. Data are means ± SD of three independent extractions.

Apoplastic proteins and specific guaiacol peroxidase, syringaldazine oxidase and auxin oxidase activities.

Expressed as unit volume, the apoplastic protein content decreased when NAA concentrations increased in light as well as in darkness (Fig. 2A). Whatever the NAA concentration, SGPOX (Fig. 2B) and SAO (Fig. 2C) were always lower in light than in darkness. Conversely, SSO (Fig. 2D) was higher in light than in darkness. Increasing NAA concentrations induced a drastic decrease of the three enzyme activities.

Isoelectic focusing

Using either guaiacol/H₂O₂ or benzidine/H₂O₂ to stain the gel, no difference in the patterns were observed (Fig. 3). The isoenzymes were distributed in two groups according to their isoelectric point (pI). The anionic group comprised isoenzymes of pI ranging from 4.0 to 4.5 and the cationic group comprised isoenzymes of pI ranging from 6.0 to 8.9. Expression of cationic peroxidase isoforms was considerably enhanced at the expense of anionic peroxidase isoforms, in light as well as in darkness, when NAA concentrations increased. Supplying NAA induced the expression of the peroxidase isoenzyme pI 8.9 (Cicpx). After 12 days of culture on the medium supplemented with NAA 10^{-4} M the Cicpx represented 49% and 51% of the total activity in light and in darkness respectively (Table 1).

Histochimical localization of lignin

At day 0 lignin was observed in the tracheids of the explant (Fig. 4). After 12 days of culture in light and without NAA, lignin was localized in the tracheids and in a thin peripheric layer of the explants. When increasing NAA concentrations were applied, the staining at the level of tracheides progressively decreased. At 10^{-6} M NAA, the lignified peripheric layer was very reduced, and was absent at 10^{-5} M and 10^{-4} M NAA. In darkness, the same patterns of lignin localization were observed (data not shown).

49



Figure 3: Effect of NAA on the activity of different apoplastic peroxidase isoenzymes from chicory root explants cultured 12 days in light (\Box) or in darkness (\blacksquare). The gel was stained with benzidine/H₂O₂. Lane 1 and 5, NAA 0 M; lane 2 and 6, NAA 10⁻⁶ M; lane 3 and 7, NAA 10⁻⁵ M; lane 4 and 8, NAA 10⁻⁴ M. Each lane was loaded with a sample volume giving a ΔA_{470} of 0.03 min⁻¹.

Table 1: Effect of NAA on the percentage of anionic, cationic and Cicpx isoenzymes involved in total apoplastic peroxidase activity from chicory root
explants cultured 12 days in light or in darkness. The results were deduced from scanned IEF with a macro developed in our laboratory. Data are means ±
SD of three independent analyses.

Light conditions	Light			Darkness				
NAA (M)	0	10-	10-5	104	0	10-6	10-5	10-4
Anionic isoperoxidases (%)	89 ± 3	77 ± 1	30 ± 2	15 ± 1	70 ± 1	66 ± 2	27 ± 4	8±1
Cationic isoperoxidases (%)	11 ± 3	23 ± 1	70 ± 2	85 ± 1	30 ± 1	34 ±2	73 ± 4	92 ± 1
Cicpx (%)	0 ± 0	0.6 ± 0.3	4 ± 0.3	49 ± 1	0 ± 0	6±1	19 ± 2	51 ± 1



DISCUSSION

The development of the callus, due to the reactivation of the cambium, was strongly influenced by NAA. Concentrations of 10⁻⁶ M and 10⁻⁵ M allowed a remarkable increase in fresh weight whereas a concentration of 10⁻⁴ M seemed to be toxic evidenced by the decrease of fresh weight. The patterns of water content with respect to NAA concentrations suggested that NAA enhanced water uptake provoking cell enlargement (Hackett and Thimann 1952). This increase in biomass influenced by NAA could be explained by differences in endogenous auxin levels in the chicory root explants. NAA induced a decrease of the SAO leading to a lower destruction of endogenous auxin levels in explants. Concomitantly, increasing NAA concentrations diminished both the SSO and the lignin content. Thus, in chicory root explants, the positive correlation often described between the syringaldazine oxidase activity and the lignin biosynthesis (Sato et al 1993, Ros Barceló 1997) was also evidenced. This decrease of the lignin content could be visualized in the explants by the progressive reduction of the peripheric lignified thin layer. This layer may be a response against wounding induced by culturing as previously suggested in chicory root explants cultured without NAA (Boeuf et al. 1999). Therefore, NAA could be a factor impeding the normal processes of healing. Indeed, Akin et al. (1987) in bermuda grass stems suggested that lignin acts as an intercellular cement. These variations in tissue coherency could explain the changes of friability observed in the calli when the NAA concentrations were increased in light as well as in darkness. On chicory root explants cultured without NAA, bud neoformation occurred, whereas in the presence of 10⁻⁴ M NAA no adventious buds or roots were neoformed. Our results could be compared with those of Bisbis et al. (1998) on habituated sugarbeet callus which were not organogenic. Moreover, chicory explants were also deficient in both chlorophyll and lignin content and in hemic enzymes, such as IAA oxidase or peroxidase involved in the lignification process. In chicory root explant cultured in presence of NAA, this absence of tissular organization represented by anarchic cellular proliferation, weak adhesion between cells and poor lignin content may explain the loss of organogenic totipotency.

At the beginning of the culture, the explants were non-chlorophyllous. In light and without NAA, the explants became chlorophyllous implicating the differentiation of the proplasts into chloroplasts. The level of chlorophyll was less important when increasing NAA concentrations were applied. We suggest that in chicory explants NAA impede differentiation of proplasts into chloroplasts resulting in low chlorophylls synthesis. These results are in accordance with Yoshida and Komae (1992) who showed that exogenous auxin-induced extensive cell division and callus proliferation was preceded by dedifferentiation and disorganization of explant tissues. This reduction of chlorophyll content was accompanied by a decrease of the peroxidase activities i.e. SGPOX, SAO and SSO. In light, NAA seemed to inhibit the synthesis of the tetrapyroll-containing compounds. Chlorophylls are synthesized in chloroplast by the Beale's pathway (Bisbis et al. 1998), thus NAA seems to act negatively on this pathway probably involving the decrease of peroxidase synthesis. In darkness, no chloroplasts were differentiated, thus the Beale's pathway could not occur. Mäder et al. (1981) showed in nonchlorophyllous suspension culture of tobacco that the Shemin's pathway was able to participate in the porphyrin biosynthesis. In darkness, the enhancement of the cationic peroxidase isoenzymes involved in the total apoplastic peroxidase activity confirms this hypothesis. Indeed, Chibbar and van Huystee (1986) showed that in non-chlorophyllous peanut cells the participation of the mitochondrial Shemin's pathway in the synthesis of hemes for cationic peroxidase. In light as well as in darkness, the presence of NAA increased the proportion of the cationic peroxidase isoenzymes, thus NAA could have a inhibitor effect more effective on the Beale pathway than on the Shemin's pathway. However, in both light and darkness conditions and in presence of NAA, the tetrapyrrolle-containing compounds, i.e. chlorophylls and peroxidases, decreased showing that NAA inhibited both Beale's and Shemin's pathways. This hypothesis could be tested by the use of inhibitors of these porphyrin pathways. The remarkable increase of Cicpx remains unclear for the moment. However we suggest that this peroxidase isoenzyme may be synthetized by the Shemin's pathway. The purification and the characterization of this peroxidase isoenzyme is the next step in our understanding of its role(s).

REFERENCES

Akin DE, Rigsby LL, Barton FE, Gelfand P, Himmelsbach DS, Windham WR (1987) Influence of delignifying agents on tissue structure in bermudagrass stems. Food Microstructure 6: 103-113

Beale SI, Weinstein JD (1990) Tetrapyrrole metabolism in photosynthetic organisms. In: Dailey HA (ed) Biosynthesis of heme and chlorophylls. Mc Graw-Hill, New York, pp 287-391

Bisbis B, Kevers C, Penel C, Greppin H, Gaspar T (1997) Coexistence of the Beale and the Shemin pathways for the biosynthesis of tetrapyrrole-containing compounds, including peroxidases, in a normal sugarbeet callus. In: Penel C, Gaspar T (eds) Plant peroxidase newsletter n°9. University of Geneva, Geneva, pp 13-20

Bisbis B, Kevers C, Penel C, Greppin H, Gaspar T (1998) Biosynthesis of tetrapyrrolecontaining compounds, including peroxidases, in a non-chlorophyllous fully habituated sugarbeet callus via the unique Shemin pathway. In: Penel C, Gaspar T (eds) Plant peroxidase newsletter n°11. University of Geneva, Geneva, pp 19-26

Boeuf G, Legrand B, Rambour S (1999) Influence of light on development, apoplastic peroxidase activities and peroxidase isoenzymes in chicory root explants. Physiol Plant 00: 00-00 (in press)

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254

Bruce RJ, West CA (1989) Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. Plant Physiol 91: 889-897

Bruinsma J (1963) The quantitative analysis of chlorophylls a and b in plant extracts. Photochem Photobiol 2: 241-249

Chibbar RN, van Huystee RB (1986) Site of haem synthesis in cultured peanut cells. Phytochemistry 25: 585-587

Hackett DP, Thimann KV (1952) The nature of auxin-induced water uptake by potato tissue. Amer J Bot 39: 553-558 Heller R (1953) Recherche sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. Ann Sci Nat Bot Biol Veg 14: 1-223

Mäder M, Füssl T, Walker E (1981) On the synthesis of protoheme and peroxidase in suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. Z Pflanzenphysiol 104: 207-216

Normanly J (1997) Auxin metabolism. Physiol Plant 100: 431-442

Ros Barceló A (1997) Lignification in plant cell walls. Inter Rev Cytol 176: 87-132

Sato Y, Sugiyama M, Gorecki RJ, Fukuda H, Komamine A (1993) Interrelationship between lignin deposition and the activities of peroxidase isoenzymes in differentiating tracheary elements of *Zinnia*. Planta 189: 584-589

Yoshida K, Komae K (1992) Cell wall dissociation in the callus development. In sixth cell wall meeting, Sassen MMA, Derksen JWM, Emons AMC, Woltres-Arts AMC (ed), Nijmegen, Holland, 129



Figure 12: Organogenèse d'explants racinaires de chicorée après 25 jours de culture à la lumière continue ou à l'obscurité totale en présence de différentes concentrations d'ANA. Seule la condition sans ANA permet l'apparition de bourgeons.

3.3 <u>RESULTATS COMPLEMENTAIRES:</u>

Cette partie vient compléter par une étude histologique les résultats de l'article II.

3.3.1 Influence de l'ANA sur la morphologie des explants racinaires:

En fonction de la concentration en ANA les explants racinaires montrent des différences morphologiques nettes après 12 jours de cultures à la lumière ou à l'obscurité (figure 13 A et 14 A). Tandis que les explants cultivés sans ANA présentent des cals peu développés, ceux cultivés avec de l'ANA produisent des cals de plus en plus volumineux au fur et à mesure que les concentrations croissent. Cette augmentation du volume des cals se traduit par une friabilité de plus en plus importante des explants. Cependant, à une concentration de 10^{-4} M nous pouvons observer une certaine diminution du volume des cals par rapport à une concentration de 10^{-5} M.

De plus, nous pouvons remarquer qu'une baisse progressive de la coloration verte des explants cultivés à la lumière se produit quand ils sont exposés à des concentrations croissantes en ANA. Par ailleurs, aucune néoformation de bourgeons n'a lieu après 12 jours de culture quelle que soit la concentration d'ANA utilisée (figure 12).

3.3.2 Influence de l'ANA sur la lignification des explants racinaires:

L'ANA inhibe fortement la lignification des explants, aussi bien en présence qu'en absence de lumière (figure 13B et 14B). En effet, si pour les explants cultivés sans ANA l'importance de la couche cellulaire périphérique lignifiée dépend des conditions d'éclairement, cette dépendence s'estompe en présence de concentrations croissantes d'ANA. Cela se traduit par une absence progressive de la couche cellulaire lignifiée à la périphérie des explants.







Figure 13: (A) Aspect général des explants après 12 jours de culture à la lumière sur différentes concentrations (M) en ANA. (B) Coupes transversales et coloration en rouge de la lignine sur ces mêmes explants. Barre = 0,2 cm.


A



Figure 14: (A) Aspect général des explants après 12 jours de culture à l'obscurité sur différentes concentrations (M) en ANA. (B) Coupes transversales et coloration en rouge de la lignine sur ces mêmes explants. Barre = 0,2 cm.

3.4 **DISCUSSION COMPLEMENTAIRE:**

La présence d'ANA dans les milieux de culture induit sur les explants racinaires une importante prolifération cellulaire, une forte baisse d'activité syringaldazine-oxydase et de teneur en lignine (cf. article II). Comme le montrent les coupes, les parois des cellules qui prolifèrent autour de l'explant ne se lignifient pas. Que ce soit à la lumière ou à l'obscurité, l'ANA empêche la mise en place de la couche cellulaire périphérique lignifiée, traduisant donc l'incapacité des explants à produire une couche de cicatrisation, qui est, rappelons-le, produite dans le cas d'explants cultivés en absence d'ANA.

De plus, la présence de ce régulateur de croissance diminue fortement la teneur en chlorophylles des explants (cf. article II), visible par la diminution de la coloration verte, impliquant sans doute une faible activité photosynthétique qui conduirait donc à de très petites quantités de sucres, qui induiraient à leur tour de faibles teneurs en carbohydrates destinés aux parois cellulaires. La grande friabilité des cals peut donc s'expliquer par une prolifération cellulaire très importante des explants racinaires, accompagnée par une faible teneur en polymères pariétaux (Gaspar et al. 1998), ou, comme le suggère Liners et al. (1994) par l'hyperméthylation des pectines. La cohésion intercellulaire devient alors très faible. Contrairement aux explants cultivés sans ANA, ceux cultivés en présence d'ANA montrent donc une adhésion intercellulaire réduite qui peut aussi être dûe aux faibles activités des peroxydases intervenant dans les liaisons entre les pectines.

Par ailleurs, la présence d'ANA empêche la néoformation de bourgeons même après 12 jours de culture. Les cohésions intercellulaires étant très faibles, les cellules seraient donc incapables de s'organiser en méristèmes primaires comme le proposent Le Dily et al. (1998). L'ANA amènerait alors une perte irréversible de la totipotence des cellules en recréant peut-être artificiellement et de façon exagérée les corrélations intercellulaires naturelles qui existent au sein de la racine tubérisée. En effet, la présence d'ANA provoquerait peut-être un déséquilibre hormonal important qui modifierait ou inhiberait les signaux qui dans les conditions témoins

57

permettent, d'une part, la différenciation des cellules en cellules lignifiées, et d'autre part, grâce à la cohésion cellulaire, la formation de méristèmes caulinaires.

L'hypothèse avancée lors du chapitre I, d'une possible corrélation entre les phénomènes de cicatrisation et d'organogenèse, est donc confortée par les résultats obtenus dans ce chapitre II. Nous pouvons avancer l'idée qu'une bonne ou une mauvaise cicatrisation de l'explant au cours des premiers jours de culture, peut respectivement annoncer une forte ou une faible potentialité organogène de ce dernier.

Même s'il est raisonnable de penser que les peroxydases ne sont pas les seules actrices intervenant dans ce manque de différenciation tissulaire, les résultats obtenus dans ce chapitre II confirment l'hypothèse, avancée dans la conclusion du chapitre I, selon laquelle les peroxydases sont de bons marqueurs biochimiques traduisant l'engagement des cellules d'explants racinaires de chicorée vers une différenciation.

CHAPITRE III

4.1 INTRODUCTION:

Depuis déjà quelques années, notre laboratoire a montré que des explants racinaires de chicorée, cultivés à l'obscurité totale durant 12 jours, exprimaient une isoperoxydase basique supplémentaire, appellée isoperoxydase C5, jamais retrouvée à partir d'explants éclairés continuellement pendant 12 jours. Cette mise en évidence se faisait à partir d'extraits bruts de protéines solubles soumis à une électrophorèse sur gel d'amidon. La question qui se posait alors était de savoir si nous étions en présence d'une isoenzyme, donc codée par un gène spécifique de cette isoperoxydase, ou d'une isoforme, qui résulterait de modifications post-transcriptionnelles du produit d'un gène unique. J'ai donc entrepris la purification de l'isoperoxydase C5, dans le but d'obtenir sa séquence en acides aminés afin d'en déduire des séquences nucléotidiques. Celles-ci serviraient alors d'amorces pour l'amplification par PCR d'un fragment du gène correspondant à cette isoperoxydase C5. Des études moléculaires, à partir de cette sonde, nous permettraient alors de départager les deux hypothèses isoforme ou isoenzyme.

Malgré de nombreux essais employant plusieurs techniques de chromatographie, échangeuse d'ions, d'affinité avec la concanavaline A, d'hydrophobicité et de tamisage moléculaire, la complexité de l'extrait brut utilisé n'a pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants. En effet, lorsque des extraits en fin de purification étaient soumis à une isoélectrofocalisation sur gel d'acrylamide, l'isoperoxydase C5 était toujours accompagnée d'autres isoperoxydases de pI très proches. Par contre, des extraits apoplastiques bruts d'explants cultivés en présence d'ANA, et soumis à la même technique d'isoélectrofocalisation, présentaient l'isoperoxydase Cicpx bien séparée des autres isoperoxydases. Ceci nous a donc incité à abandonner la purification de la C5 pour celle de la Cicpx.

La purification d'une protéine étant consommatrice d'énormement de matériel nous étions donc confronté à un nouveau problème: trouver une source importante de cette Cicpx. En effet, si nous choisissions les explants cultivés en présence de faibles concentration en ANA l'activité peroxydasique globale était importante mais l'activité relative de la Cicpx était faible. Par contre,



Figure 15: Suspensions cellulaires de chicorée sous agitation rotative

si nous options pour l'extraction à partir d'explants cultivés sur des milieux contenant de fortes concentrations en ANA, alors l'activité relative de la Cicpx était importante, mais, dans ce cas, l'activité peroxydasique globale diminuait de façon drastique. De plus, quelle que fût la concentration d'ANA choisie, nous étions obligé d'extraire un grand volume de fluide apoplastique afin d'obtenir une quantité importante de Cicpx. Le nombre d'explants racinaires à mettre en culture pour une seule extraction devenait alors extrêmement contraignant. Il était donc intéressant pour nous de trouver une autre source capable de produire la Cicpx. Sachant que cette dernière est fortement exprimée en présence d'ANA, et que la suspension cellulaire de chicorée entretenue au laboratoire (Dubois et al. 1988) (figure 15) nécessite, entre autre, la présence de 5,4 µM d'ANA pour croître, nous avons donc voulu vérifier si ce matériel pouvait servir de nouvelle source de la Cicpx. Comme cette isoperoxydase est apoplastique, nous avons recherché si elle était sécrétée dans les milieux de cultures des suspensions cellulaires. Des essais préliminaires nous ont montré que non seulement les milieux de culture possédaient une activité peroxydasique, mais qu'en plus, la Cicpx s'y retrouvait aussi. La purification et la caractérisation de la Cicpx ont donc été entreprises à partir de cette source facile d'obtention. Le troisième article présente les résultats de la purification obtenus à partir de cette suspension cellulaire de chicorée.

En combinant une précipitation au sulfate d'ammonium, à des chromatographies échangeuses d'ions et de gel filtration, une peroxydase cationique, que nous avons nommé Cicpx, de 34 KDa et de point isoélectrique de 8,9 a été purifiée à partir de milieu de culture de suspension cellulaire de chicorée, avec un bon degré de purification, puisque le RZ final est de 3,5. De plus, cette protéine croise avec des anticorps anti-peroxydases d'épinard. Cependant, son séquençage partiel a montré qu'elle avait un faible taux d'homologie avec d'autres peroxydases végétales. La Cicpx montre une plus forte réactivité pour le gaïacol que les peroxydases acides, par contre elle ne possède aucune réactivité envers la syringaldazine, indiquant qu'elle ne semble pas jouer un rôle dans la lignification.

4.2 **RESULTATS:**

Article III (soumis à Plant Physiology and Biochemistry)

Purification and characterization of a basic peroxidase from the medium of cell suspension cultures of chicory.

G. Boeuf, G. Bauw, B. Legrand and S. Rambour

ABSTRACT

A 34 kDa cationic peroxidase (Cicpx) having a pI of 8.9 was purified to homogeneity (RZ 3.5) from the medium of cell suspension cultures of chicory (*Cichorium intybus* L.) by a combination of ammonium sulphate precipitation, ultrafiltration, ion-exchange and gel filtration chromatography. The partial amino-acid sequence presented, has a low homology with other plant peroxidases. Antibodies against spinach peroxidase were shown to cross react with chicory isoperoxidase on immunoblots. Unlike anionic peroxidases, Cicpx displayed a high reactivity towards guaiacol and no reactivity towards syringaldazine, indicating that Cicpx was not involved in the lignification process. Thus, further investigations are necessary to assign a specific function to this particular isoperoxidase.

Key words: basic isoperoxidase / cell suspension / characterization / *Cichorium intybus* / purification / amino acid sequence analysis.

Abbreviations: CICPX, Cichorium intybus cationic peroxidase / IEF, isoelectrofocusing / NAA, 1-naphtalene acetic acid / RZ, Reinheitzahl value.

