

MÉTABOLISME AUXINIQUE ET RHIZOGÉNÈSE.  
II. ACTIVITÉS AUXINES-OXYDASIQUE, PEROXYDASIQUE  
PHÉNOLOXYDASIQUE ET NAPHTOLOXYDASIQUE CHEZ  
IMPATIENS BALSAMINA L.

par M. BASTIN (\*)

SUMMARY

Extracts of *Impatiens balsamina L.* have been purified by acetone precipitation. Purified extracts showing IAA-oxidase activity with DCP and hydrogen peroxide exhibit peroxidase activity on galaiacol and on several peroxidase substrates.

They show no polyphenoloxidase activity.

It seems highly probable that a specific enzyme is responsible for the oxidation of hydroxy naphthalenic compounds.

In leaf tissues, peroxidase and IAA-oxidase activities do not run parallel during incubation time, but only when inhibitors are present, and are therefore considered to be one enzyme system. A possible interpretation of the results is that inhibitors are able to form complexes with the enzyme.

INTRODUCTION

Si la destruction enzymatique de l'acide  $\beta$ -indol-acétique (AIA) par certains extraits végétaux est un fait maintenant bien établi, de nombreuses questions restent, toutefois, encore posées quant à la nature et au mode d'action des enzymes intervenant dans le catabolisme auxinique.

Pour GALSTON, BONNER et BAKER (1953), les auxines-oxydases seraient un système double, composé d'une peroxydase et d'un enzyme flavonique. Des recherches ultérieures de KENTEN (1955) ont cependant révélé que la flavoprotéine n'est pas un composé

(\*) Stagiaire de recherches du F. N. R. S.

Présenté par M. Bouillenne-Walrand, le 15 octobre 1964.

essentiel du système AIA-oxydasique. Cet auteur, en effet, observe une oxydation rapide de l'auxine par une préparation peroxydasique du raifort dépourvue de flavoprotéine.

Chez certains champignons, l'oxydation de l'auxine semble être assurée par une laccase (LEGRAND, 1957) chez d'autres, par des phénoloxydases (FAHRAEUS et TULLANDER, 1956).

BRIGGS et RAY (1956), d'autre part, ont montré que la tyrosinase peut inactiver l'AIA de manière oxydasique, mais uniquement si du pyrogallol ou du catéchol sont ajoutés aux mélanges d'incubation.

TOMASZEWSKI (1959) a observé chez *Prunus* un système phénoloxydasique capable de détruire l'AIA *in vivo*. Dès lors, l'hypothèse d'une inactivation naturelle des auxines par les phénoloxydases ne tarda pas à s'imposer.

Cependant, en étudiant les modifications de l'activité auxines-oxydasique en présence de dérivés phénoliques divers, de nombreux travaux ont montré que les monophénols sont des accélérateurs de la réaction (GOLDACRE, GALSTON et WEINTRAUB, 1953) ; PILET et GALSTON, 1955 ; KENTEN, 1955 ; PILET, 1957 ; STUTZ, 1957 ; SACHER, 1962, 1963 ; GASPARD et BASTIN, 1963 ; ZENK et MULLER, 1963 ; GASPARD, LEYH et BASTIN, 1963), tandis que les diphenols, en ortho ou para, réduisent, retardent ou bloquent, selon leur concentration, la destruction de l'AIA par l'AIA-oxydase (GORTNER et KENT, 1953 ; WAYGOOD, OAKS et MAC LACHLAN, 1956 ; RABIN et KLEIN, 1957 ; SONDEHEIMER et GRIFFIN, 1960 ; WITHAM et GENTILE, 1961 ; PILET, 1964 ; GASPARD, BASTIN et LEYH, 1964).

Ainsi donc, le fonctionnement des auxines-oxydases varie d'un matériel à l'autre. Cependant, de nombreux travaux ont mis l'accent sur l'importance des phénols et des phénoloxydases dans le catabolisme auxinique.

Dans le but de préciser la nature des auxines-oxydases chez *Impatiens balsamina*, nous avons entrepris de purifier différents enzymes de cette plante. Le présent travail analyse et décrit quelques propriétés auxines-oxydasiques, phénoloxydasiques, peroxydasiques et naphtholoxydasiques (\*) de différents tissus.

(\*) Nous appelons *naphtholoxydase*, sans préjuger de sa spécificité, un enzyme responsable de l'oxydation de dérivés hydroxynaphtaléniques.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Culture du matériel biologique.

Après 3 heures d'imbibition dans de l'eau distillée, les graines d'*Impatiens balsamina* sont mises à germer sur ouate et papier filtre, imprégnés d'eau de la distribution. Les semis sont placés dans une étuve obscure à 27°C et à 80 % d'humidité relative. Dans nos conditions expérimentales, les graines germent après 3 jours ; après 6 jours, les plantules ont  $\pm$  8 cm de haut.

### 2. Purification des enzymes.

Les différents organes sont broyés dans l'acétone à 20°C avec un peu de sable fin. On recueille le précipité et le sable sur un filtre de verre fritté (G<sub>3</sub>) adapté à un Kitasato sous vide léger. Le précipité est de nouveau broyé dans l'acétone et récolté sur le filtre. Ces opérations sont répétées plusieurs fois, jusqu'à l'obtention d'une poudre blanche.

Au fur et à mesure des purifications, le sable resté dans le mortier n'est plus recueilli sur le filtre.

