

P. HANOWER

**RÉPERCUSSION  
DE LA DÉFICIENCE EN SOUFRE  
SUR CERTAINS ASPECTS  
DU MÉTABOLISME DE L'AZOTE  
CHEZ L'ARACHIDE**

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

ET TECHNIQUE OUTRE-MER





# ÉDITIONS DE L'OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER

## RENSEIGNEMENTS, CONDITIONS DE VENTE

Pour tout renseignement, abonnement aux revues périodiques, achat d'ouvrages et de cartes, ou demande de catalogue, s'adresser à :

SERVICE CENTRAL DE DOCUMENTATION DE L'ORSTOM  
70-74, route d'Aulnay, 93 - BONDY (France)

— Tout paiement sera effectué par virement postal ou chèque bancaire barré, au nom du Régisseur des Recettes et Dépenses des SSC de l'ORSTOM, 70-74, route d'Aulnay, 93 - BONDY; compte courant postal n° 9.152-54 PARIS.

— Achat au comptant possible à la bibliothèque de l'ORSTOM, 24, rue Bayard, PARIS (8°).

## REVUES ET BULLETINS DE L'ORSTOM

### I. CAHIERS ORSTOM

- a) *Séries trimestrielles* :
- Pédologie (1) — Sciences humaines
  - Océanographie — Hydrologie
  - Hydrobiologie — Entomologie médicale et Parasitologie
- Abonnement : France 90 F ; Etranger 110 F ; le numéro 25 F
- b) *Série semestrielle* :
- Géologie.
- Abonnement : France 70 F ; Etranger 75 F
- c) *Séries non encore périodiques* :
- Biologie (3 ou 4 numéros par an)
  - Géophysique
- Prix selon les numéros

### II. BULLETINS ET INDEX BIBLIOGRAPHIQUES

- Bulletin analytique d'Entomologie médicale et vétérinaire Mensuel
- Abonnement : France 70 F ; Etranger : 80 F ; le numéro 8 F
- Index bibliographique de Botanique tropicale Trimestriel
- Abonnement : France 25 F ; Etranger 30 F

(1) Masson et Cie, 120, bd Saint-Germain, Paris-VI<sup>e</sup>, dépositaires de cette série à compter du vol. VIII, 1970. Abonnement étranger : 124 F.

*Vient de paraître dans cette même collection des Mémoires de l'ORSTOM :*

J. BRZOWSKA, 1971. Mémoire n° 49.

Étude de la carence en soufre et quelques aspects du métabolisme du soufre chez l'arachide. Format 21 x 27, 121 pages, 19 fig., 1 pl. couleur.

RÉPERCUSSION  
DE LA DÉFICIENCE EN SOUFRE  
SUR CERTAINS ASPECTS  
DU MÉTABOLISME DE L'AZOTE  
CHEZ L'ARACHIDE

MÉMOIRES O.R.S.T.O.M. N° 51

RÉPERCUSSION  
DE LA DÉFICIENCE EN SOUFRE  
SUR CERTAINS ASPECTS  
DU MÉTABOLISME DE L'AZOTE  
CHEZ L'ARACHIDE

P. HANOWER

O.R.S.T.O.M.  
PARIS  
1971

.....  
« La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite » (alinéa 1<sup>er</sup> de l'article 40).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code Pénal ».

.....

*A mon maitre, Monsieur le Professeur  
P. CHOUARD qui, dans les circonstances  
les plus pénibles de ma vie, m'a rendu  
une main secourable.*

« Croyez en ceux qui cherchent la vérité,  
doutez de ceux qui la trouvent ».  
*(Oedipe).*

« Toute théorie n'est bonne qu'à condition  
de s'en servir pour passer outre ».  
*(Feuilles de Journal)*  
André GIDE.

## **NOTE LIMINAIRE**

*Mes remerciements les plus cordiaux s'adressent à Monsieur le Professeur G. CAMUS qui a permis que ce travail soit réalisé à l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer dont il est le Directeur Général, et a bien voulu me faire l'honneur d'accepter la Présidence de ce Jury. Sans ses encouragements, ce mémoire n'aurait probablement jamais vu le jour.*

*Je remercie de même très vivement Monsieur le Professeur C. LIORET, qui le premier m'a incité à préparer cette thèse, pour les suggestions et les critiques qu'il a bien voulu formuler.*

*Ma reconnaissance va de même à Monsieur le Professeur A. BRUNEL, qui a inspiré certaines parties de ces recherches.*

*J'exprime toute ma reconnaissance à Mademoiselle M. GOAS, Professeur à la Faculté des Sciences de Rennes, d'avoir bien voulu accepter de suppléer au Jury de cette thèse, Monsieur le Professeur BRUNEL accidenté.*

*Mes remerciements vont également au Dr P. PRÉVOT qui a été à l'origine de mes recherches sur l'arachide.*

*Je me dois également de remercier le Dr P. SEGALIN, Directeur des Services Scientifiques Centraux de l'O.R.S.T.O.M., qui a tout fait pour faciliter la partie matérielle de ces travaux.*

*Ma gratitude va aussi à Madame J. BRZOZOWSKA pour sa collaboration dévouée tout au long de la poursuite des recherches.*

*Je tiens de même à remercier ici Monsieur A. KOBYLANSKY, traducteur à l'O.R.S.T.O.M., pour ses conseils concernant la rédaction de ce travail.*

*Enfin, que le personnel du Laboratoire de Métabolisme, Messieurs CAS et CHEZEAU, Mademoiselle LEBLANC et Madame RAILLOT, de même que celui des serres des Services Scientifiques Centraux de l'O.R.S.T.O.M., Messieurs BILLARD, CHRISTMANN et PELLETIER trouvent ici l'expression de ma reconnaissance pour leur contribution technique.*

## TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	1
<i>Première partie</i> : <b>MATÉRIEL ET TECHNIQUES</b> .....	3
1. — CULTURES.....	3
A. <i>Semences</i> .....	3
B. <i>Semis</i> .....	3
C. <i>Solutions nutritives</i> .....	5
2. — ÉCHANTILLONNAGE DU MATÉRIEL VÉGÉTAL.....	7
3. — MÉTHODES ANALYTIQUES.....	11
A. <i>Dosage de l'azote</i> .....	11
B. <i>Dosage du phosphore</i> .....	12
C. <i>Dosage des glucides</i> .....	12
D. <i>Dosage de l'arginine</i> .....	12
E. <i>Hydrolyse des protéines</i> .....	13
F. <i>Chromatographie sur papier</i> .....	13
1° <i>Glucides</i> .....	13
2° <i>Acides aminés</i> .....	14
G. <i>Chromatographie sur colonnes des acides aminés</i> .....	15
H. <i>Chromatographie en couche mince des acides aminés</i> .....	15
I. <i>Détermination des activités enzymatiques</i> .....	16
1° <i>Mesure de l'activité arginasique</i> .....	16
2° <i>Mesure de l'activité uréasique</i> .....	16
J. <i>Utilisation de l'arginine marquée au <sup>14</sup>C-5</i> .....	17
1° <i>Autoradiochromatographie</i> .....	17
2° <i>Mesure de la radioactivité</i> .....	17
<i>Deuxième partie</i> : <b>PARTIE EXPÉRIMENTALE</b> .....	19
I. — <b>Influence de la déficience en soufre sur la morphologie des plants d'arachide</b> .....	19
II. — <b>Évolution, au cours de la croissance, de l'azote dans les différents organes de l'arachide en fonction de la déficience en soufre</b> .....	21
A. <i>Plantes + S et -S</i> .....	23
B. <i>Induction et correction de la déficience en soufre</i> .....	28