INTRODUCTION

Peroxidases (E.C.1.11.1.7) are known to be involved in numerous physiological roles in plant tissues, including lignin biosynthesis [15], indole-3-acetic acid degradation [16, 14], wound healing [9] and pathogen defence [17], in addition, peroxidases are able to oxidize a wide range of molecules at the expense of H_2O_2 . Moreover, in all plant species studied todate, various anionic and cationic isoforms with a pI ranging from 3.5 to 9.5 were found. However, specific roles assigned to the different isoperoxidases have not been fully elucidated. Cationic peroxidases are generally associated with IAA degradation [35, 13] and anionic peroxidases with lignin biosynthesis [7, 33, 31]. Previous investigations in our laboratory from chicory tissues have shown that modifications of culture conditions such as glucose concentrations [23], light conditions [3] or phytohormone treatments [4], induced the emergence or the increase of activity of one or several isoperoxidases. The work described here reports on the purification and the characterization of an isoperoxidase pI 8.9 (Cicpx), isolated from culture medium of suspension culture of chicory, and also found in root explants cultured with NAA (1-naphtalene acetic acid).

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Root explants of chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Bea) were cultured as described by Boeuf et al. [3]. The basal Heller's [19] medium was supplemented with NAA 1.10^{-5} M. Explants were cultured in darkness at $20\pm1^{\circ}$ C for 12 days. Cell suspension cultures of chicory were derived from root tissues and maintained in culture with biweekly subculturing [11]. Subcultures were obtained by diluting 5 g of 14-day-old cells in 200 ml of Murashige and Skoog's medium [27] supplemented with 58.4 mM sucrose, 3.42 mM glutamine, 0.55 mM inositol, 5.4 μ M NAA, 452 nM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 93 nM kinetin. Cells were grown under 12/12 photoperiod condition (1.5 W m⁻²) at 22 $\pm1^{\circ}$ C. Collecting 5ml samples during the time course of the culture, the growth rate was determined by cell counting. Aliquots (100 μ l) of the cell free medium were used to determine the total secreted proteins and the guaiacol peroxidase activity.

Peroxidase extraction

The apoplastic washing fluid was extracted from explants submitted to a vacuum infiltration (20 min) and then centrifuged (1 000 g, 20 min) as previously described by Boeuf et al. [3]. The cell culture medium was filtered twice through Whatman filter paper ($n^{\circ}1$) and was used for purification of Cicpx.

Peroxidase purification

All purification steps were carried out at 4°C. Using $(NH_4)_2SO_4$ precipitation [12] in preliminary assays, no peroxidase activity was found in the resolubilized pellets after 20% and 40% (w/v) salt saturation. Over these values weak activity was measured. Therefore the following protocol was used, $(NH_4)_2SO_4$ was added to the filtrated medium in order to achieve 40% salt saturation

under stirring during 1h. After centrifugation (10 000 g, 20 min) the pellet was discarded and the concentration of $(NH_4)_2SO_4$ was increased in the supernatant to 100% saturation, with stirring overnight. The pellet was collected by centrifugation (10 000 g, 20 min) and dissolved in sodium acetate buffer 0.01M pH 5.0 (buffer A). The resulting mixture was desalted through Sephadex G25 (Pharmacia biotech) gel column (1.5 x 27 cm) equilibrated with buffer A. Active fractions were pooled and first loaded on an ion exchange chromatography CM-Sepharose CL-6B (Pharmacia biotech) gel column (1.5 x 18 cm) equilibrated with buffer A. The active proteins eluted in the flowthrough of the column were stored at -20°C. Bound proteins were eluted using buffer A containing 0.5M NaCl. Active fractions were concentrated and desalted with buffer A by ultrafiltration (Amicon, membrane YM-10, 10,000 MW cut-off) and then loaded onto a second CM-Sepharose CL-6B column (1 x 10 cm) equilibrated with buffer A. The elution was achieved with a NaCl linear gradient (0-0.4M). Fractions containing isoperoxidase pI 8.9 were pooled, concentrated by ultrafiltration, and loaded onto a gel filtration Sephacryl S-100 (Pharmacia biotech) column (2 x 70 cm) equilibrated with buffer A containing 0.5M NaCl. Apparent molecular mass of Cicpx was determinated following the LMW electrophoresis calibration kit instruction manual (Amersham Pharmacia biotech). The purity of the Cicpx was checked by the Reinheitzahl (RZ) value, which is the ratio of the absorbance of the Soret band at 405 nm over the protein absorbance at 280 nm [34].

Electrophoretic analysis

For SDS-PAGE, polyacrylamide slab gels (1mm thick) were prepared as described by Laemmli [22] with a 12.5% acrylamide gel. The first dimension of 2D-PAGE was a nonequilibrium pH gradient electrophoresis (NEPHGE) and was adapted from Boyer et al. [5] except that urea was omitted, Triton X-100 was substituted by water and ampholines (BIO-LYTE[®], BIO-RAD) consisted of 50% pH 5-7 and 50% pH 7-10. The running conditions were performed as previously described by O'Farrell et al. [29]. The second dimension was performed as described by Laemmli [22] using a 12.5% acrylamide gel. Proteins were silver-stained as

described by Blum et al. [2]. Isoelectric focusing (IEF) was carried out with the LKB multiphor apparatus in the pH range 3.5-9.5 (Ampholine[®]PAGplate, Pharmacia Biotech AB, Uppsala Sweden) according to the manufacturer's instruction manual. The pH gradient across the gel was estimated by measuring the pH of portions of the gel diluted in distilled water. The gels were stained for peroxidase activity with 0.04% (w/v) benzidine in acetate buffer (100 m*M* NaOH, 230 m*M* CH₃COOH, pH 4.5), and 10% (v/v) H₂O₂ (65.2 m*M*), rinsed with distilled water, then dried at room temperature and scanned with a scanner Microtek MSF-300G.

Protein determination and enzyme assays

Protein determination was carried out according to Bradford [6], and guaiacol peroxidase activity was measured according to Boeuf et al. [3].

Immunoblot assays

After SDS-PAGE, proteins in the gel were transferred onto a Hybond-C membrane (Amersham) by electroblotting. Peroxidase was immunochemically detected using antibodies raised against peroxidases from spinach [30], and alkaline phosphatase conjugated goat antirabbit IgG (Sigma).

Substrate specificity determination

Kinetic studies were performed at 25°C. Apparent Km for guaiacol was determined at 470 nm in phosphate buffer (66 mM KH₂PO₄, Na₂HPO₄, pH 6.1) containing H₂O₂ (65.2 mM) and various guaiacol concentrations ranging from 0.5 to 55 mM. The Km of H₂O₂ was determined at 470 nm with a reaction mixture composed of phosphate buffer (66 mM KH₂PO₄, Na₂HPO₄, pH 6.1) and guaiacol (90 mM), H₂O₂ was ranging from 1 to 30 mM. The syringaldazine Km was calculated at 530 nm from a reaction mixture containing phosphate buffer (66 mM

 KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , pH 7.5) and H_2O_2 (65.2 m*M*), syringaldazine was employed in a concentration range from 0,5.10⁻³ to 6.10⁻³ mM. The Km was evaluated according to Lineweaver and Burk.

Microsequencing

The peroxidase protein spot was cut out from three identical 2D-gels and concentrated in one band by SDS-PAGE. The mini-gel was blotted onto PVDF membrane, the protein band cut out and in situ digested with trypsin [1]. The eluted peptides were concentrated and desalted on poros beads and finally analysed by nanospray mass spectrometry [36] performed on a LC-Q Ion Trap mass spectrometer (Finnigan MAT, USA).



Figure 1: Isoelectric focusing of isoperoxidases from chicory root explants apoplastic fluid. The explants were cultured 12 days in darkness on Heller'smedium without (A) or supplemented with 1.10^{-5} M of NAA (B). The specific activity for the two conditions are shown. Each lane was loaded with a sample giving a ΔA_{470} of 0.03 min⁻¹ with guaiacol. Gel was stained with benzidine/H₂O₂.

RESULTS

Expression of the Cicpx

NAA (1.10^{-5} M) added to the basal culture medium of chicory root explants caused a decrease of total peroxidase activity and modified isoperoxidase patterns (Fig. 1). NAA promoted a loss of anionic peroxidase activity but induced the expression of two cationic isoperoxidases pI 7.6 and pI 8.9 (Cicpx), which were not detected in the control.

Cell suspension derived from calli, obtained from chicory root explants, displayed an exponential growth with a doubling rate of 7 days when grown with 5.4 10⁻⁶ M NAA (Fig. 2A). As shown in figure 2B the extracellular peroxidase activity progressively increased during the first seven days and more rapidly during the last seven days to reach, at least, a secretion rate of 35. The proteins released in the culture medium increased during the culture period (Fig. 2B) to a secretion rate of 7. On SDS PAGE gel electrophoresis (Fig. 3A) no proteins were detected in the culture medium after the first day of the culture. The first detectable proteins appeared after three days, and all the protein bands were present after 10 days. Their staining intensity increased steadily.

Analysis by IEF of isoperoxidase patterns (Fig. 3B) showed the presence of two cationic isoperoxidases pI 8.4 and pI 8.9 (Cicpx) 24 hours after the onset of the culture. Three days later, an anionic peroxidase pI 4.0 and a neutral peroxidase pI 6.0 were expressed. After 5 days of culture, cationic isoperoxidases pI 8.0 and 8.2 were detected in the culture medium.



Figure 2: (A) growth rate of cells, and (B) secretion rate of extracellular protein $(-\diamond -)$ and extracellular peroxidase activity $(-\bullet -)$ during the culture time of chicory cells suspension. Rate = final value/initial value.

6.0

4.0



Figure 3: (A) SDS-PAGE analysis of proteins and (B) isoelectric focusing analysis of isoperoxidases from chicory cells suspension medium after , (Lane 1)1 day, (Lane 2) 3 days, (Lane 3) 5 days, (Lane 4) 7 days, (Lane 5) 10 days,(Lane 6) 12 days of culture. Proteins were silver-stained. Isoperoxidases were revealed with benzidine/H₂O₂. 150 μ l of medium culture were acetone precipited and resuspended in 40 μ l Na acetate buffer 0.01 M, pH 5.0 before to be loaded on gels. 0.75 μ g, 1.12 μ g,1.65 μ g,1.85 μ g, 2.67 μ g, 3.23 μ g of proteins were loaded in lanes 1,2,3,4,5 and 6 respectively.

Table 1: Purification of the extracellular Cicpx from cell suspension culture medium of Cichorium intybus .

Purification step		Volume (ml)	Total proteins (mg)	Total activity $(\Delta 470 \text{ min}^{-1})$	Specific activity (Δ470 min ⁻¹ mg ⁻¹)	Purification factor	Yield (%)
Filtered medium		2700	8.8	192.8	21.9	1.0	100
Sephadex G25		35	5.5	132.3	24.0	1.1	68.6
First CM Sepharose CL-6B		4	1.5	42.0	28.0	1.3	21.8
Second CM Sepharose CL-6B		2	0.2	8.6	50.8	2.3	4.5
Sephacryl S-100:	Fraction 41	2	0.0100	0.8	80.0	3.5	0.4
	42	2	0.0052	1.2	230.8	10.3	0.6
	43	2	0.0052	1.3	250.0	11.0	0.7
	44	2	0.0063	0.6	95.2	4.6	0.3

Purification of the Cicpx

The purification procedure began by a filtration of the 14 days cell culture medium after cells were discarded. A specific peroxidase activity of 21.9 (Δ 470 min⁻¹ mg⁻¹) was measured (Table 1). After centrifugation of the second ammonium sulphate precipitation (40% to 100% saturation), the pellet was dissolved in acetate buffer 0.01M, pH 5.0 and desalted by chromatography on Sephadex G25. The active fractions, i.e. these showing a peroxidase activity, were pooled, concentrated and loaded on a first ion exchange chromatography column. The anionic isoenzymes found in the first fractions did not bind to the matrix. Bound proteins, including cationic peroxidases, were eluted with 0.5M NaCl buffer. The cationic fractions were pooled, concentrated and washed with acetate buffer 0.01M, pH 5.0 after ultrafiltration to eliminate NaCl before loading on a second ion exchange chromatography column. A specific activity of 28 (Δ 470 min⁻¹ mg⁻¹) was determined (Table 1). A linear gradient of NaCl (0-0.4M) permitted the separation of cationic isoperoxidases into three peaks (Fig. 4A). The first peak contained isoperoxidases with a pI 6.9 to 7.3 displaying a low specific activity (Fig. 4B). The isoperoxidases with a pI 7.9 to 8.1 eluted in the second peak and the third peak contained isoperoxidases with a pI 8.2 to 8.9. This last peak was then concentrated by ultrafiltration. The specific activity of these isoperoxidases was 50.8 ($\Delta 470 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). These concentrated fractions were loaded on a gel filtration Sephacryl S-100 column (Fig. 5A), the elution profile contained 4 peaks, but only one presented peroxidase activity. This peak was collected in 4 fractions (Table 1). The fractions 42 and 43 had a high specific activity around 230 (Δ 470 min⁻¹ mg^{-1}).

Table 2: General characteristics of Cicpx isolated from cell suspension culture medium of *Cichorium intybus*. A comparison was established with the anionic peroxidases isolated from the same culture medium. nd= not determined.

Fraction	$RZ(A_{405}/A_{280})$	Molecular	r mass (kDa)	Isoelectric point (pI)		Km (mM)	
		SDS-PAGE	Sephacryl S-100		Guaiacol	H_2O_2	Syringaldazine
41	1.0		<u> </u>				
42	1.5						
43	3.5	34	34	8.9	2.4	3.6	no activity
44	1.0						
Acidic	n.d	n.d	n.d	3.5	8.0	1.2	1.10-3







Figure 4: (A) Elution profile of proteins (--) and peroxidase activity (--) from second ionexchange chromatography (CM Sepharose CL-6B). The column was equilibrated and washed with acetate buffer 0.01 M, pH 5.0. The bound proteins were eluted by a NaCl gradient (0-0.4 M). (B) The isoelectric focusing from these peaks shown the effective separation of the cationic isoperoxidases, (lane 1) fractions 32-38, (Lane 2) fractions 44-50, (Lane 3) fractions 58-67. Gel was stained with benzidine/H₂O₂.





Figure 5: (A) Elution profile of proteins (- -) and peroxidase activity (--) from gel filtration chromatography (Sephacryl S-100). The column was equilibrated and washed with acetate buffer 0.01 M, pH 5.0 containing NaCl 0.5 M. (B) Determination of native Cicpx molecular weight on sephacryl S-100 column calibrated with phosphorylase b (M_r 94,000), albumin (M_r 67,000), ovalbumin (M_r 43,000), carbonic anhydrase (M_r 30,000), trypsin inhibitor (M_r 20,100), α -lactalbumin (M_r 14,400).





A

B

(KDa)



Figure 6: (A) Silver-staining of a SDS-PAGE separation and (B) western-blot analysis of active fractions from gel filtration column. (Lane 1 and 6) molecular weight markers, (Lane 2) fraction 41, (Lane 3) fraction 42, (Lane 4) fraction 43, (Lane 5) fraction 44. 0,15 μ g of proteins were loaded in each lane.

Peptide 1 A T I/L Q I/L E G F Κ х Peptide 2 V I/L Q T K F Ν Q Q G Α Κ D Peptide 3 V V А V S I/L P R Peptide 4 V F D Е D Q S R х

Figure 7: Identified amino acid sequences of the cationic peroxidase pI 8.9 isolated from the medium of cell suspension cultures of chicory. x: non identified residue or combination of amino acid residues; I/L: Ile or Leu, both have the same mass.

Peptide 1

Cichorium intybus	GATL - OLE	F
Armoricana rusticana	GASLIRLH	F
Arachis hypogaea	GASLLRLH	F
Nicotiana tabacum	GAKIIRLH	F
Nicotiana sylvestris	AASLIRLH	F
Solanum tuberosum	GASLIRLH	F

Peptide 2

Cichorium intybus	F	- N	QQ	A K	DGVLQT
Armoricana rusticana	F	ΑΝ	LQ	S N	NGLLQS
Arachis hypogaea	F	S N	LR	NR	RGVLQS
Nicotiana tabacum	F	ΤN	LQ	S N	QGLLQT
Nicotiana sylvestris	F	ΚN	LI	QK	KGLLQS
Solanum tuberosum	Y	D N	LN	ΝN	QGIMFS

Figure 8: Amino-acid sequence of the N-terminal region of the two peptides of *Cichorium intybus*, compared with sequences of *Armoricana rusticana*, *Arachis hypogaea*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana sylvestri*, *Solanum tuberosum*. Amino acids identical to those in Cicpx are shaded.

Characterization of the Cicpx

The characteristics of the isoperoxidase pI 8.9 (Cicpx) are summarized in table 2. The apparent molecular mass of this isoperoxidase is approximately 34 KDa as estimated from gel filtration chromatography (Fig. 5B) and silver-stained SDS-page analysis (Fig. 6A). Calculations of the purity coefficient (A405/A280) of the fractions 41, 42, 43, 44 gave RZ values of 1.0, 1.2, 3.5 and 1.0 respectively. The substrate and cosubstrate specific affinities of the pooled fractions 41, 42, 43, 44 have been measured and compared to those of acidic peroxidases isolated from the first ion exchange chromatography (Table 2). The apparent Km values of the Cicpx for guaiacol and H_2O_2 were respectively 2.4 mM and 3.6 mM whereas no activity was detected with syringaldazine. A very high activity to syringaldazine was found (Km: 1.10⁻³ mM) for acidic peroxidases which showed a weaker activity to guaiacol (Km: 8.0 mM) and higher reactivity to H_2O_2 (Km: 1.2 mM) than Cicpx. The Cicpx cross reacted with an antibody raised against spinach peroxidase (Fig. 6B).

Sequence determination of the Cicpx

This Cicpx was purified by 2D-gel electrophoresis and after concentration digested with trypsin. Mass spectrometric analysis of the generated peptides, resulted in the determination of four partial amino acid sequences (Fig. 7). Only two of these sequences can be fitted within the amino acid sequences of known peroxidases (Fig. 8).

DISCUSSION

Release of peroxidase have been found in media of cultured cells from horseradish [37], peanut [21], sycamore [8] or pepper [32]. Because these media generally contain a low level of protein and exhibit a high specific peroxidase activity, they have been used for purification studies. Cicpx (pI 8.9), expressed in apoplast from chicory root explants treated with NAA, was also present in the cell suspension culture medium of chicory. This latter, being, by its volume, a larger source of peroxidase than the extracellular washing fluid of root explants, was choosen to purify this isoperoxidase pI 8.9. The RZ value for most of pure peroxidase enzymes is about 3 [25], according to the RZ value of about 3.5 measured in fraction 43, the purification to homogeneity of the Cicpx has been realized. As it cross reacted with the antibodies raised against spinach peroxidases, the Cicpx probably belongs to the peroxidase family. By gel filtration chromatography and silver-stained SDS-PAGE electrophoresis, the apparent molecular mass of Cicpx was estimated around 34kDa. The Cicpx showed characteristics very close of those found with another already purified extracellular plant isoperoxidases from barley intercellular washing fluid [20], flax cell-culture medium [10], tobacco cell-culture medium [28], bilberry cell-culture medium [26] and periwinkle blue cell-culture medium [24]. Contrary to anionic extracellular peroxidases of chicory, Cicpx was unable, like peroxidases purified from bilberry [26] and periwinkle blue [24], to oxidize syringaldazine. The oxidation of this lignin monomer analog has been correlated with lignification [18]. Thus peroxidases excreted in the extracellular compartment are not always involved to the cell wall lignification. The physiological significance of these results needs further studies to be elucidated. Sequence analysis of the purified Cicpx resulted in the determination of only four sequences. This is probably due to the compact structure of peroxidases, which are also known to be very resistent to proteolytic cleavage. The amino-acid sequences of two peptides showed a low percentage of homology with amino-acid sequences from other plant peroxidases, approximately 55% for peptide 1 and 46% for peptide 2. Because peptide sequence information has been obtained from Cicpx it will may be possible to identify and isolate the cDNA corresponding to this

isoperoxidase. This cDNA could be a tool to assess whether the expression of Cicpx is due to a neosynthesis or to a post-transcriptional modifications.

Acknowledgments. The authors thank Dr C. Penel (Université de Genéve Switzerland) for provinding the antibody against spinach peroxidases.

REFERENCES

- [1] Bauw G., Van Damme J., Puype M., Vandekerckhove J., Gesser B., Ratz G.P., Lauridsen J.B., Celis J.E., Protein-electroblotting and -microsequencing strategies in generating protein data bases from two-dimensional gels, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 7701-7705.
- [2] Blum H., Beier H., Gross H.J., Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, Electrophoresis 8 (1987) 93-99.
- [3] Boeuf G., Legrand B., Rambour S., Influence of light conditions on development, apoplastic peroxidase activities and peroxidase isoenzymes in chicory root explants, Physiol. Plant. (1999) in press.
- [4] Bouazza A., Rambour S., Gaspar T., Legrand B., Peroxidases during the course of callusing and organ differenciation from root explants of *Cichorium intybus*, Biol. Plantarum 35 (1993) 481-489.
- [5] Boyer C., Hilbert J.L., Vasseur J., Embryogenesis related protein synthesis and accumulation during early acquisition for somatic embryogenesis competence in *Cichorium*, Plant Sci. 93 (1993) 41-53.
- [6] Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254.
- [7] Catesson A.M., Imberty A., Goldberg R., Czaninski Y., Nature, localization and specificity of peroxidases involved in lignification processes, in: Greppin H., Penel C. and Gaspar T. (Eds.) Molecular and Physiological aspects of Plant Peroxidases, University of Geneva, Switzerland, 1986, pp. 189-198.
- [8] Dean J.F.D., Sterjiades R., Eriksson K.E.L., Purification and characterization of an anionic peroxidase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) cell suspension cultures, Physiol. Plant. 92 (1994) 233-240.