Par cette méthode, on élimine du matériel végétal toutes les substances solubles dans l'acétone. La poudre qui est constituée de membranes cellulaires, d'organites, de protéines et parmi celles-ci, les enzymes, est broyée dans 10 volumes de tampon phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 40 ml 10<sup>-1</sup>M. ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 ml 10<sup>-1</sup>M).

L'extrait est centrifugé (0°C, 8700 g pendant 10 minutes) de manière à précipiter les débris de membranes. Le surnageant est recueilli et conservé en glacière. Cet extrait constitue l'extrait brut. X ml de cet extrait sont additionnés de 10 X ml d'acétone à 20°C. Le mélange est centrifugé (0°C ; 8700 g ; 10 min.). Le culot est séché à la température du laboratoire, ensuite mis en suspension dans X ml de tampon phosphate de pH = 6,1. L'extrait est centrifugé (0°C ; 8700 g ; 10 min.) ; le surnageant est soit conservé en glacière, soit traité une seconde fois par l'acétone. Il constitue le stock d'enzyme purifié.

### 3. Purification des substances phénolées.

Les tissus sont broyés dans un mortier avec un peu de sable et quelques ml d'acétone à 20°C. La poudre et le sable sont arrêtés par un filtre de verre fritté (G<sub>3</sub>) adapté à un Kitasato sous vide. Le

filtrat acétonique est recueilli dans le Kitasato, évaporé jusqu'à sec et repris dans un volume minimum de solvant.

A l'aide d'une micropipette, l'extrait est déposé sur le papier (Whatman n° 1). En même temps, on dépose aussi des phénols de référence. Le papier est ensuite placé dans la cage à chromatographie. Après 5 heures (équilibration), il est mis en contact avec le solvant et on procède à la chromatographie descendante en utilisant comme phase le mélange : butanol, acide acétique, eau (4-1-5). Après séparation chromatographique, le papier est découpé en bandes étroites, correspondant chacune à une fraction de Rf donné. On procède ensuite à l'élution de ces bandes en utilisant, comme solvant, l'eau distillée ou l'extrait enzymatique purifié selon les méthodes décrites plus haut.

#### 4. *Mesure des activités enzymatiques.*

##### a) *Activité naphthoxydasique.*

1 ml de l'extrait enzymatique est additionné de 8 ml tampon phosphate pH = 6,1 et de 1 ml d'une solution aqueuse du dérivé hydroxynaphtalénique, purifié ou non par chromatographie. L'activité enzymatique est établie en mesurant, après des temps déterminés, l'absorption de la naphtoquinone formée (spectrophotomètre, 450 m $\mu$ ).

##### b) *Activité auxines-oxydasique.*

La dégradation de l'AIA est suivie colorimétriquement au spectrophotomètre de Beckman (BOUILLENNE-WALRAND, LEYH et GASPARD, 1963). Les solutions actives sont mises à incuber à l'obscurité et à 25°C. Après des temps déterminés, on pipette 1 ml de chacune des solutions que l'on ajoute à 6 ml de réactif de Salkowski. La densité optique, mesurée après 20 minutes, au spectrophotomètre et à 535 m $\mu$ , permet de calculer la quantité d'AIA restant en solution. Un simple calcul établi (en %) la quantité d'AIA détruit en fonction de la durée de l'incubation.

##### c) *Activité phénoloxydasique.*

L'extrait enzymatique (4 ml) est additionné de 1 ml d'une solution de DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine) 10<sup>-2</sup>M. On dose au spectrophotomètre et à 480 m $\mu$  la quantité de quinones formées par oxydation.

d) *Activité peroxydasique.*

L'activité peroxydasique est établie en dosant au spectrophotomètre (420 m $\mu$ ) et après des temps déterminés, le produit d'oxydation du gaiacol (LANCE, 1963). Les solutions sont composées de :

- 1 ml d'extrait enzymatique
- 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,2 vol.
- 1 ml gaiacol 1 %
- 7 ml tampon phosphate pH = 6,1.

Les absorptions sont mesurées par rapport à un témoin dans lequel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est remplacé par de l'eau distillée.

5. *Expression des résultats.*

Afin de caractériser par un chiffre la valeur d'une activité enzymatique, nous exprimons cette activité soit par la surface qu'engendrent les courbes cinétiques, soit par la valeur de la vitesse initiale de réaction.

Le pouvoir effecteur auxines-oxydasique des composés phénoliques testés est exprimé par l'indice S proposé par GASPARD, PILET et BASTIN (1964). L'indice S d'une substance est la valeur relative, considérée pour toute la durée de l'incubation, en % par rapport à l'activité auxines-oxydasique de l'extrait témoin, de l'activité du même extrait en présence de cette substance ou d'un extrait étranger.

Rappelons le calcul de S :

$$S = \frac{(X_{Ph}^{30'} + X_{Ph}^{60'} + X_{Ph}^{90'} + \frac{1}{2}X_{Ph}^{120'}) - (X_T^{30'} + X_T^{60'} + X_T^{90'} + \frac{1}{2}X_T^{120'})}{X_T^{30'} + X_T^{60'} + X_T^{90'} + \frac{1}{2}X_T^{120'}} \cdot 100$$

## RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. *Oxydation hydroxynaphtalénique.*

Dans le but d'expliquer la formation de naphtoquinones chez *Impatiens balsamina*, nous avons recherché la présence, dans différents tissus de cette plante, d'un complexe enzymatique susceptible d'oxyder des dérivés hydroxynaphtaléniques.

On a constaté que les broyats aqueux de cotylédons, de racines et d'hypocotyles, incolores tout d'abord, jaunissaient très rapidement pour donner finalement une coloration rouge, caractéristique de certaines quinones.