III. —	<b>Étude de la graine d'arachide en germination.</b> .....	37
	A. <i>Chromatographie sur papier des glucides solubles.</i> .....	37
	B. <i>Dosages des sucres solubles.</i> .....	38
	C. <i>Évolution des acides aminés libres — chromatographie sur papier.</i> .....	38
IV. —	<b>Étude des acides aminés chez l'arachide au cours de la croissance.</b> ...	43
	A. <i>Évolution des acides aminés libres — chromatographie sur papier.</i> .....	43
	B. <i>Composition en acides aminés de la fraction protéique — chromatographie sur papier.</i> .....	46
	C. <i>Étude de l'exudat des tiges et des pétioles — chromatographie sur papier.</i> .....	46
	D. <i>Variations des Acides aminés libres au début de la croissance — chromatographie sur colonnes.</i> .....	47
V. —	<b>L'arginine</b> .....	51
	A. <i>Évolution de l'arginine libre au cours de la croissance.</i> .....	53
	B. <i>Variation de l'arginine protéique.</i> .....	57
	C. <i>Variation de l'arginine au cours de l'induction et de la correction de la carence en soufre.</i> .....	61
VI. —	<b>Devenir de l'arginine — <sup>14</sup>C—5.</b> .....	67
	A. <i>Absorption radiculaire.</i> .....	69
	B. <i>Absorption pétiolaire.</i> .....	72
VII. —	<b>Activité arginasique.</b> .....	81
	A. <i>Évolution, au cours de la croissance, de la valeur arginasique chez l'arachide déficiente ou non en soufre.</i> .....	84
	B. <i>Réactivation de l'arginase chez l'arachide déficiente ou non en soufre.</i> .....	86
	C. <i>Évolution, au cours de la croissance, de l'activité arginasique en présence de Cl<sub>2</sub>Mn</i> .....	91
	D. <i>Activité arginasique dans les organes reproducteurs.</i> .....	92
	E. <i>Évolution de l'activité arginasique des graines d'arachide au cours de la germination.</i> .....	93
	F. <i>Activité arginasique à pH 7.</i> .....	96
	G. <i>Activité uréasique.</i> .....	89
	<b>DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES.</b> .....	103
	<b>BIBLIOGRAPHIE.</b> .....	109

## INTRODUCTION

Le soufre est un constituant essentiel de toute matière vivante. L'importance de cet élément dans la nutrition minérale de certaines cultures tropicales (arachide, cotonnier) a pu être mise en évidence à la suite de nombreuses expériences conduites au Sénégal, en Haute Volta, au Tchad, en République Centrafricaine et dans certaines régions de la Côte d'Ivoire.

L'expérience montre que les déficiences en soufre sont relativement fréquentes dans les cultures africaines d'arachide et de cotonnier et ont un effet dépressif sur le rendement. Ceci est dû en partie au fait que les engrais minéraux qui apportent du soufre (sulfate d'ammoniaque, superphosphate simple, sulfate de potasse) sont encore peu appliqués. Cette situation pourrait persister par suite de la tendance à utiliser des engrais fortement concentrés n'apportant pas de soufre (urée, superphosphate triple, chlorure de potasse).

Malgré l'accroissement d'intérêt pour certains aspects de la biochimie du soufre, que l'on observe ces dernières années, nos connaissances fondamentales de la fonction physiologique du soufre dans le métabolisme des plantes supérieures sont beaucoup moins développées que celles concernant le carbone ou le phosphore par exemple. Ces connaissances restent particulièrement incomplètes et très fragmentaires en ce qui concerne les cultures tropicales et surtout l'arachide.

Il en résulte que des recherches de physiologie végétale sur le soufre présentent un intérêt pour les cultures en général et pour l'arachide en particulier. Elles sont susceptibles de contribuer au développement de nos connaissances sur l'action du soufre et peuvent apporter des bases scientifiques utiles à l'interprétation de l'expérimentation agronomique.

C'est pourquoi nous avons entrepris au laboratoire du Métabolisme de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer en collaboration avec M<sup>me</sup> BRZOWSKA des recherches sur l'influence qu'une déficience en soufre peut avoir sur le métabolisme général de l'arachide, du cotonnier et du mil.

Une partie de ces recherches fait l'objet de la présente thèse.

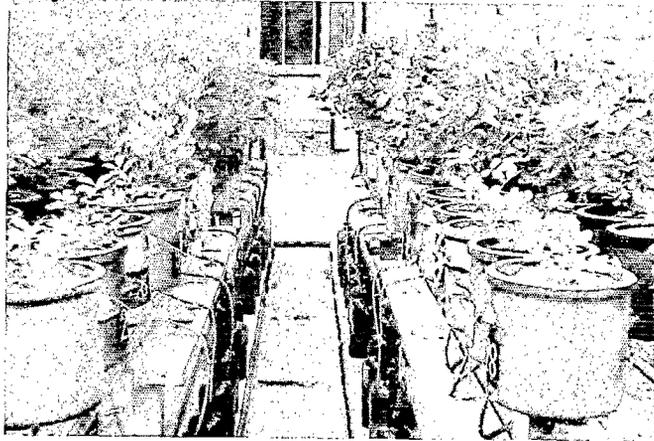


Fig. 2. — Pots en grès.