- [9] Diehn S. H., Burkhart W., Graham J.S., Purification and partial amino acid sequence of a wound-inducible, developmentally regulated anionic peroxidase from soybean leaves, Biochem. Biophys. Res. Commun. 195 (1993) 928-934.
- [10] Djiana R., Berthe T., Burel C., Schaumann A., Bruyant P., Balangé A.P., Partial purification and characterization of basic peroxidases from flax cell-culture medium, Plant Physiol. Biochem. 34 (1996) 771-778.
- [11] Dubois T., Droujininski A., Vasseur J., Croissance et potentialités organogènes de suspensions cellulaires de *Cichorium intybus* L. var Witloof, Bulletin de la société botanique de France 135 (1988) 311-322.
- [12] Englard S., Seifter S., Precipitation techniques, in: M.P. Deutscher (Ed.) Methods in enzymomlogy, Protein purification, Academic Press, Inc, 1990, pp. 285-300.
- [13] Gaspar T., Integrated relationships of biochemical and physiological peroxidase activities, in: Greppin H., Penel C. and Gaspar T. (Eds.) Molecular and Physiological aspects of Plant Peroxidases, University of Geneva, Switzerland, 1986, pp. 455-468.
- [14] Gazaryan I.G., Lagrimini L.M., Ashby G.A., Thorneley R.N., Mechanism of indole-3acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases, Biochem. j. 313 (1996) 841-847.
- [15] Goldberg K., Pang A., Rolando C., Francesh C., Catesson A.M., Cell wall peroxidases and lignification: tissue and substrate specificity, in: Lobarzewski J., Greppin H., Penel C. and Gaspar T. (Eds.), Biochemical, Molecular and Physiological aspects of Plant Peroxidases, University of Geneva, Switzerland, 1991, pp. 109-220.
- [16] Grambow H.J., Pathway and mechanisms of peroxidase catalysed degradation of indole-3-acetic acid, in: Greppin H., Penel C. and Gaspar T. (Eds.) Molecular and Physiological aspects of Plant Peroxidases, University of Geneva, Switzerland, 1986, pp. 31-41.
- [17] Hammerschmidt R., Nuckles E., Kuc J., Association of enhanced peroxidase activity with induced systematic resistance of cucumber to *colletotrichum lagenarium*, Physiol. Plant Pathol. 20 (1982) 73-82.

- [18] Harking J.M., Obst J.R., Lignification in trees: indication of exclusive peroxidase participation, Science 180 (1973) 296-298.
- [19] Heller R., Recherche sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro, Ann.Sci. Nat. Bot. 14 (1953) 1-223.
- [20] Kerby K., Somerville S.C., Purification of an infection-related, extracellular peroxidase from barley, Plant Physiol. 100 (1992) 397-402.
- [21] Kossatz V.C., van Huystee R.B., The specific activities of peroxidases and aminovulinic acid dehydratase during the growth cycle of peanut suspension cultures, Can. J. Bot. 54 (1976) 2089-2094.
- [22] Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227 (1970) 680-685.
- [23] Legrand B., Bouazza A., Changes in peroxidase and IAA-oxidase activities during adventitious bud formation from small root explants of *Cichorium intybus* L.: influence of glucose, J. Plant Physiol. 138 (1991) 102-106.
- [24] Limam F., Chahed K., Ouelhazi N., Ghrir R., Ouelhazi L., Phytohormone regulation of isoperoxidases in *Catharanthus roseus* suspension cultures, Phytochem. 49 (1998) 1219-1225.
- [25] Maldonado B.A., van Huystee R.B., Isolation of a cationic peroxidase from cultured peanut cells, Can. J. Bot. 58 (1980) 2280-2284.
- [26] Melo N.S., Cabral J.M.S., Pedro Fevereiro M., Extracellular peroxidases from cell suspension cultures of *Vaccinium myrtillus*. Purification and characterization of two cationic enzymes, Plant Science 106 (1995) 177-184.
- [27] Murashige T., Skoog F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant. 15 (1962) 473-489.
- [28] Narita H., Asaka Y., Ikura K., Matsumoto S., Sasaki R., Isolation, characterization and expression of cationic peroxidase isozymes released into the medium of cultured tobacco cells, Eur. J. Biochem. 228 (1995) 855-862.

- [29] O'Farrell P.Z., Goodman H.M., O'Farrell P.H., High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins, Cell 12 (1977) 1133-1142.
- [30] Penel C., Bernardini N., Greppin H., Production and characterisation of monoclonal antibodies to a cationic peroxidase from spinach leaves, Plant Science 67 (1990) 7-19.
- [31] Polle A., Otter T., Seifert F., Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.), Plant Physiol. 106 (1994) 53-60.
- [32] Pomar F., Bernal M. A., Díaz J., Merino F., Purification, characterization and kinetic properties of pepper fruit acidic peroxidase, Phytochem. 46 (1997) 1313-1317.
- [33] Sato Y., Sugiyama M., Gorecki R.J., Fukuda H., Komamine A., Interrelationship between lignin deposition and the activities of peroxidase isoenzymes in differentiating tracheary elements of *Zinnia*, Planta 189 (1993) 584-589.
- [34] Shannon L.M., Kay E., Lew J.Y., Peroxidase isozymes from horse radish roots. I. Isolation and physical properties, J. Biol. Chem. 241 (1966) 2166-2172.
- [35] Van Den Berg B.M., Chibbar R.N., van Huystee R.B., A comparative study of a cationic peroxidase from peanut and an anionic peroxidase from petunia, Plant Cell Rep. 2 (1983) 304-307.
- [36] Wilm M., Mann M., Analytical properties of the nanoelectrospray ion source, Anal. Chem. 68 (1996) 1-8.
- [37] Yamada Y., Kobayashi S., Watanabe K., Hayashi U., Production of horseradish peroxidase by plant cell culture, J. Chem. Tech. Biotechnol. 38 (1987) 31-39.

4.3 <u>DISCUSSION COMPLEMENTAIRE:</u>

Le fait que la Cicpx montre une faible réactivité envers la syringaldazine, et que son expression augmente lorsque les teneurs en lignine diminuent, laisse supposer que cette isoperoxydase ne semble pas intervenir dans le processus de lignification. D'ailleurs Melo et al. (1995) et Liman et al. (1998) qui ont isolé tous deux une isoperoxydase de point isoélectrique et de masse moléculaire très proches de ceux de la Cicpx ont conclu aussi à une non-participation de cette isoperoxydase dans le processus de lignification.

La Cicpx doit donc jouer un rôle dans un processus physiologique autre que la lignification. Afin de le déterminer, nous pouvons nous interroger sur les conditions à partir desquelles la Cicpx est exprimée. L'ANA, composé commun aux milieux de cultures des suspensions cellulaires et des explants racinaires, provoque l'expression de la Cicpx, et cela, d'autant plus fortement que la concentration utilisée est importante. Nous avons alors émis l'hypothèse, lors du chapitre II, que l'ANA induirait un déséquilibre hormonal, qui augmenterait peut-être la teneur en auxine endogène. La Cicpx aurait alors pour but de rétablir, par son action auxineoxydase, un niveau d'auxine endogène compatible avec le développement normal des explants. Cela laisserait présager que les cellules des suspensions cellulaires et des explants racinaires en présence d'ANA, mettraient alors en place un système capable de dégrader le surplus d'auxine endogène. Cette idée est soutenue par la forte proportion d'isoperoxydases basiques intervenant dans l'activité peroxydasique totale des explants cultivés dans les conditions ANA. En effet, les peroxydases basiques sont souvent citées comme celles présentant une forte spécificité envers le catabolisme auxinique (Gaspar et al. 1982). La Cicpx viendrait donc renforcer la batterie d'isoperoxydases impliquées dans la dégradation de l'auxine endogène, lorsque celle-ci dépasserait un certain seuil critique pour les cellules végétales. Bien que les valeurs d'activité auxine-oxydasique mesurées in vitro semblent faibles pour les fortes concentrations en ANA, il n'est pas évident qu'il en soit de même in situ.

La présence d'oxygène actif ou $d'H_2O_2$ pourrait être un facteur capable de faciliter ou d'activer la dégradation de l'excès d'auxine endogène par les isoperoxydases basiques, et notamment par la Cicpx. En effet, les peroxydases ont besoin de l'un de ces deux composés pour cataboliser

82

l'AIA. Comme nous l'avons déjà vu dans l'article II, les explants racinaires de chicorée cultivés en présence d'ANA, peuvent être comparés aux cals habitués de betteraves (Le Dily et al. 1998) par ces différents points communs: vitesse élevée de division cellulaire, friabilité, déficience de la différenciation des chloroplastes, hyperhydricité et perte de la totipotence organogène. Les cals habitués de betterave présentent des caractéristiques très proches des tissus cancéreux animaux, et parmi ceux-ci un stress oxydatif permanent dû à la présence de radicaux libres, formes toxiques de l'oxygène. De plus, les suspensions cellulaires végétales sont aussi considérées comme étant des systémes productifs d'oxygène actif (Huh et al. 1997). Dans les deux cas, il en résulte l'activation de la superoxyde-dismutase qui génère de l'H₂O₂ au détriment de l'oxygène actif. Cette H₂O₂ pourrait être à son tour éliminé par différentes enzymes telles que la catalase, la glutathion réductase, l'ascorbate peroxydase ou encore la peroxydase (Chang et Kao 1998). Nous pouvons alors postuler que de tels mécanismes se déroulent aussi dans nos explants racinaires et nos suspensions cellulaires cultivés en présence d'ANA. Les quantités élevées d'H₂O₂ favoriseraient alors la dégradation de l'excès d'auxine endogène par les peroxydases et notamment la Cicpx.

CHAPITRE IV
5.1 INTRODUCTION:

Grâce aux séquences polypeptidiques obtenues à partir de l'isoperoxydase Cicpx, la perspective d'avoir une sonde nucléotidique du gène d'une peroxydase de chicorée s'exprimant en présence d'ANA dans le milieu de culture, pouvait alors être envisagée. En effet, les séquences d'acides aminés des 2 polypeptides les mieux conservés ont permis de déduire 2 séquences nucléotidiques fournissant les 2 amorces nécessaires à l'amplification d'un fragment du gène de cette isoperoxydase par PCR. Cependant, la présence de certains acides aminés, tels que la leucine, la sérine ou l'arginine a amené trop d'incertitudes dans le choix des codons, aboutissant alors à la l'élaboration d'amorces fortement dégénérées. D'ailleurs, les PCR menées à partir de ces amorces n'ont donné aucun résultat convaincant, bien que plusieurs paramètres aient été testés: température d'hybridation, teneur en amorce, en ADN génomique... Nous avons donc été obligé de chercher une nouvelle voie permettant l'obtention de l'ADNc de la Cicpx.

Puisque le choix d'utiliser des amorces spécifiques de la Cicpx n'était plus envisageable, nous nous sommes alors tourné vers l'emploi d'amorces spécifiques des peroxydases en général. Cependant, pour augmenter nos chances d'amplifier un ADNc correspondant à la Cicpx, nous avons choisi d'utiliser les ARNm d'explants racinaires de chicorée cultivés en présence d'ANA, qui expriment, comme nous le savons, cette isoperoxydase. De plus, son activité relative peut représenter environ 50% de l'activité peroxydasique totale quand les explants sont cultivés à l'obscurité avec une concentration en ANA de 10⁻⁴ M. Par déduction, en utilisant cette condition, nous nous attendions à ce que les ARNm de cette isoenzyme de peroxydase soient eux aussi présents en quantité plus importante que n'importe quel autre ARNm d'isoenzyme de peroxydase. Nous avons donc mis en oeuvre une amplification selon la technique dite de RT-PCR, à partir des ARNm d'explants racinaires cultivés à l'obscurité en présence d'ANA 10⁻⁴ M, afin d'isoler un ADNc correspondant à la Cicpx.

85

Par conséquent, nous avons d'abord aligné des séquences d'ADNc de peroxydases de plusieurs espéces végétales afin d'en repérer des régions fortement conservées. Le résultat des alignements ne montre pas une très forte homologie entre les différentes espèces. Cependant, une région bien conservée a pu être trouvée (annexe 1) et a servi de première amorce, tandis $qu'un poly(T)_{15}$ a servi de seconde amorce pour l'hybridation avec le poly(A) des ARNm.

Nous espérions alors synthétiser un ADNc spécifique de la Cicpx pouvant servir de sonde nucléotidique, afin de réaliser des études moléculaires, permettant, peut-être, de trancher entre les deux hypothèses isoenzyme ou isoforme.

5.2 MATERIEL ET METHODE:

5.2.1 Extraction des ARN totaux:

Dans un tube Eppendorf contenant 1 ml de Tri ReagentTM (Euromedex) on ajoute 150 à 200 mg de matière fraîche broyée finement. Après un passage au vortex à température ambiante durant 5 minutes, 0,2 ml de chloroforme sont additionnés puis mélangés grâce au vortex durant 15 secondes. Le tube est alors laissé à température ambiante pendant 15 minutes. Après centrifugation (12 000 g x 15 min, 4°C), la phase supérieure, ne contenant que les ARN, est récupérée dans un tube. Afin de précipiter ces ARN, 0,5 ml d'isopropanol sont ajoutés. Après avoir mélangé doucement les deux phases, le tube est laissé à température ambiante durant 10 minutes. Une nouvelle centrifugation (12 000 g x 10 min, 4°C) est alors effectuée permettant de récupérer les ARN sous forme d'un culot blanc. Après élimination du surnageant, le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol à 75% par un passage sur vortex. Afin de récupérer le culot on réalise une nouvelle centrifugation (12 000 g x 5 min, 4°C). Le surnageant est écarté puis le culot restant est légérement séché sous une hotte à flux laminaire. Le culot d'ARN est finalement resuspendu dans un volume minimal d'eau.

5.2.2 Quantification des ARN totaux:

Le dosage des ARN totaux est réalisé à 260 nm. Deux dilutions, l'une au 1/250ème l'autre au 1/500ème, sont effectuées afin de déceler d'éventuelles erreurs de pipetage. La concentration (C) est alors calculée comme suit:

C (μ g/ μ l) = D.O. _{260nm} x 40 x facteur de dilution x 1000

où 40 représente la concentration en ARN en µg par ml pour 1 unité de D.O. 260nm.

5.2.3 Contrôle de la qualité des ARN totaux:

Le contôle de la pureté des ARN se fait par l'intermédiaire d'une électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% (p/v) réalisée avec de l'eau stérile et en présence de 0,7 μ g/ml de bromure d'éthydium (BET), dans un tampon TAE 1X (40mM Tris, 20 mM acide acétique glacial, 1mM EDTA, pH 8). La cuve quant à elle est nettoyée au SDS 20% afin d'éliminer toutes traces de RNase et rincée avec de l'eau stérile. 1 μ g d'ARN totaux est déposé et après 20 à 30 min de migration à 90 Volts le gel est observé sous U.V. L'absence de bandes de haut poids moléculaire correspondant à de l'ADN génomique, l'intensité quasi identique des bandes des ARN ribosomaux 25S, 18S et 5S, et l'absence de traînées dans le gel sont des critères requis pour définir une bonne qualité des ARN extraits.

5.2.4 Purification des ARN messagers:

La purification des ARN messagers se fait à partir de 100 µl d'une solution contenant 75 µg d'ARN totaux. Afin de rompre les structures secondaires on chauffe à 65°C durant 2 min. Dans un tube Eppendorf la solution d'ARN totaux est additionnée de 1 mg de microbilles (dT)₂₅ magnétiques (Dynabeads[®]mRNA Purification Kit) préalablement lavées 2 fois avec le tampon de fixation (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; LiCl 1 M; EDTA 2 mM). Mélanger doucement à température ambiante durant 5 minutes. Le tube est alors placé près d'un aimant attirant vers lui les microbilles et quand la solution devient claire le surnageant est éliminé. Les microbilles sont alors rincées 2 fois avec le tampon de lavage (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; LiCl 0,15 M; EDTA 1 mM). Une fois les microbilles débarrassées du dernier surnageant, 10 µl de Tris-HCl (10 mM) sont ajoutés, puis l'ensemble est soumis à une température de 65°C durant 2 minutes.

Après avoir écarté les microbilles grâce à l'aimant le surnageant, contenant les ARN messagers, est récupéré dans un nouveau tube et conservé à -20°C.

5.2.5 <u>Amplification d'un ADNc par la technique de RT-PCR à partir des</u> <u>ARNm:</u>

Nous avons utilisé le kit Access RT-PCR System (Promega), pour lequel les réactions de transcriptase inverse (RT) et d'ADN polymérase (PCR) se font dans un seul et même tube. Du tampon de réaction 1X, 0,2 mM de dNTP, 1 μ M d'amorce poly (T)₁₅, 1 μ M d'amorce spécifique des peroxydases (5'-CACTTCCACGACTGCTTCGT-3'), 1 mM de MgSO₄, 5 unités d'ADN polymérase et de reverse transcriptase, et 1 μ l d'ARNm (dilué au 1/50^{ème}) sont mélangés afin d'obtenir un volume final de 13 μ l. L'ensemble subit le programme d'amplification suivant: 1 cycle de 1 heure à 48°C permettant l'action de la reverse transcriptase, 1 cycle de 5 minutes à 94°C, 35 cycles de la séquence suivante: 1 minute à 94°C, 2 minutes à 42°C, 45°C ou 50°C, 2 minutes à 68°C et enfin 1 dernier cycle de 7 minutes à 68°C.

Une fois la réaction de RT-PCR terminée, un échantillon est alors soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose afin de déterminer la taille du fragment amplifié. Le reste de la réaction est conservé à -20°C.

The pCR[®]2.1 Vector

Map of pCR[®]2.1

The map of the linearized vector, pCR[®]2.1, is shown below. The sequence of the multiple cloning site is shown with a PCR product inserted by TA Cloning[®]. The inserted PCR product is flanked on each side by *Eco*R I sites. The arrow indicates the start of transcription for the T7 RNA polymerase.



Figure 16: présentation du vecteur pCR[©] 2.1 ayant servit au clonage des ADNc.

5.2.6 Clonage d'ADNc:

Le clonage de fragments obtenus par RT-PCR a été réalisé à l'aide du kit TA Cloning[®] (Invitrogen[®]).

5.2.6.1 Ligation du fragment amplifié dans le plasmide pCR[©] 2.1:

Pour déterminer la quantité en μg (Q) de produit RT-PCR qu'il faudra placer en présence du plasmide pCR[©]2.1 (figure 16), nous utilisons la formule suivante:

Q = (Taille en pb de l'ADNc x 50) / Taille du plasmide pCR 2.1 (3900 pb)

Suivant la concentration du produit RT-PCR, nous préparons le mélange suivant: 1 μ l de tampon de ligation, 2 μ l de vecteur pCR[©]2.1, 1 μ l de ligase, x μ l de produit RT-PCR et 6-x μ l d'H₂O stérile.

L'ensemble est laissé une nuit à 14°C pour permettre la ligation de l'ADNc avec le vecteur.

5.2.6.2 Transformation de la souche bactérienne INVaF':

Le plasmide résultant de la ligation est ensuite utilisé pour transformer des bactéries compétentes "One shotTM" de la souche INV α F' fournies avec le kit TA Cloning[®]. Deux microlitres de 2-mercaptoéthanol (0,5 M) sont mélangés à un stock de 50 µl de suspension bactérienne. Après 30 minutes d'incubation sur glace, 2 µl de la réaction de ligation sont ajoutés aux bactéries qui subissent alors un choc thermique de 30 secondes à 42°C. Le mélange est ensuite placé 2 minutes sur glace avant d'y incorporer 250 ml de milieu SOC (2% tryptone, 0,5% extrait de levure, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10mM MgCl₂6H₂O, 20 mM glucose).

Une heure d'incubation de l'ensemble à 37°C sous agitation rotative (225 rpm) sans agent de sélection va permettre aux bactéries de se multiplier.

5.2.6.3 Sélection des bactéries transformées:

La culture des bactéries sur un milieu LB (10g bactotryptone, 5g bactoyeast extract, 10g NaCl, pH 7,5 QSP 11) gélosé en présence d'ampicilline (50 μ g.ml⁻¹) va permettre de sélectionner les clones bactériens ayant incorporé le plasmide. En présence de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) dans le milieu gélosé, deux phénotypes de colonies bactériennes sont observées: un bleu et un blanc. Le phénotype bleu contient le plasmide sans insert, il peut donc produire la β -galactosidase qui en présence de X-Gal produit un composé bleu. Les clones blancs sont quant à eux sélectionnés car ils contiennent un plasmide dans lequel le fragment amplifié a été inséré au niveau du gène *lacZα*. La β -galactosidase n'est donc pas fonctionnelle et donc incapable de métaboliser le X-Gal.

5.2.6.4 Contrôle des clones bactériens:

Les clones blancs sont prélevés et mis en culture une nuit à 37°C sous agitation rotative (225 rpm) dans 500 μ l de milieu LB additionné de 50 μ g.ml⁻¹ d'ampicilline. Ces clones sont aussi conservés sur boîte de Pétri en milieu LB gélosé contenant la même concentration d'antibiotique. Cinq microlitres de la suspension bactérienne sont incorporés dans 500 ml d'eau. Le mélange est chaufé à 100°C pendant 5 minutes puis laissé 10 minutes à température ambiante. On prélève alors 2,5 μ l pour faire une PCR classique avec les 2 amorces M13. Les clones positifs sont ceux qui, après contrôle sur gel d'agarose 0,8% présentent un fragment de taille identique à celle de l'insert cloné.