Cette réaction ne se produisant pas en milieu acétonique, nous avons décidé d'employer la méthode de purification des enzymes par l'acétone pour séparer l'enzyme de son substrat naturel. Le filtrat acétonique contenant le substrat, il était facile de le purifier par chromatographie (Butanol, acide acétique, eau : 4-1-5) afin d'étudier la nature de la réaction enzymatique.

La bande de papier (Whatman n° 1) correspondant à l'intervalle de Rf (0,6-0,7) a été éluée dans une préparation enzymatique de cotylédons. Après quelques secondes, la solution se colore en jaune par formation de naphtoquinone (2-hydroxy-1, 4-naphtoquinone ; Rf : 0,9-1,0).

La substance chromatographiée (Rf = 0,6-0,7) est présente en grande quantité dans tous les extraits neutres d'*Impatiens balsamina*. Elle ne donne pas de coloration dans le visible, apparaît en bleu au U. V. sous l'action de NH<sub>3</sub> et réagit en rouge avec le réactif de HESS. Par hydrolyse (acide ou basique) ou par oxydation enzymatique, la substance se transforme en 2-hydroxy-1,4-naphtoquinone.

La présence de naphtoquinones chez les végétaux a été signalée par de nombreux auteurs. CLEVENGER (1958) a discuté la présence de trois dérivés naphtoquinoniques dans les fleurs d'*Impatiens balsamina*. Déjà, en 1948, LITTLE, SPROSTON et FOOTE avaient décrit l'extraction et l'identification de la 2-méthoxy-1,4-naphtoquinone à partir des fleurs de cette plante.

Une étude de BOHM et TOWERS (1962) sur les composés phénoliques du genre *Impatiens* a signalé la présence de nombreux acides phénoliques et de naphtoquinone chez 4 nouvelles espèces. Cependant la forme sous laquelle existe la naphtoquinone dans ces plantes n'a pas été précisée.

HAYES et THOMSON (1955) écrivent que la naphtoquinone de *Juglans regia* est sous la forme du 1, 4, 5-trihydroxynaphtalène, 4-glucoside. Par hydrolyse, le composé phénolique serait libéré et rapidement oxydé en quinone. Des travaux de RUELIUS et GAUHE (1951) ont montré qu'il existait, dans les parties vertes du péricarpe des noix, une phénoloxydase capable d'oxyder le 1, 4, 5-trihydroxynaphtalène. La présence d'un tel enzyme expliquerait la formation de naphtoquinones dans les tissus végétaux.

Ainsi, le précurseur de la naphtoquinone isolé et purifié à partir des tissus d'*Impatiens balsamina*, subirait sous l'action d'un complexe enzymatique, une oxydation de deux radicaux hydroxy en

position 1,4. La substance serait donc un dérivé du 1, 2, 4-trihydroxynaphtalène. La spécificité de l'enzyme pour un tel dérivé sera discutée plus loin.

TABLEAU I

Temps d'incubation (en heures)	6 ml tampon 2 ml H <sub>2</sub> O  3 feuilles 2 ml AIA 10 <sup>-3</sup> M	6 ml tampon 2 ml DCP 10 <sup>-3</sup> M  3 feuilles 2 ml AIA 10 <sup>-3</sup> M	6 ml tampon 2 ml Catéch. 5.10 <sup>-3</sup> M  3 feuilles 2 ml AIA 10 <sup>-3</sup> M	6 ml tampon 2 ml DIECA 2,5.10 <sup>-3</sup> M  3 feuilles 2 ml AIA 10 <sup>-3</sup> M
0	0,40 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,40 ± 0,01
6	40	39	22	40
12	38	39	23	40
14	36	36	22	38
16	36	35	22	40
18	35	35	22	40
20	33	34	23	40
22	29	33	23	40
24	21	—	22	40
26	0	—	22	40

Destruction *in vivo* de l'AIA par des feuilles vertes d'*Impatiens balsamina*. Les mélanges d'incubation contiennent 6 ml tampon, 2 ml AIA 10<sup>-3</sup>M (350γ au temps zéro) et 2 ml d'effecteur. Les lectures sont effectuées au spectrophotomètre de BECKMAN à 535 mμ. La solution colorimétrique contient 6 ml de réactif de SALKOWSKI et 1 ml de la solution d'AIA à doser.

## 2. Activité auxines-oxydasique.

### a) Destruction *in vivo* de l'AIA par des feuilles vertes.

Les feuilles d'*Impatiens* fraîchement prélevées sur des plantes cultivées en serre, sont placées dans des erlenmeyers de 50 ml. Le tableau I donne la composition des différents mélanges d'incubation et les indices colorimétriques établis pour chacun d'eux en fonction du temps. Des témoins ont été constitués en ajoutant l'AIA en fin d'incubation de manière à vérifier que la disparition de l'AIA n'est pas due à un artefact provoqué par la diffusion de certaines substances dans le milieu tamponné.

Les effecteurs ajoutés au milieu, outre l'AIA, sont :

— le DCP (2,4-dichlorophénol) considéré comme activateur de la réaction auxines-oxydasique ;

— le catéchol (1,2-dihydroxybenzène), substrat peroxydasique et phénoloxidasique, inhibiteur de la destruction de l'AIA ;

— le DIECA (diéthylthiocarbamate de Soude), inhibiteur des réactions oxydasiques faisant intervenir un enzyme à groupement prosthétique métallique.