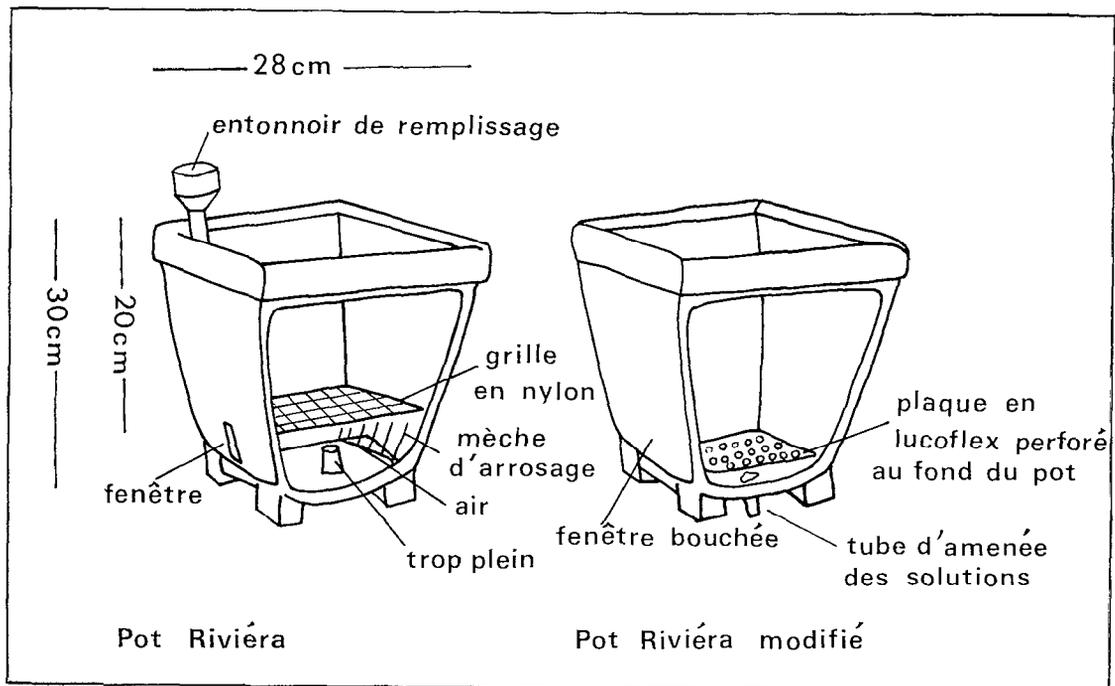


Fig. 3. — Pots Riviera modifiés

# MATÉRIEL ET TECHNIQUES

## I. CULTURES.

### A. Semence.

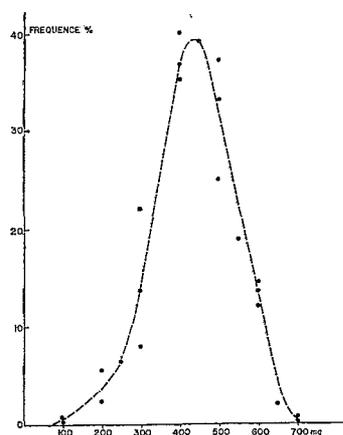


Fig. 1. — Distribution de fréquence des graines

Les études effectuées entre 1962 et 1967 portaient sur la variété 28.204 sélectionnée par le Centre de Recherches Agronomiques de BAMBEY (Sénégal). C'est une variété précoce (90 jours au Sénégal). Les symptômes visibles de la déficience en soufre sont chez cette variété très marqués et très précoces, contrairement à ce que nous avons pu observer chez des variétés tardives, par exemple telle la 28.206\*.

Afin d'éviter au maximum tout apport extérieur de soufre, les lots des gousses destinés à l'expérimentation sur la déficience en soufre ne devaient pas avoir été traités par des insecticides dans la composition desquels il entre du soufre.

Les gousses une fois décortiquées, les graines ont été pesées et divisées en classes d'intervalle de 100 mg. Dans un lot d'arachides reçu de Bambey, le poids d'une graine varie entre 70 et 700 mg avec une dominance des graines de 400 à 500 mg (fig. 1).

Nous avons choisi pour les semis des graines pesant entre 400 et 500 mg lesquelles étaient les plus représentatives, constituant plus du tiers des lots initiaux.

### B. Semis.

Les semis ont été effectués sur sable à grains ronds lavé à l'acide chlorhydrique et rincé à l'eau permutée.

Les plantes ont été cultivées en serre à BONDY en culture sans sol. Pour les études n'impliquant pas l'emploi de radiotraceurs, on a employé la technique de culture en pots, sur sable et par solutions récupérées, les semis étant généralement faits sur place. Ces cultures ont été aérées de nuit.

\* Nous tenons à exprimer ici nos remerciements les plus cordiaux à la Direction générale de l'I. R. A. T. ainsi qu'à la Direction du C. R. A. de BAMBEY, de nous avoir fourni si aimablement le matériel végétal.

Les pots en grès, très lourds et peu maniables, utilisés jusqu'en 1964 (fig. 2) ont été remplacés, en 1966, par des pots Riviera modifiés (fig. 3).

Durant les expériences de 1962-1963, après l'élimination des germinations défectueuses, on laissait 4 plantes par pot. Trois d'entre elles étaient prélevées aux stades de développement relativement peu avancé, de sorte qu'à la fin de l'expérimentation il ne restait qu'une seule plante par pot. Cette technique présentait cependant des inconvénients :

- les plantes se gênaient mutuellement en se masquant partiellement la lumière ;
- il était pratiquement impossible de prélever le système racinaire intact, et de petits débris de racines restant dans le sable pouvaient constituer une source de soufre pour les plantes —S.

C'est pourquoi, à partir de l'année 1964, on a employé des pots individuels dès le stade de 2-3 feuilles.

Pour les études avec les radiotraceurs, où les plantes étaient mises en contact racinaire avec les solutions radioactives, on a employé la technique d'aquiculture (fig. 4) dans des récipients que nous avons confectionnés à cet effet. Les plantes en aquiculture ont été aérées par barbotage continu de l'air.

Aquiculture

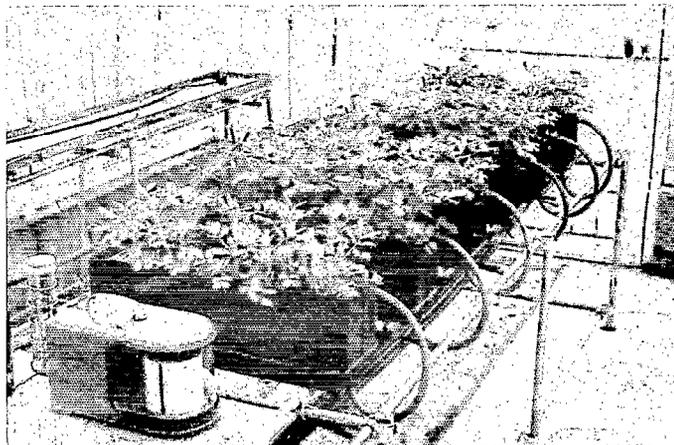


Fig. 4. — Culture avec radiotraceur.

### C. Solutions nutritives.

Au stade de 3 feuilles, deux régimes nutritionnels ont été appliqués :

- solution nutritive complète (+S), et
- solution nutritive sans soufre (-S).