5.2.7 Séquençage de l'ADNc:

Le séquençage se fait selon le principe de Sanger. Ce principe utilise l'incorporation de didéoxynucléotides triphosphates (ddNTP) au cours d'une réaction de synthèse du brin complémentaire à l'ADN servant de matrice. Les ddNTP, lors de l'incorporation, bloquent l'élongation du brin complémentaire à la matrice. Disposant d'un séquenceur automatique (LI-COR[®] 4200 IR DNA sequencer), nous avons mis en oeuvre une technique d'élongation à l'aide du kit de séquençage SequiTherm[™] Long-Read[™] Cycle sequencing (Epicentre Technologies) en utilisant les amorces M13 Reverse (5'-CAGGCAAACAGCTATGAC-3') et M13 Forward (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') marqués en 5' par l'ajout d'IRD 800 (MWG-Biotech AG), présentes en amont et en aval du site de clonage du vecteur pCR[®] 2.1 du kit TA Cloning[®].

5.2.7.1 Réaction de séquençage:

Selon le protocole de la firme, un mélange de 17 μ l contenant du tampon de séquençage 1X, 2 pmoles d'amorces marquées, 500 fmoles d'ADN plasmidique et 5 unités d'ADN polymérase (Sequitherm) est réalisé, puis réparti par quantités aliquotes de 4 μ l dans 4 tubes contenant chacun 2 μ l de tampon de terminaison spécifique d'un type de didéoxynucléotide (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP).

L'ensemble subit le programme d'amplification suivant: 1 cycle de 5 minutes à 95°C et 30 cycles répétant la séquence: 30 secondes à 95°C, 30 secondes à 50°C, 1 minutes à 70°C. Ensuite, 3 μ l de tampon de charge sont ajoutés dans chaque tube puis l'ensemble est dénaturé 3 minutes à 95°C.

5.2.7.2 Gel de séparation:

Un gel de 0,2 mm d'épaisseur est réalisé à partir d'une matrice Long RangerTM (FMC) à 3,75% dans du tampon TBE (89 mM Tris, 89 mM acide borique, 2 mM Na₂EDTA) contenant 5 M d'urée. Il subit un prémigration de 20 minutes à 3000 V, 30mA, 75 W à une température de 45°C dans du tampon 0,8X Tbe. Ensuite 1ml de réaction de séquençage préalablement dénaturée est chargé sur le gel et la migration se poursuit pendant au moins 14 heures dans les mêmes conditions.

L'image obtenue est ensuite traitée à l'aide du logiciel Base ImagIR[®] version 4.0 de LI-COR[®]. La séquence déterminée est alors confrontée aux bases de données nucléotidiques sur Internet.



Figure 17: (A) Les 3 fragments amplifiés par RT-PCR à 1) 50°C, 2) 52°C, 3) échelle en pb. (B) Les mêmes fragments amplifiés par la présence unique de l'amorce spécifique des peroxydases 1) Produit RT-PCR, 2) échelle en pb. (C) Fragments obtenus par PCR avec les amorces M13 à partir des clones 2) 1, 3) 2, 4) 3, 5) 4, 6) 5, 7) 6, 8) 7, 1) et 9) échelle en pb.

5.3 **RESULTATS:**

5.3.1 <u>Amplification de trois bandes majeures par la technique de RT-PCR à</u> partir des ARNm d'explants racinaires cultivés en présence d'ANA <u>10⁻⁴ M:</u>

Plusieurs essais ont été réalisés afin de déterminer quelles étaient les conditions optimales pour l'amplification d'un fragment unique.

Les premiers tests ont été réalisés en faisant varier la concentration en ARNm introduite lors de la RT-PCR, tout en gardant la même température d'hybridation lors de l'étape de PCR (42°C). Nous nous sommes alors rendu compte qu'aucune concentration n'était efficace pour l'obtention d'une seule bande, au contraire, à chaque essai une traînée était observable après électrophorèse, traduisant ainsi l'amplification de fragments sur un éventail de tailles très large.

Pour les seconds tests, nous avons augmenté progressivement la température d'hybridation lors de la PCR tout en faisant varier les concentrations en ARNm de départ. Passant par des températures de 45°C, 48°C, 50°C et 52°C il est apparu que les 2 dernières températures en présence d'ARNm dilués au 1/50^{ème} étaient des conditions qui permettaient d'amplifier 3 bandes majeures d'environ 600, 400 et 300 pb (figure 17A). Nous nous sommes alors interrogé sur l'efficacité du poly(T)₁₅ dans cette RT-PCR. En effet, d'une part, les températures utilisées étaient trop élevées pour que cette amorce puisse s'hybrider (Tm = 30-40°C), et d'autre part, si cette dernière avait quand même pu s'hybrider, la taille attendue était alors de l'ordre de 900 à 1000 pb. En effet, l'amorce spécifique des peroxydases se situe dans les 1100 à 1300 pb. Dans ces conditions, seule l'amorce spécifique des peroxydases semblait intervenir dans cette réaction de RT-PCR.

Des résultats identiques, mais qui restaient toutefois surprenants, ont été trouvés lorsque l'amorce spécifique des peroxydases fût utilisée seule sans la présence de l'amorce $poly(T)_{15}$

	Acides nucléiques	Acides aminés
	70	73
Spinacia oleracea	61	57
Phaseolus vulgaris	61	56
Arachis hypogaea	60	55
Lycopersicon esculentum	60	53

Pourcentage d'homologie (%) avecCichorium intybus

Figure 18: Pourcentages d'homologie existant dans les séquences en acides nucléiques et en acides aminés de *Cichorium intybus*, *Glycine max*, *Spinacia oleracea*, *Phaseolus vulgaris*, *Arachis hypogaea* et *Lycopersicon esculentum*. Les valeurs ont été sélectionnées à partir d'alignements réalisés sur FASTA (3.2 december, 1998).

(figure 17B), avec une température d'hybridation de 50°C et des ARNm dilués au 1/50^{ème}. Les ADNc amplifiés dans ces conditions ont donc été choisis afin d'en déterminer les séquences.

5.3.2 Clonages et séquençages des 3 ADNc:

Après clonage des ADNc amplifiés dans la bactérie INV α F' nous avons obtenu 20 colonies blanches. Les tests de contrôle par PCR avec les amorces M13, ont révélé que 7 d'entre-elles avaient effectivement insérées un fragment (figure 17C). Les produits de PCR étant obtenus avec les amorces M13, nous devons enlever environ 165 pb pour connaître la taille réelle de l'insert. L'insert du clone 1 possède une taille d'environ 40 pb tandis que les inserts des clones 2, 3, 4, 5, 6 et 7 ont une taille d'environ 440 pb.

Après séquençage de ces clones, nous nous sommes aperçu que seul l'ADNc du clone 5 possédait une séquence qui présentait une bonne homologie avec celle d'une peroxydase dans les banques de données internationales (Annexe 2). La meilleure homologie (70%) a été trouvée avec la séquence de peroxydase de *Glycine max*. (figure 18). La séquence présente une longueur totale de 407 bases (Annexe 2).

La recherche de la séquence de l'amorce spécifique des peroxydases ayant servi à l'obtention de cet ADNc a été retrouvée entièrement en début de séquence. Par contre en fin de séquence aucune trace de l'amorce n'a pu être décelée (Annexe 2).

Cette séquence d'acides nucléiques a donc été traduite en une séquence de 135 acides aminés qui a ensuite servi pour un nouvel alignement avec les séquences protéiques des espéces précédentes (Annexe 3). De bons pourcentages d'homologies ont aussi été obtenus, c'est ainsi que nous avons trouvé 73% d'homologie entre les séquences de *Cichorium intybus* et de *Glycine max* (figure 18). Quatre régions bien conservées ont été détectées avec des pourcentages d'homologie, entre les différentes espèces, de 87 à 94% pour la région I, de 75 à 80% pour la région II, de 55 à 82% pour la région III et de 59 à 89% pour la région IV (Annexe 3). Nous avons aussi pu mettre en évidence 3 résidus histidines et 5 résidus cystéines qui sont bien conservés dans toutes les séquences de peroxydases.

5.4 **DISCUSSION:**

L'amplification de cet ADNc de peroxydase reste pour l'instant assez inexplicable. En effet, nous ne nous sommes servi que d'une seule amorce, celle spécifique des peroxydases, lors de la réaction de RT-PCR. Les températures d'hybridation utilisées étant élevées, l'amorce doit obligatoirement reconnaître deux séquences complémentaires similaires voire identiques à la sienne. L'étude de la séquence de l'ADNc de peroxydase, montre que l'une des extrémités correspond bien à la séquence de l'amorce utilisée. Nous pouvons donc supposer que l'amorce s'hybride sur le brin complémentaire. A l'autre extrémité de la séquence de l'ADNc de peroxydase nous devrions alors retrouver une séquence complémentaire et inversée proche de la séquence de l'amorce. Malheuresement aucune identité n'est observée entre ces deux séquences. Il manquerait donc la partie de l'ADNc comportant cette séquence inversée complémentaire de l'amorce spécifique des peroxydases.

Ce phénomène peut s'expliquer par la taille des fragments avant et après clonage. En effet, lors de la RT-PCR 3 fragments de 600, 500 et 300 pb ont été amplifiés. Après clonage, les tailles des fragments insérés n'excèdent pas 440 pb. Entre la RT-PCR et le clonage 100 à 200 pb ont été perdues, si nous ne tenons pas compte du fragment de 300 pb qui n'a pas été cloné. Cette perte de 100 à 200 pb est pour l'instant difficilement explicable.

Quoiqu'il en soit, un ADNc de peroxydase, à partir des ARNm d'explants racinaires de chicorée cultivés en présence d'ANA 10⁻⁴ M, a pu être isolé. La présence du régulateur de croissance à cette concentration, entraîne, entre autres phénomènes physiologiques (cf. chapitre II), une augmentation d'une isoenzyme de peroxydase particulière, la Cicpx. Elle représente alors environ 50% de l'activité peroxydasique totale dans l'apoplasme des explants. Il est donc logique de supposer que les ARNm de cette Cicpx constituent la majeure partie des ARNm totaux de peroxydases. Il existe donc une grande possibilité pour que nous ayions cloné un ADNc correspondant à un ARNm de cette Cicpx. Afin de conforter cette hypothèse nous avons essayé de retrouver les 4 polypeptides qui avaient pu être séquencés à partir de la protéine (cf.

chapitre III). Ces derniers n'ont pas été localisés pour l'instant. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette absence. La première serait que le polypeptide déduit de l'ADNc ne représentant qu'environ 1/3 d'une séquence moyenne de peroxydase, les 4 polypeptides pourraient donc se situer dans les 2/3 restants. La seconde serait que l'ADNc cloné et séquencé ne correspondrait pas à celui de la Cicpx.

Les traits caractéristiques d'une séquence de peroxydase sont la présence: de 8 résidus cystéine, d'au moins 2 résidus histidine (Morita et al. 1971; Mazza et Welinder 1980) ainsi que de 4 régions (I à IV) fortement conservées (Yi et al. 1998). Les cystéines interviennent dans les 4 ponts disulfure qui stabilisent la configuration tridimensionelle de la peroxydase. Les domaines histidine distal et proximal, respectivement de la région I et IV, interviendraient dans le site d'attachement à l'hème et dans le site catalytique (Simon 1992, Kerby et Sommerville 1992). La présence, dans la séquence de notre ADNc, de 5 résidus cystéines, de 3 résidus histidines à des places très conservées, et de 4 régions très homologues à d'autres séquences de peroxydase. L'absence de 3 résidus cystéine peut s'expliquer par le fait qu'ils se situent sans doute dans les parties non séquencées de l'ADNc.

La Cicpx est une peroxydase sécrétée puisqu'on la retrouve aussi bien dans les milieux de culture des suspensions cellulaires que dans l'apoplasme des explants racinaires, il existe donc une forte probabilité pour que dans la partie N-terminale manquante se trouve la séquence d'un peptide signal caractéristique des protéines transportées dans l'espace intercellulaire (Reimman et al. 1992). Si des études ultérieures, permettant d'obtenir la séquence complète de notre peroxydase, prouvent l'existence de ce peptide signal, nous aurions alors un nouvel argument qui nous inciterait à penser que nous sommes bien en présence de la séquence de la Cicpx.

CONCLUSION GENERALE PERSPECTIVES

De nombreuses études avaient déjà été menées sur les explants racinaires de chicorée afin de déterminer les relations qui pouvaient exister entre les activités peroxydasiques, l'expression des isoperoxydases et la néoformation d'organes.

Le but de ma thèse était différent, bien qu'inspiré des résultats de ces travaux antérieurs. Il s'agissait pour moi de mieux connaître les influences des conditions de culture sur les activités peroxydasiques, sur l'expression des isoperoxydases et sur le développement d'explants racinaires de chicorée. De plus, si l'une de ces conditions de culture permettait l'expression d'une isoperoxydase particulière, la purification de celle-ci était envisagée afin d'obtenir son ADNc. Celui-ci servirait alors de sonde nucléotidique pouvant nous renseigner sur l'expression du gène de cette isoperoxydase particulière.

Nous avons alors montré que la lumière, et de façon moins importante l'obscurité, activaient, d'une part, les isoperoxydases acides, corrélées aux activités syringaldazine-oxydase, et d'autre part, stimulerait probablement les isoperoxydases permettant les liaisons entre les pectines. Les isoperoxydases basiques, corrélées habituellement aux activités auxine-oxydase, étaient, quant à elles, plus activées par l'obscurité que par la lumière. De plus, ces deux types d'isoperoxydases sont totalement inhibées par la présence d'ANA. Ces variations d'expression des isoperoxydases acides et basiques, qui interviennent respectivement dans la lignification ou dans le catabolisme auxinique, ou encore des isoperoxydases impliquées dans les liaisons entre les pectines, permettraient alors d'expliquer les variations des teneurs en lignines, en auxine endogène et en pectines selon les conditions de culture.

De faibles teneurs en auxine endogène accompagnées par des teneurs importantes en pectine permettraient l'apparition d'une faible prolifération de cellules possédant une forte cohésion entre-elles. Ces dernières pourront alors, soit se lignifier, et donc participer à la cicatrisation de l'explant, soit s'organiser en méristème primaire qui pourra évoluer en bourgeon. La lumière induirait donc des teneurs en lignine, en pectine et en auxine endogènes un peu plus favorables à la cicatrisation et à l'organogenèse que l'obscurité. Par contre, l'ANA, qui comme nous le suggèrons provoque un déséquilibre hormonal en faveur de l'auxine, conduit à une prolifération anarchique de cellules qui ne présentent aucune cohésion entre-elles, et qui, par là même, sont incapables de se lignifier ou de s'organiser en méristèmes primaires.

Nous avons aussi proposé que lors de leur mise en culture, les explants racinaires deviennent des éléments isolés qui échappent totalement aux gradients hormonaux de la racine tubérisée. Suivant les conditions de culture, nous avons vu que les activités peroxydasiques évoluent différemment et établissent donc de nouvelles balances hormonales accompagnées par des teneurs en lignine et en pectine propres à chaque condition de culture. Nous avons alors observé que les explants racinaires s'orientent, plus ou moins bien, selon les conditions de culture, vers deux processus physiologiques différents mais totalement liés. Le premier est la cicatrisation de l'explant, qui correspond à la réponse de ce dernier face à la blessure créée lors de la mise en culture, et qui se caractérise par la mise en place progressive d'une couche cellulaire périphérique lignifiée. Le deuxième est l'organogenèse de l'explant, responsable de l'apparition de bourgeons, et qui est due à la capacité de certaines cellules de l'explant à s'organiser en méristème primaire. Nous proposons alors, que ces différences de cicatrisation et d'organogenèse sont en partie induites par les variations des activités peroxydasiques.

Nous pensons que ces différences d'expression des isoperoxydases acides ou basiques, seraient dues aux variations, influencées par les conditions de culture, de la mise en action des deux voies connues de biosynthèses des peroxydases, la voie de Beale et la voie de Shemin. Nous suggèrons qu'à la lumière la synthèse des isoperoxydases acides et basiques passerait essentiellement par la voie Beale, responsable aussi de la synthèse des chlorophylles. Cette dernière cependant induirait une synthèse des isoperoxydases acides proportionnellement plus grande que celle des isoperoxydases basiques. A l'obscurité, la voie Beale serait totalement inhibée et la synthèse des isoperoxydases acides et basiques qu'à celle des isoperoxydases acides et basiques basiques qu'à celle des isoperoxydases acides. L'ANA quant à lui inhiberait les deux voies, avec une action plus importante sur la voie de Beale que sur la voie de Shemin. De plus, nous avons mis en évidence que la présence de ce régulateur de croissance, induisait l'expression d'une isoperoxydase



Figure19: Schéma récapitulatif des différentes hypothèses d'action des conditions de culture.

basique particulière de pI 8,9, que nous avons nommée Cicpx. Le fait que cette dernière soit exprimée à l'obscurité et en présence d'ANA nous permettrait donc d'émettre l'hypothèse qu'elle est synthétisée uniquement par la voie de Shemin.

Le schéma récapitulatif (figure 19), reprend les différentes hypothèses d'action de la lumière, de l'obscurité et de l'ANA sur les voies de Beale et de Shemin. Ces dernières seraient donc à la base des variations de synthèse des isoperoxydases acides et basiques, qui provoquent à leur tour des changements de teneurs en lignine, en pectine et en auxine endogène. Finalement, nous en déduisons que les différences de cicatrisation et d'organogenèse d'explants racinaires de chicorée peuvent s'expliquer en partie par l'activation ou l'inhibition des voies de biosynthèse des peroxydases.

Afin de vérifier si la Cicpx est réellement synthétisée par la voie de Shemin, nous envisageons donc d'utiliser des inhibiteurs de la voie Beale, tels que la gabaculine ou l'erythromycine, sur des explants cultivés en présence d'ANA. Dans le cas où nous retrouvons les mêmes profils d'isoperoxydases qu'en absence de ces inhibiteurs, cela pourrait alors nous permettre d'avérer cette hypothèse.

Nous avons montré que la présence d'ANA dans les milieux de culture était nécessaire pour provoquer l'expression de la Cicpx. Il serait alors tentant de chercher d'autres conditions de culture permettrant cette induction. Il semblerait que cette Cicpx soit exprimée dans des tissus en forte prolifération cellulaire. L'emploi de composés auxiniques, autres que l'ANA, ou de glucose à une concentration de 0,3 M (Legrand et Bouazza 1991) qui est capable de provoquer une prolifération cellulaire, serait donc approprié afin de conforter cette hypothèse.

L'isoperoxydase Cicpx, étant exprimée dans une condition particulière de culture, elle nous sembla alors être une candidate intéressante pour des travaux de purification. L'aboutissement de ces derniers, à partir de milieux de culture de suspensions cellulaire de chicorée, nous a permis de caractériser et de séquencer la Cicpx. Celle-ci possède alors un point isoélectrique de

8,9, une masse moléculaire de 34 KDa et une absence de réactivité envers la syringaldazine. Cette caractéristique particulière et sa forte expression dans des tissus où la lignification est quasiment inexistante nous ont donc amené à émettre l'hypothèse que la Cicpx n'interviendrait pas dans le processus de lignification.

Par contre, le fait que cette isoperoxydase soit exprimée dans des tissus présentant une forte prolifération cellulaire, qui sont comme nous le supposons, sous l'influence d'une forte concentration en auxine endogène induite par l'ANA (figure 19), nous a amené à la conclusion que la Cicpx aurait un rôle de "détoxication" en dégradant l'excédent d'auxine endogène. Son action pourrait être facilitée grâce aux fortes teneurs d' H_2O_2 et d'oxygène actif provenant du stress oxydatif induit aussi vraisemblablement par l'ANA (figure 19). Nous avions envisager de déterminer par des études de cinétiques enzymatiques et de caractérisation de constante d'affinité, la réactivité de la Cicpx envers l'AIA. Seulement, ce genre d'expérience qui consomme énormément de protéine purifiée, nous a amené à reporter ces travaux par manque de Cicpx pure. Parallèlement, nous pensons mesurer les teneurs en H_2O_2 d'explants cultivés avec de fortes concentrations en ANA, afin de voir s'ils présentent des caractéristiques de tissus soumis à un stress oxydatif.

En vue d'isoler un ADNc de la Cicpx, nous avions d'abord pensé à utiliser les séquences des quatre polypeptides pour constituer des amorces. Ces dernières, malheureusement, ne donnèrent aucun résultat concluant en PCR classique. Nous avons donc utilisé la technique de RT-PCR à partir d'ARNm d'explants racinaires cultivés à l'obscurité et en présence d'ANA 10^{-4} M. En effet, dans ces conditions de culture la Cicpx représente 50% de l'activité totale, ce qui nous laissait présager un taux élevé d'ARNm correspondant à la Cicpx. Nous avons donc déterminé, à partir d'alignements de séquences de peroxydases connues, un oligonucléotide bien conservé, qui a servi de première amorce spécifique des peroxydases. Un poly(T)₁₅ a donc été choisi comme seconde amorce. Après plusieurs essais, nous avons réussi à isoler un ADNc, dont la séquence présente de bonnes homologies avec celles d'autres peroxydases. Cependant, les conditions dans lesquelles nous avons obtenu cet ADNc restent encore assez inexplicables, puisque seule l'amorce spécifique des peroxydase fût utilisée lors de l'amplification. De plus,

bien que la séquence de cet ADNc possède des caractéristiques propres aux peroxydases, nous ne pouvons pas certifier pour l'instant qu'il correspond bien à l'ADNc de la Cicpx.

Afin de vérifier cette appartenance, il serait intéressant d'utiliser la technique de RACE-PCR (Rapid amplification cDNA ends PCR) qui permettrait probablement d'obtenir la séquence compléte de notre ADNc de peroxydase. L'étape suivante consisterait alors à confronter les séquences des 4 polypeptides provenant de la Cicpx pour confirmer s'il correspond bien à l'ADNc de cette isoperoxydase.