Plusieurs faits se dégagent :

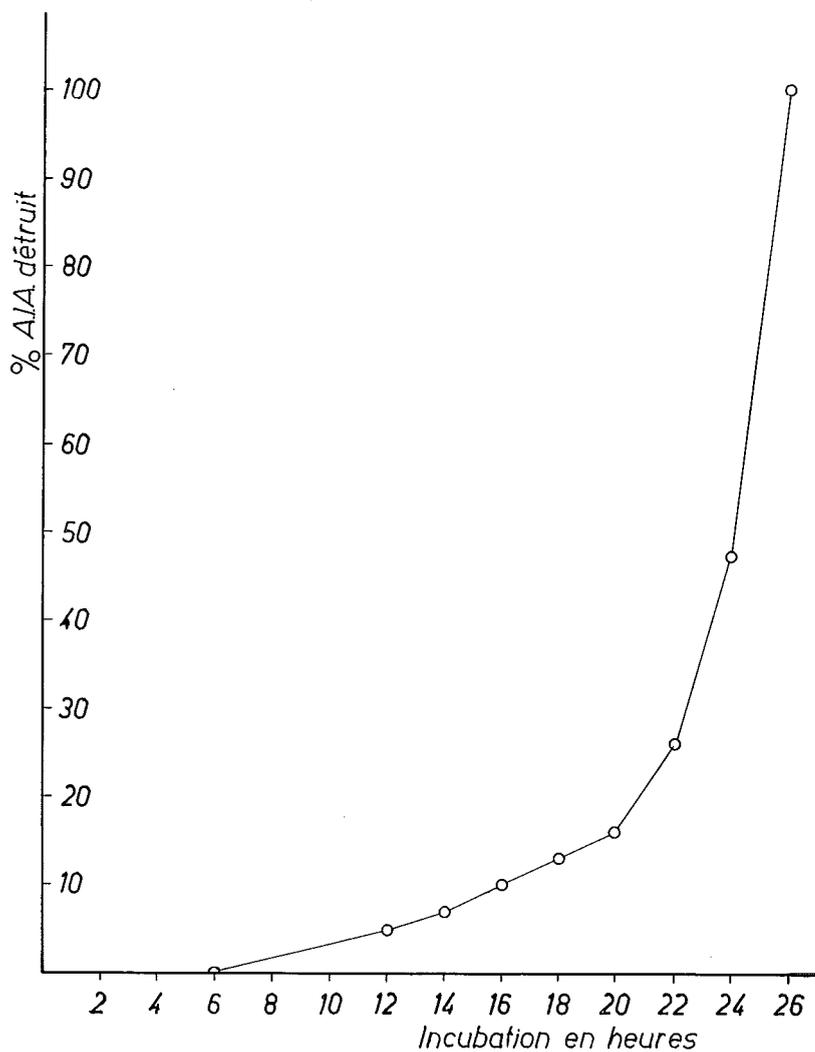


Fig. 1. — Destruction *in vivo* de l'acide  $\beta$ -indol-acétique par des feuilles d'*Impatiens balsamina*.

1° Les feuilles sont capables de détruire l'AIA *in vivo*.

Cette destruction (figure I) se produit rapidement après une période d'induction de 20 heures. En fin d'incubation, tout l'AIA est détruit.

2° Le DCP a un indice  $S = -3,3 \%$ , ce qui signifie qu'à la concentration utilisée, cette substance n'active pas la réaction auxines-oxydasique.

3° Le catéchol ( $5 \cdot 10^{-4}M$ ) bloque totalement la réaction auxines-oxydasique ( $S = -100 \%$ ) et inhibe la réaction colorimétrique de l'AIA pendant toute la durée de l'incubation (BASTIN, 1964).

4° En présence de DIECA la réaction auxines-oxydasique n'a pas lieu.

b) *Destruction de l'AIA par des extraits enzymatiques purifiés par l'acétone.*

10 feuilles d'*Impatiens balsamina* sont utilisées pour la préparation de 100 ml d'extrait. Cet extrait, en milieu tamponné (phosphate), purifié par l'acétone, est mis en présence d'une quantité déterminée d'AIA, accompagnée ou non de DCP et d'eau oxygénée. Le tableau II donne la composition des différents mélanges d'incubation et les indices d'absorption établis pour chacun d'eux après des temps déterminés.

Seuls les extraits contenant, outre l'AIA, du DCP et de l'eau oxygénée, manifestent une activité auxines-oxydasique.

A la concentration de 0,02 vol. (3<sup>e</sup> colonne du tableau II),  $H_2O_2$  inhibe partiellement la réaction colorimétrique de l'auxine. Ce fait a été confirmé plusieurs fois au cours de ce travail mais aucune explication ne lui a encore été trouvée.

L'eau oxygénée (0,002 vol.) n'interfère pas avec le réactif de Salkowski ; il est donc possible de suivre la destruction de l'AIA par colorimétrie pour cette concentration de peroxyde.

Différents tissus ont été purifiés par l'acétone selon les méthodes décrites plus haut. Dans le tableau III on compare, par rapport à 0,5 gr de poids frais, l'activité auxines-oxydasique d'extraits au tampon phosphate de broyats acétoniques de racines, d'hypocotyles et de feuilles.