La solution nutritive adoptée, du type LONG ASHTON [90] avait la composition suivante :

## Macro-éléments

NO <sub>3</sub> K.....	202 mg/l
(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Ca anhydre.....	656 mg/l
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na, 2 H <sub>2</sub> O.....	208 mg/l
SO <sub>4</sub> Mg, 7 H <sub>2</sub> O.....	368 mg/l
ou	
Cl <sub>2</sub> Mg, 6 H <sub>2</sub> O.....	304 mg/l

## Micro-éléments

Cl <sub>3</sub> Fe transformé en citrate.....	16,25 mg/l
Cl <sub>2</sub> Mn, 4 H <sub>2</sub> O.....	1,98 mg/l
Cl <sub>2</sub> Cu, 2 H <sub>2</sub> O.....	0,17 mg/l
Cl <sub>2</sub> Zn anhydre.....	0,14 mg/l
BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub> .....	1,86 mg/l
Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> , 4 H <sub>2</sub> O.....	0,035 mg/l

## Somme des cations et des anions en méq/l

<i>Cations</i>		<i>Anions</i>	
K <sup>+</sup> .....	2	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	10
Ca <sup>++</sup> .....	8	PO <sub>4</sub> <sup>---</sup> .....	4
Na <sup>+</sup> .....	1,3	SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> .....	} 3
Mg <sup>++</sup> .....	3	ou	
H <sup>+</sup> .....	2,7	Cl <sup>-</sup> .....	
Total.....	<u>17,0</u>	Total.....	<u>17,0</u>

Le pH de la solution prête à l'emploi = 5,5-5,6.

P.O. en atm. = 0,5.

Sans la solution —S l'ion chlorure remplaçait l'ion sulfate. C'est la raison pour laquelle on ajoutait aux deux solutions en plus des sels mentionnés ci-dessus, 58,5 mg/l de ClNa, soit 1 méq/l.

Le fer a été ajouté sous forme de citrate ferrique, préparé selon HEWITT [90].

## ENTRETIEN ET RENOUVELLEMENT DES SOLUTIONS NUTRITIVES

Chaque semaine les solutions étaient renouvelées après rinçage des plantes avec de l'eau déminéralisée.

En plus des renouvellements hebdomadaires on ajoutait tous les deux jours du citrate ferrique, pour pallier la perte due à la précipitation partielle du fer.

Jusqu'en 1965, l'irrigation et l'aération s'effectuaient manuellement. Tous les soirs vers 17 heures les solutions étaient récupérées dans des bouteilles. Chaque matin, la perte occasionnée par l'évaporation et la transpiration a été compensée par addition d'eau désionisée. Vers 9 heures, les solutions étaient versées dans les pots de culture.

A partir de l'année 1965, ces opérations s'effectuaient automatiquement au cours de la nuit. Chaque nuit, les solutions étaient récupérées, complétées à leur volume initial et homogénéisées. Ces opérations s'effectuaient pour l'ensemble des pots +S dans un bac +S et pour l'ensemble des pots --S dans un bac --S.

De ce fait, les concentrations en sels étaient rigoureusement les mêmes dans chaque pot et pour chacun des lots.

Le système que nous avons imaginé à cet effet a grandement facilité le travail. Il a aussi l'avantage d'uniformiser et d'homogénéiser les conditions dans les pots de culture : l'évaporation étant compensée automatiquement par de l'eau échangée et les solutions en provenance des pots étant rebrassées et uniformément réparties dans tous les pots.

L'avantage de ce système, et non le moindre, consiste dans le fait qu'il permet d'apporter les solutions nutritives très tôt le matin et de mettre les racines en aération tard dans la soirée.

Afin d'éviter la formation d'algues, on a pris soin de couvrir le sable dans chaque pot d'une couche de granulés en plastique noir.

La figure 5 (a et b) représente le schéma du dispositif cultural automatique.

#### PRINCIPE DU SYSTÈME AUTOMATIQUE D'ALIMENTATION EMPLOYÉ POUR LES CULTURES EN SERRE

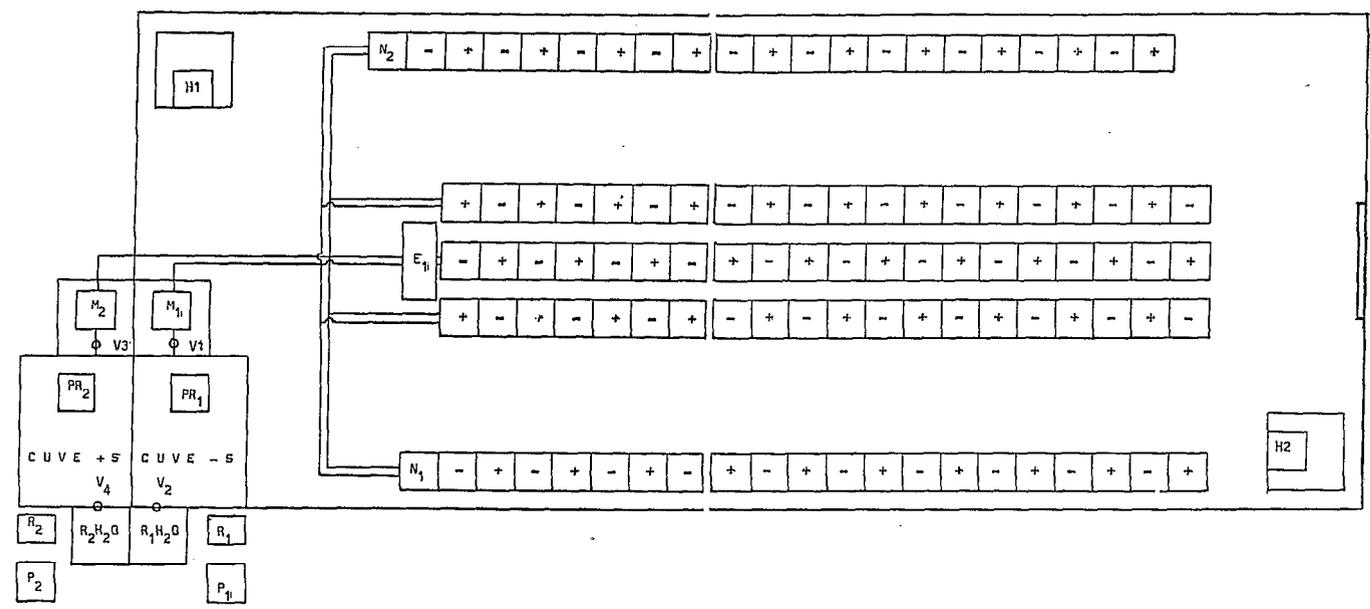
Le but de l'installation décrite ci-après est de permettre, d'une part l'aération nocturne des racines enfouies dans le sable des pots de culture individuelle, d'autre part le brassage et la réhomogénéisation des solutions nutritives, après une journée d'absorption et d'évaporation par la partie aérienne des plantes.