Une expérience complémentaire qui permettrait de répondre à cette question, serait d'envisager l'expression, par des bactéries, de la protéine codée par cet ADNc. Dans le cas où nous trouverions une peroxydase de point isoélectrique et de masse moléculaire identiques à ceux de la Cicpx, nous pourrions alors émettre l'hypothèse que l'ADNc inséré correspond bien à celui de la Cicpx.

Quoiqu'il en soit, l'ADNc de peroxydase de chicorée que nous avons obtenu constituera un outil intéressant pour de prochaines recherches sur les transcrits, d'une part, du gène de l'isoperoxydase décelée à l'obscurité et non à la lumière (isoperoxydase C5), et d'autre part, pour celui de la Cicpx qui n'est observée quand présence d'ANA. En effet, cet ADNc servira de sonde lors d'hybridations Northern, afin de détecter des changements quantitatifs et qualitatifs au niveau des ARNm d'explants cultivés en condition obscurité ou ANA. Si de nouvelles bandes apparaîssent dans ces conditions, alors de fortes probabilités existent pour qu'elles correspondent aux ARNm des 2 isoperoxydases recherchées. Cette sonde pourrait alors servir d'outil afin de déterminer si ces deux isoperoxydases sont des isoenzymes ou des isoformes.



Annexe 1: Alignement de séquences en acides nucléiques de *Cucurbita pepo* (Carpin S. et al. 1998), Armoracia rusticana (Bartonek-Roxa E. et al. 1992), Spinacia oleracea (Simon P. 1997), Vigna angularis (Imaseki H. 1999), Solanum tuberosum (Roberts E. et al. 1989), Lycopersicon esculentum (Gadea J. et al. 1996) et Glycine max (Harris N. et al. 1999) afin de déterminer des séquences consensus pour l'obtention d'amorces. La zone encadrée en gris correspond à l'amorce spécifique des peroxydases utilisée lors des RT-PCR.

Multalin version 5.3.3 Copyright I.N.R.A. France 1989, 1991, 1994, 1996 Published research using this software should cite Multiple sequence alignment with hierarchical clustering F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890 Symbol comparison table: blosum62 Gap weight: 12 Gap length weight: 2 Consensus levels: high=90% low=50% Consensus symbols: ! is anyone of IV \$ is anyone of LM % is anyone of FY # is anyone of NDQEBZ

MSF:	1391 Check: 0	• •					
Name:	Cucurbita pepo	Len:	1391	Check:	9561	Weight:	1.08
Name:	Armoracia rusticana	Len:	1391	Check:	3828	Weight:	1.08
Name:	Spinacia oleracea	Len:	1391	Check:	7793	Weight:	0.58
Name:	Vigna angularis	Len:	1391	Check:	99	Weight:	0.58
Name:	Solanum tuberosum	Len:	1391	Check:	5063	Weight:	1.28
Name:	Lycopersicon esculentum	Len:	1391	Check:	551	Weight:	1.20
Name:	Glycine max	Len:	1391	Check:	5991	Weight:	1.20
Name:	Consensus	Len:	1391	Check:	9294	Weight:	7.00

11

	1				50
Cucurbita pepo					
Armoracia rusticana					
Spinacia oleracea					
Vigna angularis					
Solanum tuberosum	TGAGCTTTGT	GGCACTTGCA	CTTGCAGGTG	TTGCTATTTA	TAGAAATACT
Lycopersicon esculentum					A
Glycine max			GTTAGTG	T.GCTCTTTG	GTGTATTTCA
Consensus					
	51				100
Cucurbita pepo	51 				100
Cucurbita pepo Armoracia rusticana	51 				100
Cucurbita pepo Armoracia rusticana Spinacia oleracea	51	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			100 GTTGTTGC
Cucurbita pepo Armoracia rusticana Spinacia oleracea Vigna angularis	51			та ттстсстс	100 GTTGTTGC TCTATCAT
Cucurbita pepo Armoracia rusticana Spinacia oleracea Vigna angularis Solanum tuberosum	51 TATGAAGCCA	TCATCATGAA	TAACGGAT.C	та ттстссстс Астастссаа	100 GTTGTTGC TCTATCAT AATGCTTCTC
Cucurbita pepo Armoracia rusticana Spinacia oleracea Vigna angularis Solanum tuberosum Lycopersicon esculentum	51 TATGAAGCCA ATTACAATTT	TCATCATGAA AATCAACA	TAACGGAT.C AAATGGTTAC	та ттстсстс астастссаа ааттатттт	100 GTTGTTGC TCTATCAT AATGCTTCTC ATTCTGGTGC
Cucurbita pepo Armoracia rusticana Spinacia oleracea Vigna angularis Solanum tuberosum Lycopersicon esculentum Glycine max	51 TATGAAGCCA ATTACAATTT TATACCGTTG	TCATCATGAA AATCAACA CATACTTGCA	TAACGGAT.C AAATGGTTAC TAGTAGTAAT	TA TTCTCCTC ACTACTCCAA AATTATTTTT GGCGCTCTTT	100 GTTGTTGC TCTATCAT AATGCTTCTC ATTCTGGTGC GTTTTGTCTC
Cucurbita pepo Armoracia rusticana Spinacia oleracea Vigna angularis Solanum tuberosum Lycopersicon esculentum Glycine max Consensus	51 TATGAAGCCA ATTACAATTT TATACCGTTG t	TCATCATGAA AATCAACA CATACTTGCA a	TAACGGAT.C AAATGGTTAC TAGTAGTAAT .ag	TA TTCTCCTC ACTACTCCAA AATTATTTTT GGCGCTCTTT t.t.	100 GTTGTTGC TCTATCAT AATGCTTCTC ATTCTGGTGC GTTTTGTCTC tt.c

101 150 Cucurbita pepoTATGC TTCATGCATC TT.TTTCCAA Armoracia rusticana Spinacia oleracea AATATCATGT TTAGTTGG.A ATCTCAAAGA GTCAAAGCAC AG..TACCAG Vigna angularis TCTTTCTGTT TCAGTTATTA AAGTGTGTGA GGCACAAGCC AGGCCTCCTA Solanum tuberosum CACATTTCGA TTCGTTGG.A ATCAGGCGTA GCCAGTATTT TAACCTTAAA Lycopersicon esculentum TAGTAAT..T GTTGATGTGA CTATGGTA......TTCGGC Glycine max TCTTATTCTT CTCATTCTTA ATGGGGAG..TTCCGA Consensust..t .t.gtt...a at..gg.... ..ca......ttc..a 151 200 ACCGAGACCT TCTACGACCA AACTTGTC.. Cucurbita pepo Armoracia rusticana TGCTCAA....CTT ACCCCTACCT TCTACGACAA TTCATGTC.. Spinacia oleracea TTGTGAATGGTCTC TCATACTCAT ATTACTCAAG AAGTTGTC.. Vigna angularis CTGTCAGAGGTCTA TCATATACCT TCTATTCCAA AACTTGCC.. Solanum tuberosum TAATAAGAAG AGAAATTCAG ACATGTACTT GAGACAGCAG CTAACTCCGG Lycopersicon esculentum CAAGGGA....CT. CGTGTTGGAT TTTATTCCAG TACGTGCC.. Glycine max GAGTCAG...CTT CAAGTAGGTT TCTACTCCAA CACATGTC.. .a.t.a....ct. .ca..tac.T tctActcCaa .acatgtC.. Consensus 201 250 Cucurbita pepo ... CTCGTCT CCCTAACATT GTCCGCCAAG AGGTCAAGAG GGCTATTGAA Armoracia rusticana ... CTAACGT CTCAAACATA GTACGGGACA TCATTATCAA TGAGTTACGA Spinacia oleracea ... CAGATTT GGATTTCATT ATTAGAGATC ATCTTTTTGA TGTTTTTGAG Vigna angularis ... CTACGCT TAAATCCATA GTTAGAACTG AGCTCAAAAA GGTCTTCCAG Solanum tuberosum AGGCATGCGT TTTCTCAGCT GTACGAGGAG TTGTGGACAG TGCTATTGAT Lycopersicon esculentum ... CAAGGGC CGAATCCATA GTTCAATCAA CGGTGAGGTC TCATTTTCAG Glycine max ... CTCAAGT TGACTCCATT ATCCGTGCCG TTGTTAGAGA CGCCGTTCTC Consensus ...Ct.g.gt ..a.tccatt gT.cgag.ag t.gT.a..a. tgct.Ttca. 251 300 Cucurbita pepo ACCGACATCC GTGCCGGGGC TAAGCTCATC CGCTTQCATT TCCATGACTG Armoracia rusticana TCGGACCCTA GTATCGCCGC GAGCATCCTT CGTCTTCACT TCCACGACTG Spinacia oleracea CGAGATATAA CCCAAGCTGC TGGATTGCTC CGTCTTCATT TCCATGATTG Vigna angularis AGCGACATTG CTCAAGCTGC TGGCTTGCTT CGCCTTCACT TCCATGACTG Solanum tuberosum GCAGAAACAC GCATGGGAGC TTCTCTTATT CGTCTCACT TCCATGACTG Lycopersicon esculentum TCTGATCCAA CAGTGGCACC AGGATTGTTG AGAATGCACT TTCATGATTG Glycine max TCTGACCCCA ATATGGCGGC TGTCTTACTC AGACTTCATT TTCACGATTG Consensus .c.GAcac.a .tatgGc.gC tg..tT..T. cG.cT.CAcT TcCAtGAcTG 350 301 Cucurbita pepo CTTCGTCAA GGCTGCGATG GCTCTGTTTT GCTAGAGGAT GCTCCCG.GC Armoracia rusticana CTTTGTTAAT GGTTGTGACG CATCGATCTT GTTAGACAAC ACAACATCAT CTTCGTTAAG GGATGTGATG GTTCTGTATT CTTGGTTGGA TCATCCAGTA Spinacia oleracea CTTTGTTCAG GGATGTGATG GGTCAGTTTT ATTGGATGGA TCTGCAAGTG Vigna angularis Solanum tuberosum CTTCGTTGAT GGTTGTGATG GAGGTATTCT GCTAGATGAT ATTAATGGAA TTTCGTACAA GGTTGTGACG GTTCCATCCT CATT..... ... TCTGGTA Lycopersicon esculentum CTTTGCTCAG GGATGTGATG GTTCAATTCT GATTGAG... ... AATGGTC Glvcine max Consensus cTTcGttcA. GGtTGtGAtG g.tc.aTtcT g.T.ga.g.. ...actggt. 400 351 Cucurbita pepo ATCGA.CAGT GAACTCAACG ...GACTAGG AAATTTAGGA ATCCAAGG.A TTCGAACAGA GAAAGATGCG TTTGGAAACG CAAACTCGGC T..CGAGG.A Armoracia rusticana CCCCAAGTGA AAAGGATGCA CCTCCAAATT TGACGCTAAG ACATGAGGCA Spinacia oleracea Vigna angularis GGCCGAGTGA GAAAGATGCG CCACCAAACT TGACTTTGAG AGCTGAAGCT Solanum tuberosum CATTTACAGG GGAACAAAAC TCACCACCCA ACGCCAACTC AGCCAGAGGT Lycopersicon esculentum CTGGCACTGA GAGAACAGCT CCTCCGAATT CCAATTTG.....AGAGGA Glycine max CACAATCGGA GAGACATGCA TTTGGACATC AGGGGGTT.....AGAGGG Consensus c.c.aac.Ga Gaaa.aagc. tctcca.a.. a.a..ttg.. a...agaGga

106

401 450 Cucurbita pepo CTCGAGATTG TCGACGCCAT CAAAGCCGCC GTTGAAAGCG AATGTCCCGG Armoracia rusticana TTTCCTGTGG TTGACAGAAT CAAGGCCGCG GTGGAGAGGG CATGCCCAAG Spinacia oleracea TTTAAGATTA TAAATGATCT TCGTGCCCAT GTACATTACC ATTGTGGCCG Vigna angularis TTTAGGATCA TCGAAAGGAT TCGTGGTCTG TTAGAGAAGA GCTGTGGAAG Solanum tuberosum TATGAAGTAA TAGCACAAGC TAAACAAAGT GTCATAGATA CATGCCCCAA Lycopersicon esculentum TTCGAGGTTA TTGACGATGC TAAGCAGCAA ATTGAAGCTG TTTGTCCTGG Glycine max TTTGAAGTGA TAGAAAGAGC AAAGGCACAA TTGGAAGGCT CTTGCCCCGG Consensus tttga.gT.a T.Ga...agc taa.gc.c.. gT.gaag... c.TGcccc.g 451 500 CGT...CGTA TCTTGCGCCG ATGTCCTAGC TCTGGCCGCT AAACAATCTG Cucurbita pepo Armoracia rusticana AAC...TGTT TCATGCGCAG ATGTGCTTAC CATTGCAGCT CAACAATCTG Spinacia oleracea AGT...TGTG TCATGTGCTG ATATCGCTAC CCTTGCTGCT CGTGAGTCTG Vigna angularis AGT...CGTC TCATGTTCAG ACATCACTGC CCTCGCTGCA CGTGATGCTG Solanum tuberosum CATATCTGTA TCTTGTGCTG ACATATTAGC TATTGCTGCT CGTGATTCGG Lycopersicon esculentum AGT...TGTT TCATGTGCTG ACATTCTTGC TCTTGCTGCT CGTGATTCCG Glycine max CTT...GGTT TCTTGTGCAG ACATAGTGGC TTTGGCAGCC AGAGACGCTG Consensus c.t...tGT. TCtTGtGC.G AcaT..t.gC t.TtGCtGCt cgtgA.tCtG 501 550 TGGACGTGCA AGGTGGGCCC AGCTGGAGAG TTTTATTCGG AAGAAGAGAT Cucurbita pepo Armoracia rusticana TTAATTTGGC AGGAGGTCCT TCTTGGAGGG TTCCTTTGGG AAGAAGAGAC Spinacia oleracea TTTATCAGTC AGGTGGACCA TTCTACCATG TTCCCTTAGG AAGAAGGGAT Vigna angularis TTTTCCTTTC AGGGGGGACCA GACTATGAGA TTCCCTTGGG AAGGAGAGAT Solanum tuberosum TTGCTAAATT AGGAGGACAA ACTTATAACG TTGCATTAGG GAGAAGCGAT Lycopersicon esculentum TTCTCGTGAC TAAAGGATTG ACCTGGTCTG TCCCCACGGG ACGCACAGAT Glycine max TAGTCATGGC AAATGGGCCA GCATATCAAG TTCCAACAGG GAGGAGAGAT Ttg.c.tg.c aggaGGacca ac.Ta..a.G Ttccatt.GG aaGaAgaGAt Consensus 551 600 Cucurbita pepo AGCAGAACA. ..GCCAAC.. AGAACAGGGG CCGACGAA.C TCCCAAGTCC Armoracia rusticana AGCCGACAA. ..GCATTTTT AGATCTCGCT AATGCGAATC TTCCAGCTCC Spinacia oleracea GGCCTAAGCT TTGCTACACA AAGCGAAACC TTAGCTAATC TACCACCTCC Vigna angularis GGGTTAACCT TTGCCTCTAG ACAGGTGACA TTAGACAACC TTCCACCACC Solanum tuberosum GCTAGAACG. ..GCCAACTT TACTGGTGCT TTAACTCAAC TTCCAGCTCC Lycopersicon esculentum GGACGAGTT. ..TCAAGCGC ATCAGACAC. ..ATCTAATC TGCCAGGTTT Glycine max GGGTTGGTT. ..TCCAATCT TTCGCTTGC. ..AGATGACA TGCCAGATGT gg..gaa... ..gCcaac.t a.c.g..gc. ..a.ctaA.c T.CCAgcTcc Consensus 601 650 Cucurbita pepo GTTCGAAACT CTTGAGCCAC TCAAACAGAA GTTCGAAGCC CTTGGGCTGG Armoracia rusticana ATCCTTCACA CTTCCAGAAC TTAAGGCTGC TTTTGCAAAT GTTGGCCTCA Spinacia oleracea CTTTTTCAAC ACTACAACA TTCTCAACGC CTTTGCTACC AAAAACTTAA Vigna angularis CTCAAGCAAC ACCACCACCA TCCTAAACTC CCTCGCCACC AAAAACCTCG Solanum tuberosum ATTCGACAAC CTAACTGTCC AAATACAGAA ATTCAACGAT AAAAATTTCA Lycopersicon esculentum TACTGAATCT GTTGCTGCTC AAAAGCAAAA GTTTGCTGCA AAGGGTCTCA Glycine max TAGTGATTCG ATTGAGCTAC TCAAGACCAA GTTTCTCAAC AAAGGTCTCA .t..gacac. .tt.c.g.aC t.aa.ca.aa .TTtg..ga. aaaggtcTca Consensus 651 700 Cucurbita pepo A...TTCCAC TGATCTTGTT GCTCCATCTG GGGCGCATAC GTTCGGTCGG Armoracia rusticana ACCGTCCTTC TGATCTCGTT GCTCTCTCG GTGGTCACAC ATTTGGTAAA Spinacia oleracea AC...GCCAC GGATCTTGTG GCCCTCTCGG GTGGCCACAC CATCGGAATC Vigna angularis AC...CCCAC CGATGTGGTA TCCCTCTCTG GTGGCCACAC CATAGGCATA Solanum tuberosum CC...CTCCG TGAAATGGTT GCGCTAGCTG GTGCGCACAC GGTAGGTTTC Lycopersicon esculentum AC...ACTCA AGATCTTGTC ACCCTTGTTG GTGGGCACAC AATTGGAACC Glycine max CA...GTGAA AGACCTTGTT CTTCTTAGTG GTGCACATAC AATTGGAACC Consensus ac....cc.. .GAtcTtGTt gc.Ct..cTG GtGcgCAcAC .aT.GG.a.c

701 750 TCGAGATGCA TGTTCTTCAG CGGGCGTTTC TCCAACTTCA ATGGGACTGG Cucurbita pepo Armoracia rusticana AATCAATGTC GATTTATTAT GGACAGATTA TACAACTTCA GCAACACCGG Spinacia oleracea AGTCATTGTA CCTCCTTCAC CAATAGACTT TATC.CTACT Vigna angularis AGTCACTGCA GCTCTTTCAA CAACAGACTC TACC.CTACA GCCAGGTGTT CTACCGTTTG CACCAG...C GGTAACGTTA Solanum tuberosum Lycopersicon esculentum TCAGCATGCC AATTCTTCAG CTACAGGCTA TACAATTTCA ACTCCACTGG Glycine max ACAGCGTGCT TCTTTATGAC CAGAAGACTG TACAACTTTT TCCCAAGTGG Consensus .c....TGc. ..ttc.T.ag ca.caG.ct. tacaacttcaa..gg 751 800 GCA...GCCA GATCCGGCAC TTGACCCAGC GTACAGGCAG GAGCTGGAGC Cucurbita pepo Armoracia rusticana ACT...ACCC GACCCTACCC TCAACACTAC TTACCTTCAA ACTCTTCGTC Spinacia oleraceaCAA GACCCTAGTA TGGACCAAAC CTTGGCCAAC AACCTTAAGC Vigna angularisCAG GACCCTGTCA TGGACAAAAC CTTTGGCAAA AACCTCAGAC Solanum tuberosum Lycopersicon esculentum TG...GCCCT GACCCTTCAA TAGATGCAAC CTTTCTTTCT CAGCTTCAAG Glycine max TGAGGGATCA GACCCAGCAA TTAGACAAAA CTTCCTCCCT CGGCTAAAGG Consensuscc. gAcCCtgc.a t..ac.caac ctt..t.ca. c.gCT.ca.c 801 850 GAGCTTGTAC A...GATGGA GA..GACGCG A....GTGAA TTTCGATCCA Cucurbita pepo Armoracia rusticana AACAATGTCC CCGTAATGGT AACCAAAGCG TCTTGGTGGA TTTCGATCTG Spinacia oleracea TCACTTGCCC TACTGCAACC ACTAATAGCA CT...ACTAA TTTGGACCTT Vigna angularis TCACTTGCCC CACCAACACC ACCGACAACA CC...ACAGT CTTGGACATT Solanum tuberosum ACGCTTAC.....TGATTCT GA..TTTGCA AC.....A ATTGGATAC. Lycopersicon esculentum CATTATGTCC ACAAAACGGA GATGGCTCGA AGCGTGTGGC ACTGGACACT Glycine max CAAGGTGCCC TCAGAATGGA GATGTTAATA TTCGCCTAGC TATTGATGAA Consensus .a.ctTgcccaAtgg. ga....gca a....t.ga ttTgGAt.c. 851 900 Cucurbita pepo ACCACACCGG ACACGTTTGA CAAAAACTAC TACACCAACC TTCAAGCCAA Armoracia rusticana CGTACGCCAA CAGTTTTCGA TAACAAATAC TATGTGAATC TTAAAGAGCA Spinacia oleracea CGTACCCCCA ATGTTTTCGA CAACAAGTAT TTTGTCGACC TTATGAATCA Vigna angularis CGATCCCCCA ATACCTTCGA CAACAAATAC TACGTTGACC TCATGAACCG Solanum tuberosum ... TACTCCTA CTATGTTCGA CAAAGTTTAC TACGATAACT TAAACAACAA Lycopersicon esculentum GGAAGCGTGA ACAATTTTGA CACCTCGTAT TTCTCTAACT TGAGGAATGG Glycine max GGGAGTGAGC AGAAATTTGA CATAAACATT TTGAAGAACA TAAGGGAAGG .g.Ac.cc.a a.a..TTcGA cAaaaa.tac Tacg..aAc. T.a.gaa..a Consensus 901 950 Cucurbita pepo TCGAGGGCTT CTCACGAGTG A..CCAAGTG CTGTTCT.CC ACTCC...TG Armoracia rusticana AAAAGGTCTC ATCCAGAGTG A..CCAAGAG TTGTTCT.CT AGCCCCAATG Spinacia oleracea TCAAGGCTTG TTCACCTCCG A...TCAGAC.TTT.AT ATACC....G Vigna angularis ACAGGGCCTC TTCACCTCCG A..CCAAGA.CCT.CT ACACC....G Solanum tuberosum CCAAGGTATA ATGTTTTCGG A..TCAAG..T.TT TGACC.GGGG Lycopersicon esculentum TCGGGGAATT CTGGAATCAG A..CCAGATA TTGTGGA.CC GATGCTTCGA Glycine max TTTTGCTGTG CTAGAATCTG ATGCCAGACT CAATGATGAC ATAGCCACCA tcaaGgt.T. .T....tc.G A...cCAag.. ...t..t.ct a.acC....g Consensus 1000 951 GCGCCGACAC AATTGAAATT GTGAACCGTC TTGGGTCCCG AGAAGGAACC Cucurbita pepo CCACTGACAC AATCCCCTTG GTGAGATCAT ATGCTGATGG CACACAAACA Armoracia rusticana ATTCAAGGAC TAAGGCTATT GTCACAAGCT TTGCTACAAA CCAGAACTTA Spinacia oleracea Vigna angularis ATAAGAGGAC CAGAGGCATT GTCACCAGCT TTGCCGTGAA CCAGAGTCTC Solanum tuberosum ATGCTACAAC TGCTGGTTTT GTAACGGATT ATAGCAACGA TGTTAGCGTT Lycopersicon esculentum CCAAGGTGTT TGTCCAAAGG TATTTAGGCC TCAGGGGATT TCTTGGATTG Glycine max AGAATGTCAT TGACTCCTAC GTTTCTCCCT TCAGTCCAAT GTTTGGGCCT Consensus a.actg..ac tg..g..ttt gt.ac...ct ttag..... ..tt.g..t.