Si les extraits de racines et d'hypocotyles manifestent une activité auxines-oxydasique assez forte, l'extrait de feuilles, par contre,

TABLEAU II

Mélanges	1	2	3	4	5
Incubation en minutes	6 ml extrait 1 ml H <sub>2</sub> O	6 ml extrait 1 ml DCP 10 <sup>-3</sup> M.	6 ml extrait 1 ml DCP 10 <sup>-3</sup> M.	6 ml extrait 1 ml DCP 10 <sup>-3</sup> M.	6 ml extrait 1 ml H <sub>2</sub> O
	1 ml H <sub>2</sub> O	1 ml H <sub>2</sub> O	1 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,2%	1 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,02%	1 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,02%
	2 ml AIA 10 <sup>-3</sup> M.	2 ml AIA 10 <sup>-3</sup> M.	2 ml AIA 10 <sup>-3</sup> M.	2 ml AIA 10 <sup>-3</sup> M.	2 ml AIA 10 <sup>-3</sup> M.
	0	0,45 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,45 ± 0,01
15	,44	,45	,16	,29	,42
30	,45	,44	,14	,25	,43
60	,44	,45	,10	,19	,42

Destruction de l'AIA par une poudre acétique de feuilles d'*Impatiens balsamina*. La solution colorimétrique contient 6 ml de réactif SALKOWSKI et 1 ml de solution d'AIA à doser. Les lectures sont effectuées au spectrophotomètre de BECKMAN (535 mμ).

Les chiffres inscrits sont les indices colorimétriques correspondant aux mélanges d'incubation.

TABLEAU III

Incubation en minutes	Extrait d'un broyat acétonique de 0,5 gr de racines (6 ml)	Extrait d'un broyat acétonique de 0,5 gr d'hypocotyles (6 ml)	Extrait d'un broyat acétonique de 0,5 gr de feuilles (6 ml)	Extrait d'un broyat acétonique de 0,5 gr de feuilles purifié par l'acétone (6 ml)
0	0	0	0	0
15	57 ± 2	75 ± 2	0	35 ± 2
30	82	83	0	44
60	90	95	0	57

Activités auxines-oxydasiques (en pour-cent AIA détruit) de quelques extraits enzymatiques d'*Impatiens balsamina* en présence de DCP 10<sup>-3</sup>M et d'eau oxygénée 0,002 %. Les solutions contiennent 350 γ d'AIA au temps zéro.

est incapable de détruire l'AIA. Cependant ce même extrait, ayant subi une seconde purification (précipitation des protéines par l'acétone), peut inactiver l'auxine.

On voit donc l'importance des purifications dans la préparation d'extraits enzymatiques. Les résultats rapportés ici semblent indiquer que le tampon solubilise au moins un inhibiteur de l'activité auxines-oxydasique que ne parvient pas à éliminer la première extraction à l'acétone.

La présence d'inhibiteurs auxines-oxydasiques dans les tissus végétaux a été signalée par de nombreux auteurs (LEYH, GASPAR et BOUILLENNE-WALRAND, 1963 ; GASPAR et PILET, 1963 ; GASPARD, 1964).

L'analogie obtenue par les effets de certains extraits végétaux (SACHER, 1962-1963) et ceux de substances synthétiques, naturelles ou non (GASPARD, BASTIN et LEYH, 1964) fait penser que le pouvoir effecteur négatif de ces extraits est dû à la présence de substances phénolées en position ortho ou para.

Nous avons étudié l'action de quelques composés diphénolés dans la cinétique de l'AIA-oxydase des feuilles d'*Impatiens*. A la concentration de  $10^{-4}$ M, les composés testés inhibent totalement l'activité auxines-oxydasique ( $S = -100\%$ ). Ce sont la DOPA (3,4-dihydroxyphénylalanine), le catéchol, les acides caféique, sinapique, gentisinique, chlorogénique et isochlorogénique. Ces résultats indiquent que les inhibiteurs trouvés dans les feuilles peuvent être assimilés à des composés diphénolés. Il convient, en effet, de remarquer que les acides caféique, sinapique et gentisinique ont été trouvés dans les tissus d'*Impatiens balsamina* par BOHM et TOWERS en 1962.

### 3. Activités phénoloxydasique et peroxydasique.

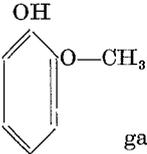
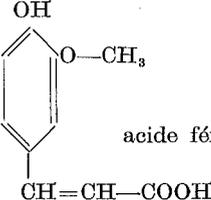
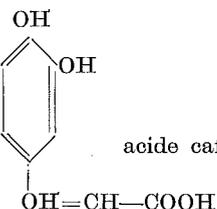
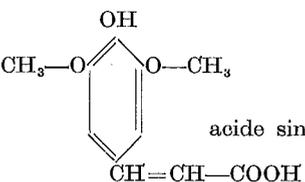
Dans nos conditions expérimentales les extraits enzymatiques n'ont jamais révélé d'activité phénoloxydasique. Ce fait est en contradiction avec les travaux de KAMINSKI (1959) ; il s'explique en admettant une élimination des enzymes phénoloxydasiques lors des purifications. Au cours de ce travail, en effet, les culots de dernière centrifugation (tampon phosphate) ont été éliminés. La présence de phénoloxydases dans ces culots sera discutée dans une étude ultérieure.