La solution nutritive correspondant à chaque traitement est stockée dans un bac situé en contrebas des pots de culture. Un réseau de tuyau rigide permet à une pompe foulante, placée près du bac, d'alimenter chaque pot de culture contenant le sable stérile et une plante. Un flotteur, commun pour tous les pots, réglé pour un niveau de solution approprié, actionne un contacteur à mercure qui commande, par un relais, l'arrêt de la pompe. Cette dernière reste en prise pendant toute la journée grâce à une horloge-contact. Lorsque, par le jeu de l'absorption radiculaire et de l'évapo-transpiration, le niveau baisse dans les pots, le flotteur provoque la remise en route de la pompe foulante.

Aux heures de fraîcheur nocturne, il est nécessaire de prévoir un retour des solutions nutritives vers le bac de stockage pour permettre l'aération et la respiration des racines par les pores du sable. A cet effet, l'horloge-contact déclenche l'ouverture d'une électrovanne libérant les solutions nutritives qui s'écoulent dans le bac par gravité. Par la même occasion, la pompe foulante est mise hors service.

Le système de contacts horaires de la pendule commande au moment voulu la remise des solutions dans les pots de culture et le cycle de 24 heures se poursuit. Un coupe-circuit permet éventuellement de rompre ce cycle automatiquement et d'effectuer manuellement les différentes manœuvres.

Schéma général du dispositif cultural automatique



- |                |   |                |   |
|----------------|---|----------------|---|
| $E_1$          | — Enregistrement de la température et de l'humidité.  |                |   |
| $H_1$ et $H_2$ | — Humidificateurs.  |                |   |
| $M_1$          | — Pompe servant à refouler la solution —S dans les pots de culture.   | $PR_2$         | — Pressostat à contacts à mercure commandant la fermeture de la vanne $V_2$ lorsque le niveau est rétabli dans la cuve —S.                            |
| $M_2$          | — Pompe servant à refouler la solution +S dans les pots de culture.   | $R_1$          | — Relais de commande de la pompe —S.  |
| $N_1$          | — Contrôle du niveau des pots —S.   | $R_2$          | — Relais de commande de la pompe +S.  |
| $N_2$          | — Contrôle du niveau des pots +S.   | $R_1H_2O$      | — Réserve d'eau de la cuve —S.  |
| $P_1$          | — Pendule commandant les vannes $V_1$ et $V_3$ de retour des solutions et la mise en marche des pompes électriques $M_1$ et $M_2$ . | $R_2H_2O$      | — Réserve d'eau de la cuve +S.  |
| $P_2$          | — Pendule commandant les vannes $V_2$ et $V_4$ de mise à niveau.  | $V_1$ et $V_3$ | — Vannes électromagnétiques permettant le retour des solutions nutritives aux cuves.  |
| $PR_1$         | — Pressostat à contacts à mercure commandant la   | $V_2$ et $V_4$ | — Vannes électromagnétiques permettant l'admission d'eau des réservoirs $R_1H_2O$ et $R_2H_2O$ pour compenser l'évaporation des solutions nutritives. |

Fig. 5 a.

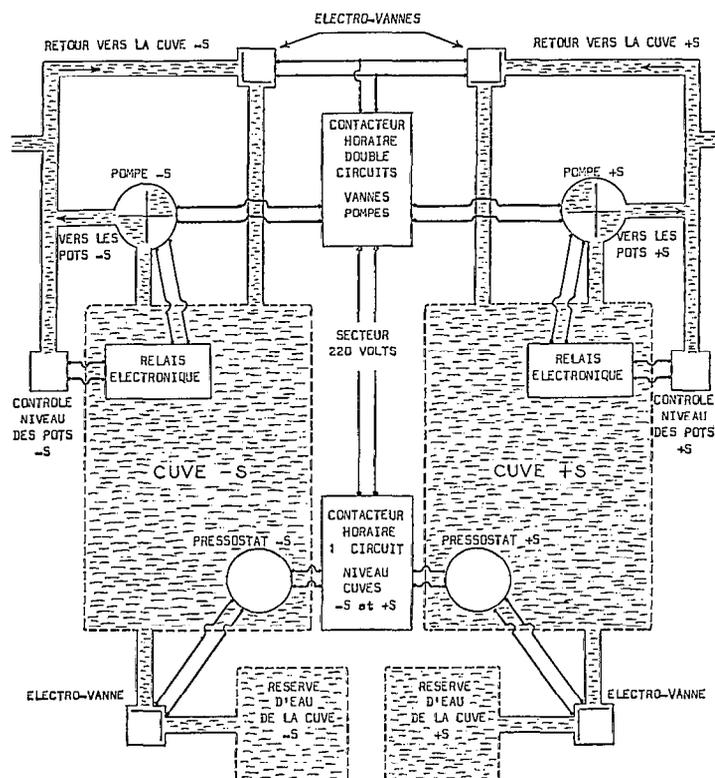


Fig. 5 b. — Détails du dispositif de la figure 5 a.

Lors du reflux nocturne des solutions nutritives vers le bac de stockage, il est nécessaire de compenser la perte de volume du liquide provoquée par l'évapo-transpiration diurne. A cet effet, un récipient placé au-dessus du bac de stockage laisse écouler de l'eau distillée, par l'intermédiaire d'une électro-vanne commandée par la pendule. Le niveau primitif étant rétabli dans le bac, un tube plongeur à membrane comprimable provoque la fermeture de l'électro-vanne.

Durant la période d'aération nocturne, le mélange nutritif est brassé et se trouve réhomogénéisé au moment de la remontée vers les pots de culture.

Les solutions nutritives, rendues identiques dans chaque pot de culture par le jeu du reflux et du brassage nocturnes, sont renouvelées chaque semaine, tandis que le bac de stockage est nettoyé manuellement des produits de précipitation. En plus de cette vidange hebdomadaire, du citrate ferrique est ajouté aux solutions deux fois par semaine, par le biais de l'addition nocturne d'eau distillée.