1001 1050 Cucurbita pepo TTCTTTAG.. .ACAATTTCG GGTGTCCATG ATTAAGATGG GAAACATTAG Armoracia rusticana TTCTTCAA.. . TGCCTTTGT GGAGGCCATG AATAGGATGG GAAACATTAC Spinacia oleracea TTCTTTGA.. .AAAGTTCAT AGATGCAATG GTAAAAATGA GCCAGCTAAG Vigna angularis TTCTTTGA...GAAGTTTGT GTTCGCCATG CTCAAGATGG GTCAGCTCAG Solanum tuberosum TTCCTTGG...AGATTTTGC TGCTGCCATG ATCAAGATGG GAGACTTGCC Lycopersicon esculentum AGATTCGGCT TAGAATTTGG AAAGTCCATG GTTAAAATGA GCAATATTGA Glycine max TCTTTTGAAG CTGATTTTGT TGAGTCAGTT GTGAAAATGG GCCAAATTGG Consensus ttctTtgg...aga.TTTg..gaggCcaTg .t.AagATGg G..A.aTt.. 1100 1051 Cucurbita pepo GCCCTTAACT CCAAACCAAG GGGAAATCAG AAGAAACTGC AGGGGGGGTGA Armoracia rusticana ACCTCTTACA GGAACTCAAG GAGAAATCAG GTTGAACTGT AGGGTGGTGA Spinacia oleracea TGTATTGACC GGCACACAAG GGGAGATTCG CACAAACTGC TCTGCAAGGA Vigna angularis TGTGCTCACG GGAAATCAAG GGGAGATTCG TGCCAACTGC TCCGTGAGGA Solanum tuberosum TCCATCCGCG GGCGCTCAAT TGGAAATTCG TGATGTTTGT AGCAGGGTTA Lycopersicon esculentum AGTTTTGACA GGGACTAATG GTGAAATTCG TAAAGTTTGC TCTGCATTCA Glycine max TGTCAAGACA GGTTTCCTTG GAGAGATTAG GCGCGTGTGT TCAGCTTTTA Consensus tgt.tt.aC. gg.actcaag ggGAaATtcGgt.TGt tc.g.g.t.A 1101 1150 Cucurbita pepo AT...GAGTT GGGAGGTGAA GCAGGGCATG ATGTTATGTA ATTTTACGCC Armoracia rusticana ACTCCAACTC TCTACTCCAT GATATAGTGG AGGTCGTTGA CTTTGTTAGC Spinacia oleracea ATGTCATC.C GCCATGTCAA TCTCAAAT.. CTGT...GGC TCAAGT.GGA Vigna angularis ATGCCAAC.A GCAAGGCCTT CTTGAGTT.. CCGTCGTGGA AAATGT.GGC Solanum tuberosum ATCCCACTTC TGTGGCTTCT ATGTGAAATT CCGAAATTTT AAGTAACTTA Lycopersicon esculentum ACTG.ATGCA TATATGTATA TACTAATTAG TTTCGTTCAG TTAGGCAAGC Glycine max ATTG.AAGTA AATATGCAAT TAATGATCAA TT..GGTCA. .TAATAAAAA Consensus At..caa.t. t.ta.gt.at ...tga.... .tg...T... .tat.a...c 1200 1151 Cucurbita pepo TCT.TGCTTG TGTGCCACAA TAAATTCAGA ACTTCCATGG T.TGTGTTTT Armoracia rusticana TCTATGTGAG AAAAGTTGAC TCAATATCTG GCTACCAGAG TATACGTTAA Spinacia oleracea TCA.TGAA.. .AAAGAAAGA TTATCA...C AATATTAATT AAGGAGCTTC Vigna angularis CCA.AGAATT CATAGAAATG TAACCGGGTC TTCTTTGTTG TATATGTTAT Solanum tuberosum TCTCTGAT....GTTTTCTTC AAAATAAAAG AATCACTGGC TCCAGAATGT Lycopersicon esculentum TGCAAGATAA ATTGTTAGTT ATATCCAATA TCAATAAATA AAAGCATTTA Glycine max TGTATGGCTT CTAGATA... Consensus Tct.tGat....t..ta... ..a....a... ..t...a... t....tt... 1201 1250 Cucurbita pepo GAAGGT.TCT GGA...TACA ATATTTTCCA TTT.CTGGAG GGAA.CATGT Armoracia rusticana GATAAA.TAA AGCGCTCTCA AGATGTTACT TGAGAAGGAG AATATCTTTA Spinacia oleracea AAGCAAGTAC ATCGAATAAA A.TTGTAACA ATA....TAT TGT....TAG Vigna angularis GACCATGAAT AATGCGTAAC CCTTGTTTCT GGA....TGA TCTAACGTGG Solanum tuberosum GGTTTTGGTA TTTGTTTTGT AATCCTTTCA GTATTATGAT CAGTTGATGC Lycopersicon esculentum Glvcine max g....tgt.. ...g.ttt.. a....tt.c. ..a....a.t.. Consensus 1251 1300 Cucurbita pepo GCGGTTTTTG AAGGGAAGGG TTGCATCTTT AGAGATAGGA TTGGATGATT Armoracia rusticana TTGGTGTGTA GTGTGTAGGG TATCTAAGTT .GTTCTCTGT TTTTATGTTT Spinacia oleracea TATGTTACTA TGTTATGTAA TGAATAAAT. ..AATATGAC CTTTGATCAA Vigna angularis TAGGGAACCG TTCTCTAATG TTCCTAGTT. ..ATATATAC ATACGTACTT Solanum tuberosum CATGCATATA TGTAACAAAA TATATGAATA .TTGTTTTCC TTGTGTGCT. Lycopersicon esculentum Glycine max Consensus

	1301				135	50
Cucurbita pepo	GGAGAGTATG	TTTGTAGTAG	3 TTATTATGA	T GTTCATCCC	A GTTGGAGAG	C
Armoracia rusticana	GTGTTGGCCT	TTGAATGCG	r ttcgtgaat	C GGTCTAAAC	T TGTATGGG	ΓT
Spinacia oleracea	ААААААААА	АААААААА	а ааааааааа	A AA		
Vigna angularis	GAGTTGTAAT	AAATTTTAA	A ATCTGAACA	A GAGCTTCTC	A TTGGCATG	г.
Solanum tuberosum						
Lycopersicon esculentum						
Glycine max					• • • • • • • • • •	
Consensus						
	1	351			139	91
Cucurb.	ita pepo C	CCACCCTCG	ATCCAACTCT	ТТАААААААА	ААААААААА	A
Armoracia re	usticana T	GGACGTTCT	АТССТААТАА	AGATGATAAA	атаааатааа	•
Spinacia d	oleracea .					•
Vigna a	ngularis .					•
Solanum ti	uberosum .					٠
Lycopersicon es	culentum .					
Gly	cine max .					•
C	onsensus .					

Annexe 2: Alignement de la séquence en acides nucléiques de l'ADNc de *Cichorium intybus* avec avec celles de *Glycine max* (Harris N. et al. 1999), *Arachis hypogaea* (Buffard D. et al. 1991), *Lycopersicon esculentum* (Gadea J. et al. 1996), *Spinacia oleracea* (Simon P. 1997) et *Phaseolus vulgaris* (Blee K.A. et al. 1999). La séquence de *Cichorium intybus* est soulignée. La séquence de l'amorce spécifique des peroxydases en début de séquence de *Cichorium intybus* a été encadrée.

Multalin version 5.3.3 Copyright I.N.R.A. France 1989, 1991, 1994, 1996 Published research using this software should cite Multiple sequence alignment with hierarchical clustering F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890 Symbol comparison table: blosum62 Gap weight: 12 Gap length weight: 2 Consensus levels: high=90% low=50% Consensus symbols: ! is anyone of IV \$ is anyone of LM % is anyone of FY # is anyone of NDQEBZ

MSF:	1358	Check:	0						
Name:	Glycine	max		Len:	1358	Check:	7837	Weight:	0.97
Name:	Arachis	hypogaea		Len:	1358	Check:	6257	Weight:	0.41
Name:	Lycopers	icon escu	lentum	Len:	1358	Check:	5841	Weight:	0.41
Name:	Spinacia	oleracea	1	Len:	1358	Check:	6775	Weight:	0.83
Name:	Phaseolu	ıs vulgari	s	Len:	1358	Check:	3252	Weight:	1,42
Name:	Cichoriu	um intybus	;	Len:	1358	Check:	1878	Weight:	1.96
Name:	Consensu	IS		Len:	1358	Check:	3103	Weight:	6.00

11

	1				50
Glycine max					
Arachis hypogaea	ATATCACATA C	CATTTTCTAT	CTCATTCATC	CTTAACATAC	ААТАТАААСА
Lycopersicon esculentum		· · · · · · · · · · ·			
Spinacia oleracea					
Phaseolus vulgaris					
<u>Cichorium intybus</u>			<i></i>		
Consensus					
	51				100
Glycine max	51				100
Glycine max Arachis hypogaea	51 	СТСААСТСАТ	САТСАТСАТА	СТТТТСТАТС	100 TCATTCATCC
Glycine max Arachis hypogaea Lycopersicon esculentum	51 	CTCAACTCAT	САТСАТСАТА	СТТТТСТАТС	100 TCATTCATCC
Glycine max Arachis hypogaea Lycopersicon esculentum Spinacia oleracea	51 	CTCAACTCAT	САТСАТСАТА	CTTTTCTATC	100 TCATTCATCC
Glycine max Arachis hypogaea Lycopersicon esculentum Spinacia oleracea Phaseolus vulgaris	51 	CTCAACTCAT	CATCATCATA	CTTTTCTATC	100
Glycine max Arachis hypogaea Lycopersicon esculentum Spinacia oleracea Phaseolus vulgaris <u>Cichorium intybus</u>	51 	CTCAACTCAT	САТСАТСАТА	СТТТТСТАТС 	100 TCATTCATCC
Glycine max Arachis hypogaea Lycopersicon esculentum Spinacia oleracea Phaseolus vulgaris <u>Cichorium intybus</u> Consensus	51 	CTCAACTCAT	CATCATCATA	CTTTTCTATC	100 TCATTCATCC

	101				150
Glycine max					
Arachis hypogaea	TTAACATACA	АТАТАААСАА	CTTTAATTTC	TCAACTCATC	ATCATCATAC
Lycopersicon esculentum				.GAATTCGGC	ACGAGAGAAT
Spinacia oleracea					
Phaseolus vulgaris					
<u>Cichorium intybus</u>					
Consensus					
	151				200
Glycine max		GTTA	GTGTGCTCTT	TGGTGTATTT	CATATACCGT
Arachis hypogaea	TAGCTAGCTA	TTTGTGCTTG	ATATTCATTC	CTTAGTTACC	ААААТААСАА
Lycopersicon esculentum	TTTATCACAG	TACGTACATA	АСАССАААТА	TGGAGT . ATT	ACAATTACAA
Spinacia oleracea					
Phaseolus vulgaris					
Cichorium intybus					
Consongus					
consensus	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	••••		••••
	201				250
alertine men	201				200
Giycine max	TG	CATACTIGC	ATAGTAGTAA	TGGCGCTCTT	TGTTTTTGTCT
Aracnis nypogaea	TGGAGGGTGT	TTTCAACAAC	AAAAAGTTCA	TTCTCGTGTT	TGTTTTTTATG
Lycopersicon esculentum	т	, TTAATCAAC	AAAATGGTTA	CAATTATTTT	TATTCTGGTG
spinacia oleracea		••••	••••	••••	• • • • • • • • • • •
Phaseolus vulgaris	• • • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	•••••
<u>Cichorium intybus</u>	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	••••
Consensus	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •
	251				300
Glycine max	CTCTTATTCT	. TCTCATTCT	TAATGGGGAG	TTCCGAGAGT	CAGCTTCAAG
Arachis hypogaea	CTTGGCTTGT	GTATTGGTAT	CACCACAGTG	CATGGCCAAG	GTACC.CGAG
Lycopersicon esculentum	CTAGTAAT	. TGTTGATGT	GACTATGGTA	TTCGGCCAAG	GGACT.CGTG
Spinacia oleracea		TGCTTGC	TAATTCTGCT	AAATCCCAAT	TAAGC.ATCG
Phaseolus vulgaris					
<u>Cichorium intybus</u>					
Consensus					
	301				350
Glycine max	TAGGTTTCTA	CTCCAACACA	TGTCCTCAAG	TTGACTCCAT	TATCCGTGCC
Arachis hypogaea	TAGGGTTCTA	TTCAAGAACT	TGTCCTAGAG	CCGAGTCCAT	TGTGAGGTCC
Lycopersicon esculentum	TTGGATTTTA	TTCCAGTACG	TGCCCAAGGG	CCGAATCCAT	AGTTCAATCA
Spinacia oleracea	CTTATTACGC	TTCGAGT	TGCCCCCAAG	CAGAAGGGAT	AGTAAGATCA
Phaseolus vulgaris	GTTTTA	TTCTAGTTCG	TGTCCTCGTG	CCGAGTCCAT	TGTTAAGTCC
Cichorium intybus					
Consensus	tt.ta	ttc.agc	ta.cc.ca	c.ga.tccat	.gtt.c.
				e.gee	
	351				400
Glycine max	GTTGTTAGAG	ACGCCGTTCT	CTCTGACCCC	AATATGGCGG	CTGTCTTACT
Arachis hypogaea	ACCGTTCGAT	СССАССТТАА	CTCCCATCCT	ACTTTCCCCCG	СТАААТТСТ
Lycopersicon esculentum	ACCGTGACGT	CTCATTTTCA	GTCTGATCCA	ACAGTGGCAC	CAGGATTGTT
Spinacia oleracea	ACTGTTCAAT	CTCACTTCAA	TTCCGATCCT	ACTATCCCTC	CTGGCTTGTT
Phaseolus vulgaris	ACAGTTCAGT	СССАССТТАА	GTCTGATTCT	ACTITUCGCTC	CTGGGTTGCT
Cichorium intybus	1101101101101	cecneorma	Gieromiter	Merridderd	0100011001
Conconcus	a att t		ta ast a		
Consensus	ac.yttt	C.CaC.LL.A	.tc.gat.c.	act.tggc	Clg
	401				450
	401 0202000000		aammaamaa	0003 80803 8	400
Giycine max	CAGACTTCAT	TTTCACGATT	GCTTTGCTCA	GGGATGTGAT	GGTTCAATTC
Arachis hypogaea	TAGAATGCAC	TTCCATGATT	GCTTTGTCCA	AGGCTGCGAC	GGTTCTATCC
Lycopersicon esculentum	GAGAATGCAC	TTTCATGATT	GTTTCGTACA	AGGTTGTGAC	GGTTCCATCC
Spinacia oleracea	ACGACTCCAT	TTTCATGATT	GCTTTGTTCA	GGGTTGTGAT	GCTTCAATAT
Phaseolus vulgaris	TCGGATGCAC	TTCCACGATT	GCTTTGTGCA	AGGCTGTGAC	GGTTCTGTTC
<u>Cichorium intybus</u>	<u>CAC</u>	TTCCACGACT	GCTTCGTTGA	GGGATGTGAC	GGGTCGATTC
Consensus	gt.CAc	TTCCACGAtT	GCTTtGttcA	gGG.TGTGAc	GgtTC.aTtc

451 500 TGATTGAGAA TGGTCCACAA TCGGAGAGAC ATGCATTTGG ACATCAGGGG Glycine max Arachis hypogaea TCATT...TC TGGCCCTGCC ACCGAGAAAA CGGCATTTGC AAACCTCGGA Lycopersicon esculentum TCATT...TC TGGTACTGGC ACTGAGAGAA CAGCTCCTCC GAATTCCAAT Spinacia oleracea TGATT...TC GGGGACTTCT TCAGAAAGAA CTGCCTTTAC AAACGTGGGA Phaseolus vulgaris TCATT...TC CGGCGCCAAC ACTGAGAAAA CAGCCTTTGC CAACCTTGGT Cichorium intybus TGATAGATAA CGGAAAAGAT TCAGAGCGTC TTGCATTTGC GCATCAAGGG Consensus TgATt...tc cGG.ac..a. tC.GAgagaa ctGCaTTTgc .aAtc..GG. 501 550 Glycine max GTTAGAGGGT TTGAAGTGAT AGAAAGAGCA AAGGCACAAT TGGAAGGCTC CTTAGAGGGT ACGAGATTAT TGACGATGCA AAGACACAAC TCGAGGCTGC Arachis hypogaea TTGAGAGGAT TCGAGGTTAT TGACGATGCT AAGCAGCAAA TTGAAGCTGT Lycopersicon esculentum TTGAAAGGCT TCGACGTAAT TGACGATGCA AAGGCACAAG TCGAGTCCGT Spinacia oleracea TTAAGAGGTT TTGAGGTTGT CGATGATGCA AAGACGCAGC TCGAGGCCGC Phaseolus vulgaris Cichorium intybus GTACAAGGAT ACGATGTAAT CGAGAATGCA AAAGCGAAGT TGGAAAGTGT Consensus .TaagAGG.T tcGA.GT.aT cGA.gatGCA AAggCgcAg. T.GAagccgt 551 600 Glycine max TTGCCCCGGC TTGGTTTCTT GTGCAGACAT AGTGGCTTTG GCAGCCAGAG CTGTCCCGGT GTTGTGTCTT GCGCAGATAT CCTCGCCCTT GCTGCTCGTG Arachis hypogaea TTGTCCTGGA GTTGTTTCAT GTGCTGACAT TCTTGCTCTT GCTGCTCGTG Lycopersicon esculentum GTGCCCAGGA GTTGTTTCTT GTGCTGATAT CTTAGCTTTA GCTGCTCGTG Spinacia oleracea Phaseolus vulgaris ATGCCCCGGT GTCGTGTCTT GTGCTGATAT CCTTGCCCTT GCTGCTCGTG Cichorium intybus TTGTCCAGGC GTGGTTTCTT GTTCGGATAT TGTTGCCATG GCTGCAAGAG tTGcCC.GG. gT.GTtTCTT GTgC.GAtAT ...TtGCc.T. GCtGCtcGtG Consensus 601 650 Glycine max ACGCTGTAGT CATGGCAAAT GGGCCAGCAT ATCAAGTTCC AACAGGGAGG ACTCCGTCGT TCTGAGTGGT GGATTGAGTT GGCAAGTGCC AACAGGACGC Arachis hypogaea ATTCCGTTCT CGTGACTAAA GGATTGACCT GGTCTGTCCC CACGGGACGC Lycopersicon esculentum Spinacia oleracea ATTCTGTTGA TTTGACGGGC GGGCCGAATT GGGGAGTTCC ACTAGGAAGA Phaseolus vulgaris ATTCCGTTGT TCTGAGTGGT GGACTGAGCT ATCAGGTTCC TACTGGACGA <u>Cichorium intybus</u> ATGCTGTTGC TTTTAGTCGT GGGCCAGTTT ATGAAGTTGA AACAGGAAGG Consensus AttCtGTtGt t.Tgagt.gt GGgccga.tT at.aaGTtcc aacaGGaaG. 651 700 Glycine max AGAGATGGGT TGGTTTCCAA TCTTTCGCTT GCAGATGACA TGCCAGATGT Arachis hypogaea AGAGATGGGC GCGTATCGCA AGCTTCAGAC GTAAGCAACT TGCCAGCACC Lycopersicon esculentum ACAGATGGAC GAGTTTCAAG CGCATCAGAC ACATCTAATC TGCCAGGTTT Spinacia oleracea CTGGATGGGA AGAGGTCCTC TGCATCTGAT GCTGTAAACT TGCCTTCTCC Phaseolus vulgaris AGAGATGGAC GCATATCACA GGCTTCTGAC GTGAGCAACT TGCCTGCACC Cichorium intybus AAGGATGGTC TGGTGTCAAA TTTAAATCTT GCTGACAGAA TGCCAGATGT Consensus a.aGATGG.c .ggt.TCaaa tgcatctgat Gc.g.caac. TGCCag.t.t 701 750 Glycine max TAGTGATTCG ATTGAGCTAC TCAAGACCAA GTTTCTCAAC AAAGGTCTCA TTCAGACTCG GTTGATGTTC AGAAACAAAA GTTCGCAGCC AAGGGACTCA Arachis hypogaea TACTGAATCT GTTGCTGCTC AAAAGCAAAA GTTTGCTGCA AAGGGTCTCA Lycopersicon esculentum TCTGGAATCA ATTGCTGTTC ATAGGCAGAA GTTTGCTGAT AAAGGTCTCA Spinacia oleracea TTTTGACTCT GTTGATGTTC AGAAACAAAA GTTCACAGCC AAGGGCCTCA Phaseolus vulgaris Cichorium intybus TAAAGATTCA ATTCAGCTTC TCAAGCAAAA GTTCATTGAA AAAGGACTTA Consensus Ta..GA.TC. aTTgatgTtC a.AagcaaAA GTTcactga. AAaGG.CTcA 751 800 CAGTGAAAGA CCTTGTTCTT CTTAGTGGTG CACATACAAT TGGAACCACA Glvcine max ACACACAAGA CCTTGTTACT CTTGTAGGTG GACACACCAT TGGAACTTCG Arachis hypogaea Lycopersicon esculentum ACACTCAAGA TCTTGTCACC CTTGTTGGTG GGCACACAAT TGGAACCTCA Spinacia oleracea ATGATCATGA TCTTGTTACA CTTGTTGGTG CACACACCAT TGGACAAACA Phaseolus vulgaris ACACTCAGGA CCTCGTCACC CTTCTTGGTG CACATACCAT TGGAACTACA Cichorium intybus ACGACAAAGA CCTTGTGGTT CTCAGTGCTG CTCACACTAT TGGTACAACC Consensus acg..cAaGA cCTtGT.act CTt.tTGqTG caCAcAC.AT TGGaac.aCa