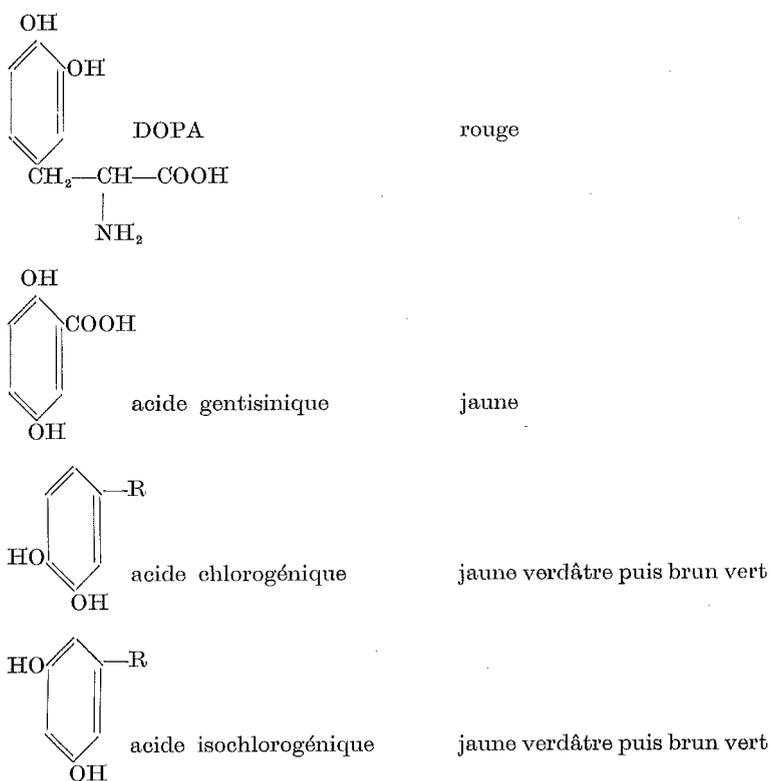
Les activités peroxydasiques ont été établies en dosant un des produits d'oxydation du gaiacol (420  $\mu$ ).

D'autres substrats, cependant, ont été testés. Ainsi, dans le tableau IV on donne les différentes colorations que prennent les mélanges enzymatiques en présence de quelques composés phénoliques et d'eau oxygénée.

L'acide férulique n'apparaît pas comme substrat peroxydasique mais l'addition d'un radical méthoxy supplémentaire au noyau aromatique ou la suppression de la chaîne latérale, qui restitue le gaiacol, rend possible la réaction enzymatique.

TABLEAU IV

Composés testés	Réactions peroxydasiques
 catéchol	jaune
 gaiacol	jaune orange puis violet
 acide férulique	rien
 acide caféique	jaune vert puis brun rosé
 acide sinapique	rose



Colorations que prennent les extraits enzymatiques de feuilles d'*Impatiens balsamina* (1 ml extrait + 7 ml tampon) en présence de quelques composés phénoliques (1 ml  $10^{-3}$ M) et d'eau oxygénée (1 ml  $H_2O_2$  0,2 vol.).

On constate donc l'importance de la chaîne latérale dans une telle réaction. La question posée est de savoir si les modifications de la structure chimique d'un substrat entraînent une modification au niveau de la spécificité de l'enzyme pour le substrat ou au niveau de l'affinité chimique du substrat pour un composé intermédiaire tel que l'oxygène. Cette question sera traitée plus longuement dans une étude ultérieure. Signalons, toutefois, qu'en milieu basique (pH = 12) les auto-oxydations du gaiacol et de l'acide férulique ne se produisent pas, contrairement à tous les autres composés phénoliques étudiés. On pourrait donc envisager, dès à présent, que la modification de la chaîne latérale entraîne une modification de l'affinité chimique de la peroxydase pour un substrat dérivé du 2-méthoxy-phénol.

4. Comparaison des activités AIA-oxydasique, peroxydasique et naphthoxydasique dans des organes différents.

Des feuilles de plantes en fleur, des cotylédons, hypocotyles et racines de plantules âgées de 6 jours et cultivées à l'obscurité ont été traités par l'acétone en vue de préparer des extraits enzymatiques purifiés (broyage dans l'acétone, extraction au tampon suivie d'une précipitation des protéines par l'acétone). Les activités enzymatiques sont suivies comparativement pour chacun des extraits. Les courbes cinétiques sont établies dans la figure 2 ; le tableau V donne la valeur des indices S, calculés à partir de quelques expériences.

TABLEAU V

Extraits	activités (indice S)		
	Peroxydase	naphthoxydase	AIA-oxydase
feuilles	3,720	5,162	136
cotylédons	3,190	3,465	120
hypocotyles	2,175	0,080	190
racines	2,245	0,963	168
cotylédons +	—	3,460	96
hypocotyles cotylédons +	—	—	78
racines			

Activités peroxydasiques, naphthoxydasiques et AIA-oxydasiques de quelques extraits d'*Impatiens balsamina*. L'indice S exprime la surface qu'engendre la courbe d'activité en fonction de la durée de l'incubation.

Plusieurs faits se dégagent :

1° Les activités peroxydasiques des feuilles et des cotylédons sont plus grandes que celles des hypocotyles et des racines.

2° L'activité naphthoxydasique d'un extrait d'hypocotyles est très faible. L'addition de cet extrait à un extrait de cotylédons n'inhibe pas l'activité enzymatique de celui-ci. En conséquence, on doit admettre que l'activité naphthoxydasique des hypocotyles