## 2. ÉCHANTILLONNAGE DU MATÉRIEL VÉGÉTAL.

### Prélèvements des échantillons.

En vue des analyses, des prélèvements ont été effectués aux différents stades de la végétation à raison de deux échantillons par traitement nutritionnel. Chaque échantillon

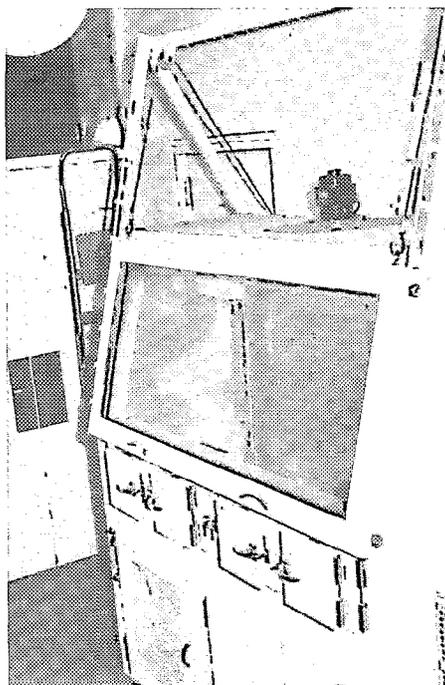


Fig. 6. — Enceinte réfrigérée.

était constitué de 5 à 10 plantes. Aux jeunes stades (2-3 feuilles) les échantillons se composaient de 20 à 30 plantules.

#### Préparation des échantillons.

##### a) *avant 1964*

Les plantes ont été sectionnées en divers organes et fixées dans l'alcool bouillant.

##### b) *depuis 1964*

Les plantes ont été introduites dans une enceinte réfrigérée à  $-20^{\circ}\text{C}$ , congelées et sectionnées dans l'enceinte en divers organes et fixées dans l'alcool bouillant. La figure 6 représente l'enceinte réfrigérée que nous avons fait construire à cet effet.

##### c) *à partir de 1965*

Après le sectionnement dans l'enceinte réfrigérée, les échantillons ont été lyophilisés. On a utilisé à cet effet l'appareil RP-10 SOGEV. Durée de la lyophilisation : une nuit. Après broyage, les poudres végétales ont été séchées pendant 24 heures à la température ambiante sous vide, et en présence de chlorure de calcium, et conservées à froid sous vide.

#### Préparation des solutions à analyser.

Après décantation de l'alcool de fixation les organes végétaux ont été broyés le plus finement possible et les broyats épuisés par de l'alcool à  $80^{\circ}\text{C}$ . L. sous un réfrigérant ascendant à chaud.

Les solutions hydro-alcooliques ont été concentrées sous vide à  $40^{\circ}\text{C}$  dans des évaporateurs rotatifs.

Une partie de la solution hydro-alcoolique sert aux dosages de l'azote soluble. L'autre partie de cette solution sert pour la chromatographie des acides aminés et des glucides, ainsi que pour les dosages des glucides et de l'arginine :

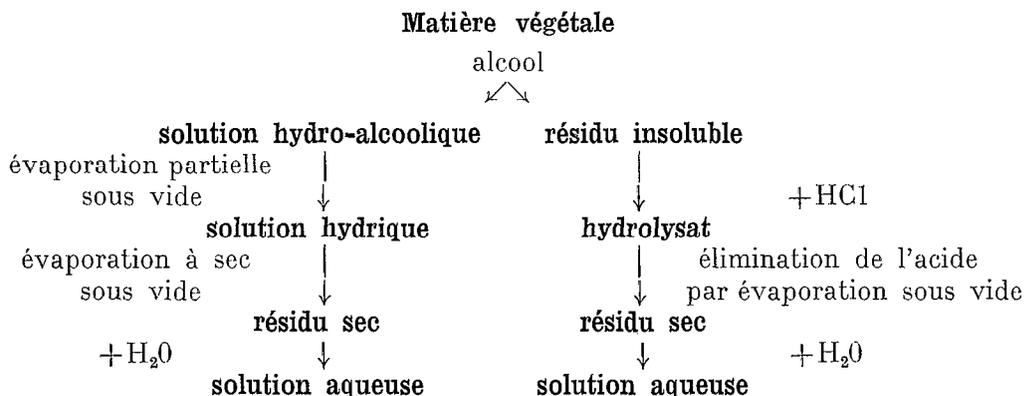
— pour les dosages des glucides hydrosolubles cette solution est débarrassée de l'alcool dans l'évaporateur rotatif sous vide ;

— pour la chromatographie des acides aminés et des glucides ainsi que pour les dosages de l'arginine, la solution est évaporée à sec dans l'évaporateur rotatif sous vide et le résidu repris par de l'eau.

Le résidu insoluble obtenu après épuisement par l'alcool sert au dosage de l'azote ainsi qu'à l'hydrolyse par HCl en vue du dosage de l'arginine et de la chromatographie des acides aminés (voir plus loin).

Les échantillons lyophilisés ont subi des nombreuses extractions à froid, d'abord à l'alcool à  $95^{\circ}$ , puis à l'alcool à  $80^{\circ}$  à froid et enfin à chaud.

Voici les schémas de préparation des prises pour analyses :



#### GERMINATION DES GRAINES D'ARACHIDE

Les graines d'arachide, variété 28.204 ont été mises à germer à l'obscurité et à la température de 27° C ± 1° à l'étuve.

Des lots homogènes ont été prélevés pour analyse. Ainsi on a prélevé un lot de graines non germées telles qu'elles étaient au moment de l'ensemencement. Puis de 24 en 24 heures jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour de la germination.

Les échantillons prélevés pour analyse ont été sectionnés à froid en cotylédons et proplantules, puis, en axes embryonnaires et fixés dans l'alcool bouillant.

Après broyage, épuisement par de l'alcool aqueux, évaporation sous pression réduite et à basse température et délipidation, on a effectué des chromatogrammes des glucides solubles et des acides aminés libres.

On a également effectué des dosages des sucres totaux et réducteurs par la méthode de SOMOGYI (voir plus loin).

A partir de 1965, les échantillons prélevés ont été lyophilisés après avoir été sectionnés à froid dans l'enceinte réfrigérée.

Après délipidation à l'éther de pétrole P.E. 30°-40° C, la suite des opérations a été la même que pour les plantes en croissance.

### 3. MÉTHODES ANALYTIQUES.

#### A. Dosages de l'azote.

L'azote total a été dosé dans les poudres végétales finement broyées et dont la totalité a été passée au tamis de 0,4 ø.

L'azote soluble a été dosé dans les extraits hydro-alcooliques et l'azote protéique dans les résidus insolubles dans l'alcool aqueux.

Le procédé utilisé a été celui de KJELDAHL complété par une réduction des nitrates selon JODLBAUER. La distillation et le dosage ont été effectués à l'aide d'un appareil PARNAS et WAGNER [17].

### B. Dosage du phosphore.

Le phosphore total a été dosé après calcination des poudres végétales finement broyées, et le phosphore insoluble — dans les résidus insolubles dans l'alcool aqueux [31].

### C. Dosage des glucides.

On a dosé les réducteurs et non réducteurs dans les extraits aqueux purifiés par délipidation à l'hexane et défécation au moyen du sulfate de zinc et de la baryte saturée.