	801				850
Glycine max	GCGTGCTTCT	TTATGACCAG	AAGACTGTAC	AACTTTTTCC	CAAGTGGTGA
Arachis hypogaea	GAATGCCAAT	TCTTCAGTAA	CAGATTGTTC	AACTTCAATG	GAACTGCTGC
Lycopersicon esculentum	GCATGCCAAT	TCTTCAGCTA	CAGGCTATAC	AATTTCAACT	CCACTGGTGG
Spinacia oleracea	GACTGCAGAT	TCTTCCAATA	CAGACTATAC	AATTTCACAC	CAACAGGCAA
Phaseolus vulgaris	GCTTGCCAGT	TTTTCAGTAA	CAGATTATAC	AACTTCACTG	CAAATGGTC.
Cichorium intybus	GCATGCTTCT	TCAT			
Consensus		TetTea a	caga t tac	aa ttra	caa toot
Compensas	60.1601	iccicaa	caga.c.cac	<i>aa.ccca</i>	caa.cggc
	851				900
Glycine max	GGGATCAGAC	CCACCAATTA	CACAAAACTT	CCTCCCTCCC	CTAAACCCAA
drachia humanan	GGGATCAGAC	CCHGCAATTA	ACCOMMCANT		CTARAGGCAR
Arachis hypogaea	CC CTCAC	COMPONING	ACCCITCATT	TGTTTCAAAT mcmmmcmcaa	CIACAAGCAC
Lycopersicon escurencum	CCCIGAC	COTTCAATAG	AIGCAACCII	CITICICAG	CIICAAGCAI
Spinacia dielacea	CGCTGAT	CUTICAATTA	ACCAACCAAA	CATAGCCCAA	CTACAAACGI
Phaseolus Vulgaris	CIGAT	TETTETATEG	ACCUTCATT	TUTTULAAUA	CTACAATCAC
<u>Cichorium intypus</u>	• • • • • • • • • • •		•••••		
Consensus	ctga.	.ct.c.at	a.cc.tt	tc	ctacaa.ca.
•	901				950
Glycine max	GGTGCCCTCA	GAATGGAGAT	GTTAATATTC	GCCTAGCTAT	TGATGAAGGG
Arachis hypogaea	TGTGCCCTCA	AAACACCGGT	GCTGCAAACC	GTGTTGCACT	CGATACCGGA
Lycopersicon esculentum	TATGTCCACA	AAACGGAGAT	GGCTCGAAGC	GTGTGGCACT	GGACACTGGA
Spinacia oleracea	TGTGTCCCAA	GAATGGCAAT	GGTTTAACCA	AGGTGGCATT	GGACAGAGAT
Phaseolus vulgaris	TGTGCCCACA	AAACGGTGAC	GGTTCAACCC	GAGTTGCCCT	AGACACGGGT
<u>Cichorium intybus</u>	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	
Consensus	tgtg.cc.ca	.aa.gg.ga.	g.tac	g.gt.gct	.ga.agg.
	951				1000
Glycine max	AGTGAGCAGA	AATTTGACAT	AAACATTTTG	AAGAACATAA	GGGAAGGTTT
Arachis hypogaea	AGCCAGTTCA	AATTTGATAC	GTCTTACTTC	TCTAATCTCA	GGAACCGTCG
Lycopersicon esculentum	AGCGTGAACA	ATTTTGACAC	CTCGTATTTC	TCTAACTTGA	GGAATGGTCG
Spinacia oleracea	AGCCGGACGA	AATTCGACGT	AAATTTCTTC	AAGAACATTA	GGGACGGAAA
Phaseolus vulgaris	AGTCAAAAAC	TATTTGATTT	ATCTTACTAT	AACAATTTGA	GGAAAGGACG
<u>Cichorium intybus</u>					
Consensus	ag	.atttgat	att	aa.aat.a	gg.a.gg
	1001				1050
Glycine max	TGCTGTGCTA	GAATCTGATG	CCAGACTCAA	TGATGACATA	GCCACCAAGA
Arachis hypogaea	TGGAGTCCTG	CAATCTGATC	AAGCACTATG	GAATGATCCT	TCCACAAAGA
Lycopersicon esculentum	GGGAATTCTG	GAATCAGACC	AGATATTGTG	GACCGATGCT	TCGACCAAGG
Spinacia oleracea	CGCCGTGCTC	GAATCGGATC	AAAGACTATG	GGGTGATGAT	GCAACTCAAG
Phaseolus vulgaris	TGGAATT				
<u>Cichorium intybus</u>					
Consensus	.gt				
	5				
	1051				1100
Glycine max	ATGTCATTGA	CTCCTACGTT	TCTCCCTTCA	GTCCAATGTT	TGGGCCTTCT
Arachis hypogaea	GCTTTGTGCA	AAGATATTTG	GGCCTAA	GAGGCTTTCT	TGGCTTGACA
Lycopersicon esculentum	TGTTTGTCCA	AAGGTATTTA	GGCCTCA	GGGGATTTCT	TGGATTGAGA
Spinacia oleracea	CAATTGTGCA	AAATTATGCA	GGAAATCTTA	GAGGGTTGTT	TGGTGTTAGG
Phaseolus Vulgaris					
Cichorium intybus					
Consensus					
compensus					
	1101				1150
Glucino may	ትት እት ጥጥጥር ል ል ር ር ጥር	; <u></u> ልሞሞሞር-ጥጥር-ኦ	GTCAGTTGTG		
Arachie humogana	TTTCAAmamma		CTCTATCCTT		ACATTGGGGT
Lyconersicon esculentum					
Chinadia alorada		ARTIIGGAAA	ACCUNECCURE		CONTROCTOR
	TTTAATTTT	, ATTICCTAA	A AGCIAIGGII	ANGAIGAGUG	GCALIGGIGI
Cichorium intertus	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	
<u>cichorium intypus</u>		• • • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	
Consensus					

	1151				1200
Glycine max	CAAGACAGGT	TTCCTTGGAG	AGATTAGGCG	CGTGTGTTCA	GCTTTTAATT
Arachis hypogaea	CAAGACTGGC	ACTGATGGTG	AAATCCGCAA	GATTTGTTCT	GCTTTTAACT
Lycopersicon esculentum	TTTGACAGGG	ACTAATGGTG	AAATTCGTAA	AGTTTGCTCT	GCATTCAACT
Spinacia oleracea	TAAGTCTGGT	TCTGATGGTG	AGGTTAGAAA	GATGTGTTCT	AAGTTTAATT
Phaseolus vulgaris	• • • • • • • • • • •				
<u>Cichorium intybus</u>		, .			
Consensus					
	1201				1250
Glycine max	GAAGTAAATA	TGCAATTAAT	GATCAATTGG	TCATAATAAA	A.ATGTATGG
Arachis hypogaea	AATGAA . ATG	TTTGTTTAAG	TGTATT	CATAGGTATA	TTTGTTA.GT
Lycopersicon esculentum	GATGCATATA	TGTATATACT	AATTAG	TTTCGTTCAG	TTAGGCA . AG
Spinacia oleracea	AATTGAATGT	TATTTTAAT	TTGGTTGT	TCCCAATAAA	TCATTTGTGT
Phaseolus vulgaris					
<u>Cichorium intybus</u>					
Consensus					
	1251				1300
Glycine max	CTTCTAGATA				
Arachis hypogaea	CTTATTGATT	TTT.TTTTCT	TTGTTTATTG	TTTCTCTATA	AGAGAATCAA
Lycopersicon esculentum	CTGCAAGATA	AAT.TGTTAG	TTATATCCAA	TATCAATA.A	ATAAAAGCAT
Spinacia oleracea	CTTAAAGGTA	CATGTAATCT	ATGGTCTCTA	TGTTTCAGAA	TTAGACCTAT
Phaseolus vulgaris	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • •		· · · · · · · · · · · ·	
<u>Cichorium intybus</u>	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •		
Consensus					• • • • • • • • • •
	1301				1350
Glycine max	• • • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	
Arachis hypogaea	TTTCCAAGTG	TAATAGTTCC	ААТАААТААТ	ATCACATGTT	TTTTATT
Lycopersicon esculentum	TTACCCACTG	TTTTTTTTTT	ΤΤ		• • • • • • • • • •
Spinacia oleracea	AGATAAGCCG	AACACAAAAG	AAAAGTTAAT	TTCAAATGAT	АААААААААА
Phaseolus vulgaris				• • • • • • • • • • •	
<u>Cichorium intybus</u>	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •			
Consensus					
	1351				

Glycine max	
Arachis hypogaea	
Lycopersicon esculentum	
Spinacia oleracea	ААААААА
Phaseolus vulgaris	
<u>Cichorium intybus</u>	
Consensus	

Annexe 3: Alignement de la séquence en acides aminés déduite à partir de la séquence de l'ADNc de *Cichorium intybus* avec les séquences en acides aminés de *Glycine max* (Harris N. et al. 1999), *Arachis hypogaea* (Buffard D. et al. 1991), *Lycopersicon esculentum* (Gadea J. et al. 1996), *Spinacia oleracea* (Simon P. 1997) et *Phaseolus vulgaris* (Blee K.A. et al. 1999). La séquence de *Cichorium intybus* est soulignée. Les cadres indiquent les zones conservées (I à IV). c= cystéine conservée. h= histidine conservée.

Ę

Multalin version 5.3.3 Copyright I.N.R.A. France 1989, 1991, 1994, 1996 Published research using this software should cite Multiple sequence alignment with hierarchical clustering F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res., 16 (22), 10881-10890 Symbol comparison table: blosum62 Gap weight: 12 Gap length weight: 2 Consensus levels: high=90% low=50% Consensus symbols: ! is anyone of IV \$ is anyone of LM % is anyone of FY # is anyone of NDQEBZ

MSF:	341	Check:	0	••					
Name:	Glycine	max		Len:	341	Check:	6163	Weight:	0.99
Name:	Arachis	hypogaea		Len:	341	Check:	6648	Weight:	0.42
Name:	Lycopers	icon escu	lentum	Len:	341	Check:	5234	Weight:	0.42
Name:	Spinacia	n oleracea		Len:	341	Check:	1707	Weight:	0.83
Name:	Phaseolu	ıs vulgari	S	Len:	341	Check:	8142	Weight:	1.33
Name:	Cichoriu	um intybus	f	Len:	341	Check:	8661	Weight:	2.01
Name:	Consensu	s		Len:	341	Check:	3531	Weight:	6.00

11

	1				50
Glycine max	VSVLFGVFHI	PLHTCIVVMA	LFVLSLLFFS	FLMGSSESQL	QVGFYSNTCP
Arachis hypogaea	MEGV	FNNKKFIL	VFVFMLGLCI	GITTVHGQGT	RVGFYSRTCP
Lycopersicon esculentum	MEYY	NYNLINKMVT	IIFILVLVIV	DVTMVFGQGT	RVGFYSSTCP
Spinacia oleracea				.LANSAKSQL	SIAYYASSCP
Phaseolus vulgaris					FYSSSCP
<u>Cichorium_intybus</u>					
Consensus					fyscp
	51		<u>h h</u>	c c	100
Glycine max	QVDSIIRAVV	RDAVLSDPNM	AAVLLRUHFH	DCFAQGCDGS	ILIENGPQSE
Arachis hypogaea	RAESIVRSTV	RSHVNSDPTL	AAKILRMHFH	DCFVQGCDGS	ILI.SGPATE
Lycopersicon esculentum	RAESIVQSTV	RSHFQSDPTV	APGLLRMHFH	DCFVQGCDGS	ILI.SGTGTE
Spinacia oleracea	QAEGIVRSTV	QSHFNSDPTI	APGLLRUHFH	DCFVQGCDAS	ILI.SGTSSE
Phaseolus vulgaris	RAESIVKSTV	QSHVKSDSTL	AAGLLRMHFH	DCFVQGCDGS	VLI. SGANTE
<u>Cichorium intybus</u>			<u>HFH</u>	DCFVEGCDGS	ILIDNGKDSE
Consensus	.aesiv.stv	.shsd.t.	allr.HFH	DCFv#GCDgS	!LI.nGsE
				m	
	101		С	c	150
---	-------------------	-------------	-------------	--	-------------
Glycine max	RHAFGHQGVR	GFEVIERAKA	QLEGSCPGLV	SCADIVALAA	RDAVVMANGP
Arachis hypogaea	KTAFANLGLR	GYEIIDDAKT	QLEAACPGVV	SCADILALAA	RDSVVLSGGL
Lycopersicon esculentum	RTAPPNSNLR	GFEVIDDAKQ	QIEAVCPGVV	SCADILALAA	RDSVLVTKGL
Spinacia oleracea	RTAFTNVGLK	GFDVIDDAKA	QVESVCPGVV	SCADILALAA	RDSVDLTGGP
Phaseolus vulgaris	KTAFANLGLR	GFEVVDDAKT	QLEAACPGVV	SCADILALAA	RDSVVLSGGL
<u>Cichorium intybus</u>	<u>RLAFAHOGVO</u>	GYDVIENAKA	KLESVCPGVV	SCSDIVAMAA	RDAVAFSRGP
Consensus	rtAFanqGlr	G%#V!#dAKa	qlE.vCPGvV	SCaDIlA\$AA	RDaVs.Gp
				an a	
	15 <u>1</u>			(11)	200
Glycine max	AYQVPTGRRD	GLVSNLSLAD	DMPDVSDSIE	LLKTKFLNKG	LTVKDLVLLS
Arachis hypogaea	SWQVPTGRRD	GRVSQASDVS	NLPAPSDSVD	VQKQKFAAKG	LNTQDLVTLV
Lycopersicon esculentum	TWSVPTGRTD	GRVSSASDTS	NLPGFTESVA	AQKQKFAAKG	LNTQDLVTLV
Spinacia oleracea	NWGVPLGRLD	GKRSSASDAV	NLPSPLESIA	VHRQKFADKG	LNCHOLVTLV
Phaseolus vulgaris	SYQVPTGRRD	GRISQASDVS	NLPAPFDSVD	VQKQKFTAKG	LNTQDLVTLL
<u>Cichorium intybus</u>	<u>VYEVETGRKD</u>	GLVSNLNLAD	RMPDVKDSIO	LLKOKFIEKG	LNEKDLVVLS
Consensus	.y.VptGR.D	GlvSnasdad	n\$Pdv.#S!.	llkqKFKG	Ln.kDLVtLs
					(IV)
	(111)				
	2 d1 c				250
Glycine max	GAHTIGTTAC	FFMTRRLYNF	FPSGEGSDPA	IRQNFLPRLK	ARCPQNGDVN
Arachis hypogaea	GGHTIGTSEC	QFFSNRLFNF	NGTA.AADPA	IDPSFVSNLQ	ALCPQNTGAA
Lycopersicon esculentum	GGHTIGTSAC	QFFSYRLYNF	NSTG.GPDPS	IDATFLSQLQ	ALCPQNGDGS
Spinacia oleracea	GAHTIGQTDC	RFFQYRLYNF	TPTG.NADPS	INQPNIAQLQ	TLCPKNGNGL
Phaseolus vulgaris	GAHTIGTTAC	QFFSNRLYNF	TANGPDSS	IDPSFLPTLQ	SLCPQNGDGS
<u>Cichorium intybus</u>	AAHTIGTTAC	<u></u> FF			
Consensus	gaHTIGttaC	fffrlynf	gd	iflq	.lcpqng
(IV)					
	251				300
Glycine max	IRLAIDEGSE	QKFDINILKN	IREGFAVLES	DARLNDDIAT	KNVIDSYVSP
Arachis hypogaea	NRVALDTGSQ	FKFDTSYFSN	LRNRRGVLQS	DQALWNDPST	KSFVQRYLG.
Lycopersicon esculentum	KRVALDTGSV	NNFDTSYFSN	LRNGRGILES	DQILWTDAST	KVFVQRYLG.
Spinacia oleracea	TKVALDRDSR	TKFDVNFFKN	IRDGNAVLES	DQRLWGDDAT	QAIVQNYAGN
Phaseolus vulgaris	TRVALDTGSQ	KLFDLSYYNN	LRKGRGI		
<u>Cichorium intybus</u>					
Consensus	.rvald.gs.	fdn	.r.g		
	3	01			341
Gly	rcine max F	SPMFGPSFE A	DFVESVVKM G	QIGVKTGFL G	EIRRVCSAF N
Arachis hypogaea LRGFLGLTFN VEFGKSMVKM SNIGVKTGTD GEIRKICSAF N					
Lycopersicon esculentum LRGFLGLRFG LEFGKSMVKM SNIEVLTGTN GEIRKVCSAF N					
Spinacia oleracea LRGLFGVRFN FDFPKAMVKM SGIGVKSGSD GEVRKMCSKF N					
Phaseolus vulgaris					
<u>Cichorium intybus</u>					
C	onsensus .				

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE:

Cette bibliographie rassemble toutes les références hors articles.

- Angelini R., Federico R. (1989). Histochemical evidence of polyamine oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall. *J. Plant Physiol.* 135: 212-217
- Barabas N.K., Erdei L. (1994). Enzyme assays: catalase, peroxidase and superoxide dismutase in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under salt, osmotic and heavy metal stresses. *Biol. Plant* 36: S259
- Bisbis B., Kevers C., Penel C., Greppin H., Gaspar T. (1998). Biosynthesis of tetrapyrrole-containing compounds, including peroxidases, in a non- chlorophyllous fully habituated sugarbeet callus via the unique Shemin pathway. *Plant peroxidase newsletter* 11: 19-26
- Bolwell G.P., Butt V.S., Davies D.R., Zimmerlin A. (1995). The origin of the oxidative burst in plants. *Free Rad. Res.* 23: 517-532
- Bouazza A., Rambour S., Gaspar T., Legrand B. (1993). Peroxidases during the course of callusing and organ differentiation from root explants of *Cichorium intybus*. *Biol. Plant.* 35: 481-489
- Boyer N., Gaspar Th., Lamond M. (1979). Modifications des isoperoxydases et de l'allongement des entrenoeuds de Bryone à la suite d'irritations mécaniques. Z. Pflanzen. Physiol. 93: 459-470
- Brewbaker J.L., Nagai C., Liu E.H. (1985). Genetic polymorphism of 13 maize peroxidases. J. Hered. 76: 159-167
- Bricage P. (1982). Pigmentation and soluble peroxidase isozyme patterns of leaves of *Pedilanthus tithymaloides* L. variegatus as a result of daily temperature differences. *Plant Physiol.* 69: 668-671
- Castillo F.J. (1992). Peroxidases and stress. In: Plant peroxidases 1980-1990. Topics and detailed literature on molecular, biochemical, and physiological aspects. C. Penel, Th. Gaspar, H. Greppin (eds). University of Geneva, Switzerland. pp 187-203

- Castillo F.J. (1994). Activité peroxydasique et pollution atmosphérique. Ph. D. Thesis. Univ. of Genève, Switzerland, 144 pages.
- Catesson A.M., Czaninski Y., Monties B. (1978). Caractères histochimiques des peroxydases pariétales dans les cellules en cours de lignification. C.R. Acad. Sci. Paris 286: 1787-1790
- **Chang C.J., Kao C.H. (1998).** H₂O₂ metabolism during senescence of rice leaves: changes in enzyme activities in light and darkness. *Plant Growth Reg.* 25: 11-15
- Chibbar R.N., van Huystee R.B. (1986). Site of haem synthesis in cultured peanut cells. *Phytochemistry* 25: 585-587

Chrispeels M.J. (1991). Sorting of proteins in the secretory system. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 21-53

- Clijsters H., Van Assche F., Cardinaels C. (1984). Relation between heavy metal toxicity and enzyme activity. Wiss Zeitschr Humboldt Univ. Berlin Math. Nat. 33: 326-327
- Converso D.A., Fernandez M.E., Tomaro M.L. (1997). Effect of development and salt stress on the activity and expression of wheat peroxidases. *Phyton (Int. J. Exp. Bot. Arg.)* 61: 147-154
- **Coppens L., DeWitte D. (1990)**. Esterase and peroxidase zymograms from barley (*Hordeum vulgare* L.) callus as a biochemical marker system of embryogenesis and organogenesis. *Plant Science* 67: 97-106
- Cross A.R., Jones O.T.G. (1991). Enzymic mechanisms of superoxide production. Biochim. Biophys. Acta 1057: 281-298
- Czaninski Y. (1978). Localisation ultrastructurale d'activités peroxydasiques dans les parois du xylème du blé pendant leur différenciation. C.R. Acad. Sci. Paris 286: 957-959
- Czaninski Y., Catesson A.M. (1969). Localisation ultrastructurale d'activités peroxydasiques dans les tissus conducteurs végétaux au cours du cycle annuel. J. Microsc. 8: 875-888.