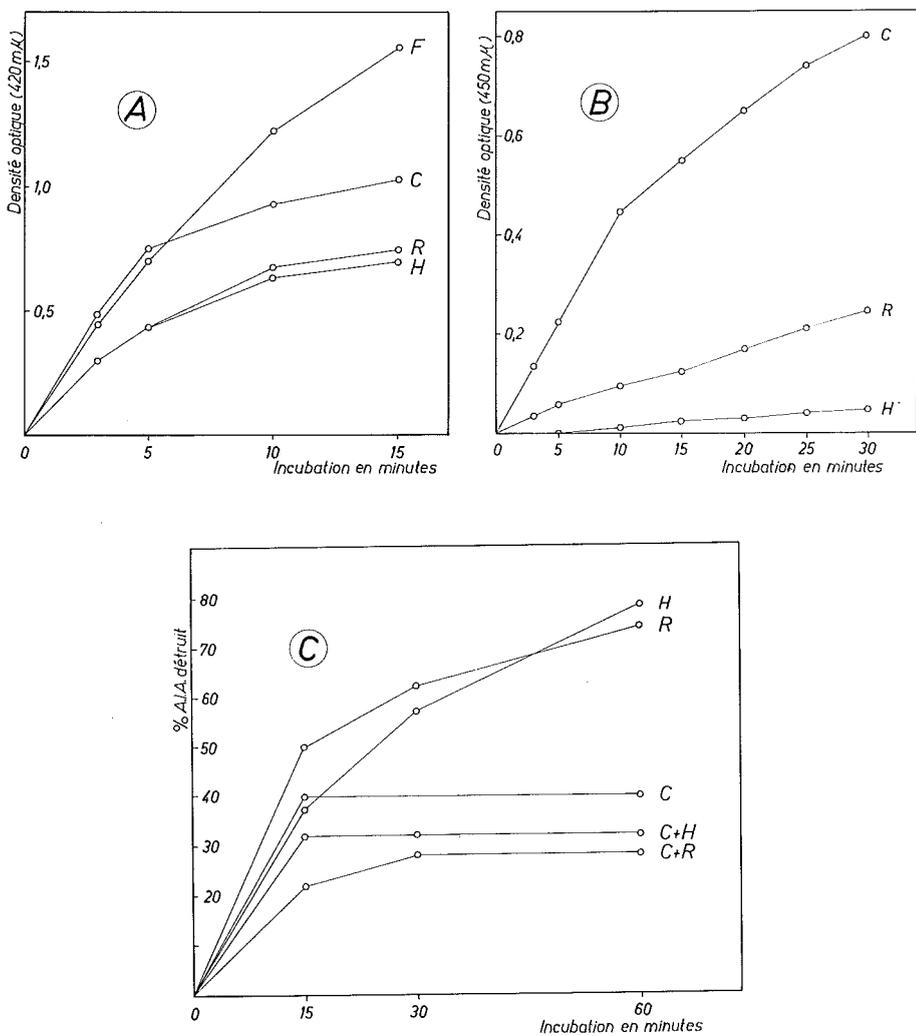


Fig. 2. — Activités enzymatiques de poudres acétoniques préparées à partir d'organes différents d'*Impatiens balsamina*.

A. Activités peroxydasiques. — B. Activités naphthoxydasiques. — C. Activités auxines-oxydasiques.

C. Cotylédons.

F. Feuilles.

R. Racines.

H. Hypocotyles.

n'est pas masquée par des inhibiteurs. Les tissus hypocotylaires, riches en peroxydases, contiennent peu de naphtoxydases. Ces enzymes sont donc différents.

3° Les activités AIA-oxydasiques des hypocotyles et des racines sont plus grandes que celles des feuilles et des cotylédons. L'addition d'un extrait de cotylédons à des extraits d'hypocotyles ou de racines provoque une inhibition de l'activité auxines-oxydasique de ces derniers extraits. On doit donc ici conclure que les extraits de cotylédons et de feuilles contiennent des inhibiteurs auxines-oxydasiques.

## DISCUSSION

La nature peroxydasique de l'oxydation de l'acide  $\beta$ -indol-acétique par certains extraits végétaux a été suggérée par GOLDACRE en 1953. Cette hypothèse a trouvé depuis lors de nombreuses confirmations (GALSTON, BONNER et BAKER, 1953 ; PLATT, 1954 ; KENTEN, 1955 ; MAC LACHLAN et WAYGOOD, 1956 ; WAYGOOD, OAKS et MAC LACHLAN, 1956 ; STUTZ, 1957, 1958 ; RAY, 1960 ; YAMAZAKI et SOUZU, 1960 ; GALSTON et coll., 1963).

Dans nos conditions expérimentales les extraits auxines-oxydasiques d'*Impatiens balsamina* ne manifestent pas d'activité phénoloxydasique. L'hypothèse d'une inactivation de l'auxine par les phénoloxydases d'*Impatiens* doit donc être éliminée.

La cinétique de l'AIA-oxydase d'un organe n'est pas toujours parallèle à celle de la peroxydase. L'identité de ces deux enzymes ne peut cependant être mise en doute car le fonctionnement de l'AIA-oxydase peut être inhibé par des composés phénoliques. L'élimination de ces inhibiteurs par une purification plus poussée (tableau III) fait tendre l'activité de l'AIA-oxydase vers celle de la peroxydase.

Le mode d'action des inhibiteurs phénolés a été, jusqu'à présent, interprété de trois manières différentes :

1° GASPARD et PILET (1964) supposent que l'inhibition auxines-oxydasique est réalisée par chélation de l'auxine ; le complexe auxine-inhibiteur n'étant pas attaqué par les enzymes.

Cependant, cette hypothèse ne peut être prise en considération étant donné la faible proportion de complexe formé dans les mélanges d'incubation (GASPARD, BASTIN et LEYH, 1964).

2° Selon KENTEN (1955) les inhibiteurs réduiraient compétitivement l'oxydation de l'AIA en éliminant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> du milieu réactionnel pendant leur propre oxydation peroxydasique.

Cette interprétation est difficilement conciliable avec le fait que des peroxydases purifiées détruisent l'AIA en l'absence d'eau oxygénée (GALSTON et coll., 1963) ; ce qui exclut la possibilité d'une compétition entre l'AIA et le phénol pour le peroxyde.