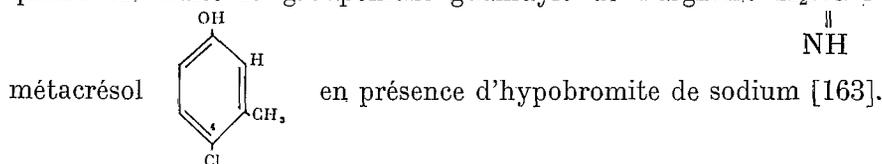
La méthode de dosage a été la microméthode de SOMOGYI [169]. Elle permet de doser des quantités de sucres comprises entre 0,01 et 3 mg.

### D. Dosage de l'arginine.

Nous avons choisi la méthode de dosage par le chloro-4 métacrésol [172]. Elle a l'avantage d'être simple, rapide et très sensible.

#### *Principe.*

Le dosage repose sur la formation d'une coloration jaune plus ou moins intense quand on traite le groupement guanidyle de l'arginine  $\text{H}_2\text{NC} \begin{array}{c} \parallel \\ \text{NH} \end{array}$  par le chloro-4



L'azote du groupement guanidyle dosé par cette méthode correspond bien à l'arginine comme cela a été vérifié par chromatographie sur papier. On effectue les lectures au spectrophotomètre à 4400 Å. La réaction reste stable pendant 1 heure.

#### *Arginine libre.*

Elle a été dosée dans les solutions aqueuses après évaporation à sec des extraits hydroalcooliques, délipidation et dépigmentation.

#### *Arginine protéique.*

Elle a été dosée dans les hydrolysats acides des résidus insolubles à l'alcool aqueux.

La technique de dosage de l'arginine dans les protéines, sans hydrolyse ni fractionnement, préconisée par STARON et Coll. [172] s'est avérée inapplicable à notre matériel végétal.

En effet, ainsi que le démontre le tableau 1, les résultats que nous avons obtenus sans hydrolyse acide et après hydrolyse acide ne sont pas comparables. Les dosages directs sur les résidus insolubles mis en contact avec de la soude donnent toujours des chiffres de beaucoup inférieurs.

Ni les changements de concentration en NaOH ni des durées variables de contact avec NaOH n'ont supprimé les différences.

Il y a visiblement, au moins dans notre cas, des pertes qui peuvent provenir soit de

l'instabilité de l'arginine en milieu fortement alcalin, soit de la solubilisation incomplète dans NaOH des résidus.

TABLEAU I  
DOSAGES COMPARATIFS DE L'ARGININE PROTÉIQUE

HYDROLYSE ACIDE	DIGESTION ALCALINE
<i>Gynophores +S</i> 1,050	<i>Gynophores +S</i> 16 heures = 0,299 28 heures = 0,299 48 heures = 0,312
<i>Feuilles +S</i> 1,195	<i>Feuilles +S</i> 24 heures = 0,584 96 heures = 0,569
<i>Feuilles —S</i> 1,080	<i>Feuilles —S</i> 24 heures = 0,575 96 heures = 0,527

#### E. Hydrolyse des protéines.

Le résidu insoluble dans l'alcool aqueux est hydrolysé par de l'acide chlorhydrique 6N, à la température de 120° C pendant 24 heures sous réfrigérant à reflux [192] [29].

Le liquide recueilli est évaporé sous vide jusqu'à siccité.

Le résidu sec est repris par l'eau et évaporé à nouveau à 6 reprises successives, pour éliminer totalement l'acide chlorhydrique.

Le résidu final est repris quantitativement par de l'eau.

Cette solution sert à la chromatographie des acides aminés protéiques et au dosage de l'arginine protéique.

#### F. Chromatographie sur papier.

Le développement des chromatogrammes a été réalisé dans une salle conditionnée spécialement dans ce but et où la température a été maintenue à 20° C.

### 1° GLUCIDES

Les extraits végétaux délipidés à l'hexane et déféqués au moyen de sulfate de zinc et de baryte ont été chromatographiés sur papier Whatman n° 4 et 1. On a utilisé la technique de chromatographie descendante. Le mélange développant a été celui de HOUGH, JONES, WADMAN [94] : butanol : éthanol : eau — 4 : 1, 1 : 1, 9. Il a été introduit dans l'augelette après saturation de la cuve par ce même mélange et l'établissement d'un

équilibre entre la vapeur de la solution et les papiers à chromatographier suspendus dans la cuve.

La séparation des taches se faisait en 20 à 24 heures.

Les glucides ont été relevés par le phtalate d'aniline : 1,48 g d'anhydride phtalique + 0,93 g d'aniline dans 100 ml de butanol saturé d'eau [147] et par une solution alcoolique d'acide chlorhydrique + urée : 5 g d'urée + 20 ml HCl 2 N + 80 ml environ d'éthanol à 95°, à la température de l'étuve de 105° C [50].

## 2° ACIDES AMINÉS

Nous avons effectué des chromatogrammes bidimensionnels descendants des acides aminés présents dans les solutions aqueuses des extraits végétaux et des acides aminés protéiques présents dans les solutions après hydrolyse acide des résidus végétaux insolubles.

Pour la fraction dite soluble, les poids de matériel végétal déposés sur chromatogrammes correspondaient soit à 40 mg de matière fraîche (avant 1965) soit à 6 mg de matière sèche (depuis 1965).

Pour la fraction dite insoluble, les quantités de l'hydrolysate du résidu insoluble dans l'alcool aqueux déposées sur chromatogrammes correspondaient soit à 20 µg d'azote protéique soit à 1 mg de matière végétale sèche. Le papier employé a été du Whatman n° 1. Les mélanges développants étaient composés de phénol saturé d'eau (1 : 1) dans le premier sens (18 à 21 heures d'écoulement) — le phénol était préalablement purifié selon la technique de DRAPPER et POLLARD [55] — et de butanol — acide acétique — eau (4 : 1 : 5) dans le second sens (18 heures d'écoulement). Les mélanges pour saturation des cuves se composaient : a) de la phase supérieure de la solution phénol — eau contenant 3 % d'ammoniaque, additionnée de CNK ; b) de la phase inférieure de la solution butanol — acide acétique — eau [182] [183]. La révélation des taches a été réalisée par une solution de ninhydrine à 2 % dans l'alcool à 95° contenant 2 % d'un mélange de 1 partie de collidine + 3 parties de lutidine, à laquelle on ajoutait une pincée d'hydrindantine [183] [29].

Toutes les solutions ont été préparées extemporanément.

Nous avons confectionné une étuve à révélation (fig. 7). Elle sert à la révélation des taches dans une atmosphère d'azote. Cette étuve est saturée par les vapeurs d'alcool à 95° tandis qu'un débit d'azote sous pression chasse l'air résiduel. L'étuve est maintenue à la température de 60° C.

L'identification des acides aminés a été faite par co-chromatographie avec des solutions témoins, par le Rf, par l'emploi de témoins internes et par des réactions caractéristiques.