- Czaninski Y., Sachot R.M., Catesson A.M. (1993). Cytochemical localization of hydrogen peroxide in lignifying cell wall. Ann. Bot. 72: 547-550
- Dai G., Yan B., Huang S., Liu X., Peng S., Miranda M.L.L., Chavez A.G.,
 Vergara B.S., Olszyk D.M. (1997). Response of oxidative stress defense system
 in rice (*Oryza sativa*) leaves with supplement UV-B radiation. *Physiol. Plant* 101: 301-308
- Dencheva A., Klisurka D. (1981). Interaction between peroxidase and IAA-oxidase in the course of growth and differentiation of plant cells. *Physiol. Veg.* 2: 385-394
- Diaz J., Merino F. (1998). Wound-induced shikimate dehydrogenase and peroxidase related to lignification in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves. J. Plant Physiol. 152: 51-57
- Doke N., Miura Y., Sanchez L.M., Park H.J., Noritake T., Yoshioka H.,
 Kawakita K. (1996). The oxidative burst protects plants against pathogen attack:
 Mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence. A review. *Gene* 179: 45-51
- Dubois T., Droujininski A., Vasseur J. (1988). Croissance et potentialités organogènes de suspension cellulaires de *Cichorium intybus* L. var Witloof. *Bulletin de la société botanique de France* 135: 311-322
- Elstner E.F., Heupel A.L. (1976). Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.). *Planta* 130: 175-180
- Endo T., Morishima H. (1983). Rice. Isoenzymes in plant genetics and breeding. Part B.In: S.D. Tanksley, T.J. Orton (eds), Elsevier, Amsterdam. pp 129-146
- Espelie K.E., 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., 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., Ros Barceló A. (1994). Control of the lignification in *Lupinus* by genistein acting as superoxide scavenger and inhibitor of the peroxidase-catalysed oxidation of coniferyl alcohol. *J. plant Physiol.* 144: 64-67
- Fry S.C. (1987). Formation of isodityrosine by peroxidase isozymes. J. Exp. Bot. 38: 853-862
- Galston A.W. (1959). Studies on indoleacetic acid oxidase inhibitor and its relation to photomorphogenesis. In: Photoperiodism and related phenomena in plants and animals. pp 137-157. Washington, DC: A.A.A.S.
- Galston A.W., Dalberg L.Y. (1954). The adaptive formation and physiological significance of indoleacetic acid oxidase. *Amer. J. Bot.* 40: 373-380
- Gaspar T., Bisbis B., Kevers C., Penel C., Greppin H., Le Dily F., Billard J.P., Huault C., Garnier F., Rideau M., Foidart J.M. (1998). Atypical metabolisms and biochemical cycles imposing the cancerous state on plant cells. Plant *Growth Regul* 13: 257-261
- Gaspar T., Bouchet M. (1980). Peroxidase, IAA-oxidase, and auxin protectors from Pelargonium. *Plant Biochem. J.*, S.M. Sircar memorial vol., pp. 63-68
- Gaspar T., Penel C., Castillo F.J., 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 T., Penel C., Thorpe T., Greppin H (1982). Peroxidase 1970-1980. A survey of their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants. Univ. Genève 324 pages.
- Geissman T.A., Grout D.H.G. (1969). Organic chemistry of secondary plant metabolism. Freeman, Cooper, California, 592 pages.
- Giacomelli M., Cervigni T. (1964). Changes in peroxidase activity, ascorbic acid content in *Vicia sativa* grown under chronic gamma irradiation. *Radiat Bot.* 4: 395-403
- Goldacre P.L. (1961). Indolacetic acid oxidase-peroxidase of peas. In: R. Klein (ed). Plant Growth Regulation, Ames: The Iowa State Univ. Press

- Goldberg R., Le T, 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
- Grabber J.H., Ralph J., Hatfield R.D., Quideau S., Kuster T., Pell A.N. (1996). Dehydrogenation polymer-cell wall complexes as a model for lignified grass walls. J. Agric. Food Chem. 44: 1453-1459
- Halliwell B. (1978). Lignin synthesis: The generation of hydrogen peroxidase and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols. *Planta* 140: 81-88
- Hapiot P., Pinson J., Neta P., Francesch C., Mhamdi F., Rolando C.,
 Schneider S. (1994). Mechanism oxidative coupling of coniferyl alcohol.
 Phytochemistry 36: 1013-1020
- Hare R.C. (1964). Indole acetic acid oxidase. Bot. Rev. 30: 129-165
- Haschke R.H., Friedhoff J.M. (1978). Calcium-related properties of horseradish peroxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 1039-1042
- Heath R.L. (1980). Initial events in injury to plants by air pollutants. Ann. Rev. Plant Physiol. 31: 395-431
- Henderson L.M., Chappell J.B. (1996). NADPH oxidase of neutrophils. Biochem. Biophys. Acta 1273: 87-107
- Hendriks T., Vinkenoog R., Wijsman H.J.W. (1985). Genetics of the peroxidase isoenzymes in Petunia. Several loci involved in peroxidase synthesis. *Theor. Appl. Genet.* 70: 595-598
- Hepler P.K., Rice R.M., Terranova W.A. (1972). Cytochemical localization of peroxidase in wound vessel members of *Coleus. Can. J. Bot.* 50: 977-983
- Heyne A.N.J. (1933). Further investigations on the mechanism of cell elongation and the properties of cell walls in connection with elongation. *Protoplasma* 19: 78-96
- Higuchi T. (1990). Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* 24: 23-63

- Higuchi T. (1991). Biosynthesis of lignin. Dans: W. Tanner, F.A. Loewus (eds). Plant carbohydrates. II. Extracellular carbohydrates. Encyclopedia of plant physiology, Springer Verlag, Berlin. Vol 13B, pp 194-224
- Hoyle M.C. (1972). Indoleacetic acid oxidase: a dual catalytic enzyme? *Plant Physiol.* 50: 15-18
- Huh G.H., Lee S.J., Bae Y.S., Liu J.R., Kwak S.S. (1997). Molecular cloning and characterization of cDNAs for anionic and neutral peroxidases from suspension cultured-cells of sweet potato and their differential expression in response to stress. *Mol. Gen. Genet.* 255: 382-391
- Hull M.R., Long S.P., Jahnke L.S. (1997). Instantaneous and developmental effects of low temperature on the catalytic properties of antioxidant enzymes in two Zea species. *Austr. J. Plant Physiol.* 24: 337-343
- Kerby K., Sommerville S.C. (1992). Purification of an infection-related, extracellular peroxidase from barley. *Plant Physiol.* 100: 397-402
- Kevers C., Gaspar Th. (1985). Soluble, membrane and wall peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase, and lignin changes in relation with lignification of carnation tissues cultured in vitro. J. Plant Physiol. 118: 41-48
- Kim S.H., Terry M.E., Hoops P., Dauwalder M., Roux S.J. (1988). Production and characterization of monoclonal antibodies to wall-localized peroxidases from corn seedlings. *Plant Physiol.* 88: 1446-1453
- Knypl J.S., Chylinska K.M. (1974). Removal of IAA-oxidase inhibitors from carrot root extracts by grinding with insoluble polyvinylpyrrolidone. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 166: 333-343
- Lagrimini L.M. (1991). Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant Physiol.* 96: 577-583
- Lagrimini L.M., Burkhart W., Moyer M., 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. U.S.A.* 84: 7542-7546

- Lagrimini L.M., Rothstein S. (1987). Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* 84: 438-442
- Le Dily F., Kevers C., Huault C., Billard J.P. (1998). Le cal habitué de betterave sucrière: déviations métaboliques et cancérisation. Bull. Soc. Roy. Sc. Liège 67: 165-176
- Lee T.T. (1972). Interaction of cytokinin, auxin, and gibberellin on peroxidase isoenzymes in tobacco tissues cultured in vitro. *Can. J. Bot.* 50: 2471-2477
- Legrand B., Bouazza A. (1991). Changes in peroxidase and IAA-oxidase activities during adventitious bud formation from small root explants of *Cichorium intybus* L.: Influence of glucose. J. Plant Physiol. 138: 102-106
- Legrand B., Gaspar T., Penel C., Greppin H. (1976). Light and hormonal control of phenolic inhibitors of peroxidase in *Cichorium intybus* L. *Plant Biochem. J.* 3: 119-127
- Lew J.Y., Shannon L.M. (1973). Incorporation of carbohydrate residues into peroxidase isoenzymes in horseradish peroxidase roots. *Plant Physiol.* 52: 462-465
- Limam F., Chahed K., Ouelhazi N., Ghrir R., Ouelhazi L. (1998).
 Phytohormone regulation of isoperoxidases in *Catharanthus roseus* suspension cultures. *Phytochemistry* 49: 1219-1225
- Liners F., Gaspar T., Van Cutsem (1994). Acetyl-and methyl-esterification of pectins of friable and compact sugar-beet calli: consequences for intercellular adhesion. *Planta* 192: 545-556
- Linossier G. (1898). Contribution à l'étude des ferments oxydants. Sur la peroxydase du pus. C. R. Soc. Biol. 50: 373-375
- Mäder M., Ungemach J., Schloss P. (1980). The role of peroxidase isoenzyme groups of *Nicotiana tabacum* in hydrogen peroxide formation. *Planta* 147: 467-470
- Maldonado B.A., van Huystee R.B. (1980). Isolation of a cationic peroxidase from cultured peanut cells. *Can. J. Bot.* 58: 2280-2284
- Mali P.C., Mehta S.L. (1977). Effect of drought on enzymes and free proline in rice varieties. *Phytochemistry* 16: 1355-1357

- Markkola A.M., Ohtonen R., Tarvainen O. (1990). Peroxidase activity as an indicator of pollution stress in the fine roots of *Pinus sylvestris*. *Water Air Soil Pollut*. 52: 149-156
- Mattoo A.K., Lieberman M. (1977). Localization of the ethylene-synthesiszing system in apple tissue. *Plant Physiol.* 60: 794-799
- Mazza G., Ricard J., Bouchet M. (1970). Potentiels de demi-réduction et activité 'auxine-oxydasique' de peroxydase de navet (*Brassica napus* L.). C.R. Acad. Sc. Paris 270: 2492-2494
- Mazza G., Welinder K.G. (1980). Covalent structure of turnip peroxidase 7. Cyanogen bromide fragments, complete structure, and comparison to horseradish peroxidase C. *Eur. J. Biochem.* 108: 481-489
- Melo N.S., Cabral J.M.S., Pedro Fevereiro M. (1995). Extracellular peroxidases from cell suspension cultures of Vaccinium myrtillus. Purification and characterization of two cationic enzymes. Plant Science 106: 177-184
- Mittal R., Dubey R.S. (1991). Behaviour of peroxidases in rice: Changes in enzyme activity and isoforms in relation to salt tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* 29: 31-40
- Mohan R., Bajar A.M., Kolattukudy P.E. (1993). Induction of a tomato anionic peroxidase gene (*tap 1*) by wounding in transgenic tobacco and activation of *tap1*/GUS and *tap2*/GUS chimeric gene fusions in transgenic tobacco by wounding and pathogen attack. *Plant Mol. Biol.* 21: 341-354
- Mohan R., Kolattukudy P.E. (1990). Differential activation of expression of a suberization-associated anionic peroxidase gene in near-isogenic resistant and susceptible tomato lines by elicitors of *Verticillium albo atrum. Plant Physiol.* 92: 276-280

Morita Y., Yoshida C, Maeda Y. (1971). Properties and structures of peroxidase isoenzymes of Japanese-radish. *Agric. Biol. Chem.* 35: 1074-1083

Narita H., Asaka Y., Ikura K., Matsumoto S., Sasaki R. (1995). Isolation, characterization and expression of cationic peroxidase isozymes released into the medium of cultured tobacco cells. *Eur. J. Biochem.* 228: 855-862

126

- Neish A.C. (1968). Monomeric intermediates in the biosynthesis of lignin. Dans: Constitution and biosynthesis of lignin, K. Freudenberg and A.C. Neish, eds (New York: Springer-Verlag), pp 3-43
- O'Donnell J.P., Wan L., van Huystee R.B. (1992). Characterization of two forms of cationic peroxidase from cultured peanut cells. *Biochem. Cell Biol.* 70: 166-169
- Ogawa K., Kanematsu S., Asada K. (1997). Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: Their association with lignification. *Plant Cell Physiol.* 38: 1118-1126
- Ogawa S., Shiro Y., Morishima I. (1979). Calcium binding by horseradish peroxidase C and the heme environmental structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90: 674-678
- Olden K., Bernard B.A., Humphries M.J., Yeo K.T., White S.L., Newton S.A., Bauer H.C., Parent J.B. (1985). Function of glycoprotein glycans. *TIBS* 10: 78-82
- Olson P.D., Varner J.E. (1993). Hydrogen peroxide and lignification. *Plant J.* 4: 887-892
- Osakabe K., Koyama H., Kawai S., Katayama Y., Morohoshi N. (1994). Molecular cloning and the nucleotide sequences of two novel cDNAs that encode anionic peroxidases of *Populus Kitakammiensis*. *Plant Science* 103: 167-175
- Östin A. (1995). Metabolism of indole-3-acetic acid in plants with emphasis on nondecarboxylative catabolism. Ph. D. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Dept of Forest Genetics and Plant Physiology, Umeå. ISBN 91-576-4937-5
- Panagopoulos I., Bornman J.F., Björn L.O. (1990). Effects of ultraviolet radiation and visible light on growth, fluorescence induction, ultraweak luminescence and peroxidase activity in sugar beet plants. J. Photochem. Photobiol. B. Biol. 8: 73-87
- Penel C., Gaspar T., Greppin H. (1992). Plant peroxidases 1980-1990. Topics and detailed literature on molecular, biochemical and physiological aspects. Univ. Genève, Switzerland, 481 pages

- Pleniscar M., Bonner W.D., Storey B.T. (1967). Peroxidase associated with higher plant mitochondria. *Plant Physiol.* 42: 366-370
- Polle A., Otter T., Seifert F. (1994). Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol.* 106: 53-60
- Poux M. (1969). Localisation d'activités enzymatiques dans les cellules du méristème radiculaire de Cucumis sativus L. Activité peroxydasique. J. Microsc. 8: 855-866.
- Quiros C.F., McHale N. (1985). Genetic analysis of isoenzyme variation in diploid and tetraploid potatoes. *Genetics* 111: 131-145
- Ray P.M. (1960). The destruction of indoleacetic acid. III. Relationship between peroxidase action and indoleacetic acid oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 87: 19-30
- Reimmann C., Ringli C., Dudler R. (1992). Complementary DNA cloning and sequence analysis of a pathogen-induced putative peroxidase from rice. *Plant Physiol.* 100: 1611-1612
- Reineck D.M., Bandurski P.S. (1988). Auxin biosynthesis and metabolism. Dans: P.J. Davies, ed, Plant hormones and their role in plant growth and development, 24-42. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ.
- **Repka V., Fischerova I. (1997)**. Immunological identification of a basic homologue to acidic virus-inducible cucumber peroxidase. *Acta Virol.* 41: 139-143
- Ricard J., Mazza G., Williams R.J.P. (1972). Oxidation-reduction potentials and ionization states of two turnip peroxidases. *Eur. J. Biochem.* 28: 566-578
- Rick C.M. (1983). Tomato. Isoenzymes in plant genetics and breeding. Part B. Dans Tanksley S.D., Orton T.J. (eds). Elsevier, Amsterdam. pp 147-165
- Robert D., Roland J.C. (1989). Biologie végétale. Tome 1. Organisation cellulaire. Doin (Eds). 265 pages
- Rodríguez-Marañón M.J., Stillman M.J., van Huystee R.B. (1993). Codependency of calcium and porphyrin for an integrated molecular structure of peanut peroxidase. A circular dichroism analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194: 326-332

- Ros Barceló A. (1995). Peroxidase and not laccase is the enzyme responsible for cell wall lignification in the secondary thickening of xylem vessels in *Lupinus*. *Protoplasma* 186: 41-44
- Ros Barceló A. (1997). Lignification in plant cell walls. Inter. Rev. Cytol. 176: 87-132
- Ros Barceló A., Morales M., Pedreño M.A. (1997). Specific compartmentalization of peroxidase isoenzymes in relation with lignin biosynthesis in the plant cell. Dans: Lignin and lignan biosynthesis (N.G. Lewis and S. Sarkanen, eds), ACS Symp. Series. Am. Chem. Soc., Washington, DC.
- Sairam R.K., Deshmukh P.S., Shukla D.S. (1997). Tolerance of drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. J. Agron. Crop. Sci. 178: 171-178
- Schneider S. (1994). Mechanism of oxidative coupling of coniferyl alcohol. *Phytochemistry* 36: 1013-1020
- Sequeira L., Mineo L. (1966). Partial purification and kinetics of indoleacetic acid oxidase from tobacco roots. *Plant Physiol.* 41: 1200-1208
- Shannon L.M., Kay E., Lew J.Y. (1966). Peroxidase isozymes from horse radish roots. I. Isolation and physical properties. J. Biol. Chem. 241: 2166-2172
- Sherf B.A., Kolattukudy P.E. (1993). Developmentally regulated expression of the wound- and pathogen- responsive tomato anionic peroxidase in green fruits. *Plant J.* 3: 829-833
- Siegel B.Z (1993). Plant peroxidases-an organismic perspective. *Plant Growth Regulation* 12: 303-312
- Siegel B.Z., Galston A.W. (1967). Indoleacetic acid oxidase activity of apoperoxidase. Science 157: 1557-1559
- Simon P. (1992). Molecular cloning of plant peroxidase. In: Plant peroxidases 1980-1990, Topics and detailed literature on molecular, biochemical, and physiological aspects. Penel C., Gaspar T., Greppin H. (eds) University of Geneva pp 47-58
- Smith C.G., Rodgers M.W., Zimmerlin A., Fernandino D., Bolwell G.P. (1994). Tissue and subcellular immunolocalisation of enzymes of lignin synthesis in

differentiating and wounded hypocotyl tissue of french bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta* 192: 155-164

- Takahama U. (1993). Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics by ascorbic acid: Different effects of ascorbic acid on the oxidation of coniferyl alcohol by the apoplastic soluble and cell wall-bound peroxidases from epicotyls of *Vigna* angularis. Plant Cell Physiol. 34: 809-817
- Terashima N. (1990). A new mechanism for formation of a structurally ordered protolignin macromolecule in the cell wall of tree xylem. J. Pulp Paper Sci. 16: 150-155
- Theorell H. (1940). Reversible splitting of peroxidase. Ark. Kemi. Min. Geol. 14B 20: 1-3
- Thimann K.V., Skoog F. (1934). Inhibition of bud development and other functions of growth substances in *Vicia faba*. *Proc. Roy. Soc.* (London) Series B: 317-339
- Tollier M.T., Lapierre C., Monties B., Francesh C., Rolando C. (1991). Structural variations in synthetic lignin (DHPs) according to the conditions of their preparation. Dans: Proc. Int. Symp. Wood Pulping Chem., Parkville, Victoria. pp 35-40
- Van Den Berg B.M., Chibbar R.B.N., van 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 Huystee R.B. (1976). A study of peroxidase synthesis by means of double labelling and affinity chromatography. *Can. J. Bot.* 54: 876-880
- Weinstein J.D., Beale S.I. (1983). Separate physiological roles and subcellular compartments for two tetrapyrrole biosynthetic pathways in *Euglena gracilis*. J. Biol. Chem. 258: 6799-6807
- Welinder K.G. (1979). Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. Amino and carboxyl termini, cyanogen bromide and tryptic fragments, the complete sequence, and some structural characteristics of horseradish peroxidase C. *Eur. J. Biochem.* 96: 483-502
- Whetten R., Sederoff R. (1995). Lignin biosynthesis. Plant cell 7: 1001-1013

- Yamasaki H., Sakihama Y., Ikehara N. (1997). Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiol.* 115: 1405-1412
- Yamauchi N., Xia X.M., Hashinaga F. (1997). Involvement of flavonoid oxidation with chlorophyll degradation by peroxidase in wase satsuna mandarin fruits. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 66: 283-288
- Yamazaki I., Yokota K., Nakajuma R. (1965). Oscillatory oxidation of reduced pyridine nucleotide by peroxidase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 21: 582-586
- Yi S.Y., Hwang B.K. (1998). Molecular cloning and characterization of a new basic peroxidase cDNA from soybean hypocotyls infected with *Phytophthora sojae* f.sp. glycines. Mol. Cells 8: 556-564
- Zhang Z., Collinge D.B., Thordal-christiansen H. (1995). Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant J.* 8: 139-145
- Zheng X., van Huystee R.B. (1991). Oxidation of tyrosine by peroxidase isozymes derived from peanut suspension culture medium and by isolated cell walls. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 25: 35-43