3° RAY (1960) constatant l'effet inhibiteur de l'AIA dans la peroxydation du pyrogallol, suggère qu'en présence de ces deux substrats, s'accumule une forme inactive de l'enzyme.

Dans l'état actuel de nos expériences, il nous paraît logique de supposer que les inhibiteurs auxines-oxydasiques agissent directement sur l'enzyme en complexant un ou plusieurs sites actifs de celui-ci.

De même, dans certaines conditions (RAY, 1960), l'AIA serait capable de complexer la peroxydase, bloquant ainsi des sites nécessaires à la peroxydation d'un substrat phénolique.

L'auteur remercie bien vivement Madame M. BOUILLENNE-WALRAND pour les précieux conseils qu'elle n'a cessé de lui prodiguer durant ce travail.

Laboratoire de Phytochimie  
de l'Université de Liège  
et Centre de Recherches des  
Hormones végétales (I.R.S.I.A.)  
Directeur M. BOUILLENNE-WALRAND.

#### BIBLIOGRAPHIE

- BASTIN M., *Bull. Soc. Sc. Liège*, 5-6, 349-353, 1964.  
BOHM B. A. et TOWERS G. H. N., *Canad. Jour. Bot.*, 40, 1962.  
BOUILLENNE-WALRAND M., LEYH C. et GASPAR Th., *Bull. Soc. Liège*, 3-4, 262-268, 1963.  
BRIGGS W. R. et RAY P. M., *Plant Physiol.*, 31, 165, 1956.  
CLEVINGER S., *Arch. Biochem. Biophys.*, 76, 131-138, 1958.  
FÄHRAEUS G. et TULLANDER V., *Physiol. Plant.*, 9, 494, 1956.  
GALSTON A. W., JACKSON P., SAWHNEY R. K., KEFFORT N. P. et MENDT W. J., *Coll. Intern. Centre National Recherche Sci.*, 123, Gif s/Yvette, juillet 1963.  
GASPAR Th. et BASTIN M., *Bull. Soc. Liège*, 11-12, 830-835, 1963.  
GASPAR Th., BASTIN M. et LEYH C., *Acad. Roy. Belg. Cl. Sc.*, 7, 817-833, 1964.

- GASPAR Th., LEYH C. et BASTIN M., *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.* Sous presse, 1964.
- GASPAR Th. et PILET P. E., *Rev. gén. Bot.*, **71**, 22-41, 1964.
- GASPAR Th., PILET P. E. et BASTIN M., *Physiol. vég.*, **2** (3). Sous presse, 1964.
- GOLDACRE P. L., GALSTON A. W. et WEINTRAUB R. L., *Arch. Biochem. Biophys.*, **43**, 358-373, 1953.
- GORTNER W. A. et KENT M. A., *Journ. Biol. Chem.*, **204**, 593-603, 1963.
- HAYES N. F. et THOMSON R. H., *Journ. Chem. Soc.*, 904-907, 1955.
- KAMINSKI Ch., *Bull. Acad. Roy. Cl. Sci.*, 5<sup>e</sup> série, XLV, 2 et 3, 1959.
- LANCE, Thèse doctorale, 1963.
- LEGRAND G., *Compt. rend. Soc. biol.*, **151**, 921, 1957.
- LEGRAND G., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **39**, 1289, 1957.
- LEYH C., GASPAR Th. et BOUILLENNE-WALRAND M., *Bull. Soc. Roy. Sc., Liège*, **5-6** (suppl.), 430-448, 1963.
- LITTLE J. E., SPROSTON T. J. et FOOTE M. W., *Journ. Biol. Chem.*, **174**, 335-342, 1948.
- MAC LACHLAN G. A. et WAYGOOD E. R., *Physiol., Plant.*, **9**, 321, 1956.
- MAC LACHLAN G. A. et WAYGOOD E. R., *Canad. Journ. Biochem. and Physiol.*, **34**, 1233, 1956.
- PILET P. E., *Phytochem.* Sous presses, 1964.
- PILET P. E. et GALSTON A. W., *Physiol. Plant.*, **8**, 888, 898, 1955.
- PILET P. E. et GASPAR Th., *Physiol. Plant.*, **17**, 324-330, 1964.
- PLATT R. S., *Année Biol.*, **30**, 349, 1954.
- RABIN R. S. et KLEIN R. M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **70**, 11-15, 1957.
- RAY P. M., *Arch. Biochem. Biophys.*, **87**, 19-30, 1960.
- SACHER J. A., *Plant. Physiol.*, **37**, 74-82, 1962.
- SACHER J. A., *Amer. Journ. Bot.*, **50**, 116-122, 1963.
- SONDHEIMER E. et GRIFFIN D. H., *Science*, **131**, 672, 1960.
- STUTZ R. E., *Plant Physiol.*, **32**, 31-39, 1957.
- TOMASZEWSKI M., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl.*, II, **7**, 127-130, 1959.
- WAYGOOD E. R. et MAC LACHLAN G. A., *Physiol. Plant.*, **9**, 607-617, 1956.
- WAYGOOD E. R., OAKS A. et MAC LACHLAN G. A., *Canad. Journ. Bot.*, **34**, 905, 1956.
- WITHAM F. H. et GENTILE A. C., *Journ. Exp. Bot.*, **12**, 188, 1961.
- YAMAZAKI I. et SOUZU H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **86**, 294, 1960.
- ZENK M. H. et MULLER G., *Nature*, **200**, 761-763, 1963.