## G. Chromatographie sur colonnes des acides aminés.

Les dosages des acides aminés libres ont été effectués sur l'autoanalyseur BECKMAN à la Faculté des Sciences d'ORSAY, Laboratoire de Physiologie Végétale\* selon SPACKMAN, STEIN et MOORE [170].

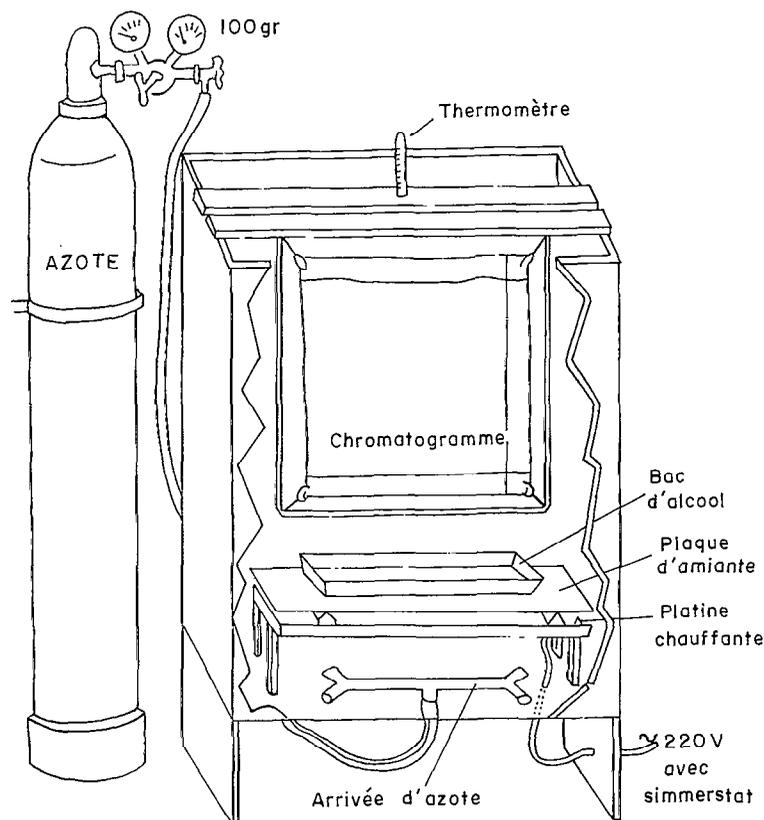


Fig. 7. — Étuve pour révélation des chromatogrammes

### Principe.

La technique comporte le fractionnement préliminaire des acides aminés au moyen d'une chromatographie sur colonne de résine, suivie de dosage colorimétrique des acides aminés élués, après réaction à la ninhydrine, réaction commune à tous les acides aminés.

### H. Chromatographie en couche mince des acides aminés.

Cette technique a été employé pour suivre l'hydrolyse enzymatique de l'arginine au cours de nos études sur l'activité arginasique. Sensibilité : de 1 à 30  $\mu\text{g}$  d'acides aminés.

Nous avons utilisé comme adsorbant la cellulose standard, sans gypse MN 300 de Macheray, Nagel et Co de calibre 10  $\mu$ . Les plaques ont été préparées au moyen de l'appareil DESAGA réglé pour une épaisseur de la couche de 0,25 mm.

Après avoir essayé plusieurs systèmes de solvants, nous avons adopté un mélange développant vis-à-vis duquel l'ornithine et l'arginine présentent des polarités suffisam-

\* Nous tenons à remercier ici M. le Professeur C. LIORÉ de nous avoir si aimablement permis de réaliser ces déterminations dans son laboratoire, ainsi que M<sup>me</sup> MÉTIVAUD sa technicienne, de son application dévouée dans l'exécution de ce travail.

ment différentes en chromatographie monodimensionnelle ascendante et dont voici la composition : N — propanol : ammoniacque diluée à 25 % — 50 : 50 [28] [194].

Après 3 h 30 à 22° C, le déplacement des spots est de l'ordre de 12 cm. Les plaques totalement séchées sont vaporisées avec un mélange de ninhydrine à 0, 2 % dans l'éthanol et révélées par un passage dans un courant d'air chaud.

## I. Déterminations des activités enzymatiques.

### 1° MESURE DE L'ACTIVITÉ ARGINASIQUE

L'activité enzymatique a été déterminée selon la méthode décrite par GUITTON [82]. Elle repose sur le dosage de l'urée engendrée par l'hydrolyse de l'arginine suivant la méthode de FOSSE [69].

Le choix des conditions expérimentales adaptées à notre matériel végétal a été déterminé par une série d'essais préliminaires. Ils nous ont amenés à augmenter la quantité de poudre végétale à 100 ou 150 mg au lieu de 50 mg de et prolonger le temps d'incubation de 30 minutes à 1 heure. Le temps d'incubation que nous avons adopté nous donne des activités proportionnelles. De même, les quantités de poudre végétale retenues sont telles que l'activité reste proportionnelle à la concentration en enzyme.

Ceci a été vérifié sur différents organes (voir chapitre : « Activité arginasiique »).

Les autres conditions retenues en 1965 étaient celles de GUITTON, c'est-à-dire, incubation à la température de 43° C avec 10 ml de solution d'arginine 0, 4 M dans le tampon CLARK et LUBS [18] non dilué à pH final = 9, 5.

Par la suite, en 1966 et 1967, nous avons été amenés à modifier les conditions du milieu d'incubation. En effet, dans ces études, nous avons recherché à réactiver l'arginase au moyen des ions  $Mn^{++}$  et de la cystéine. Ceci nous a obligés à effectuer toute une série d'essais préliminaires dans le but de trouver les paramètres les plus convenables. En particulier, en ce qui concerne l'action et les conditions d'une préincubation [80], la concentration en ions  $Mn^{++}$  et en cystéine et surtout la nature du tampon car le manganèse précipite dans la solution-tampon phosphate-soude.

Ces essais ont abouti à l'application des conditions suivantes dans nos études de la réactivation de l'arginase : tampons de SORENSEN (glycine+NaOH) [19] et maléate [80] [136] ; concentration en substrat = 0, 4 M ; pH final 9, 6 ; concentration en ion  $Mn^{++}$  = 1 mM ; concentration en cystéine = 20 mg pour 1 g m.s. La préincubation a été écartée.

### 2° MESURE DE L'ACTIVITÉ URÉASIQUE

La méthode est basée sur l'évaluation de la quantité d'urée exogène hydrolysée par le matériel végétal au moyen de dosage de l'urée restante. Le mode opératoire est celui utilisé dans la détermination de l'activité arginasiique [82].

La poudre végétale est additionnée d'une quantité convenable d'urée dans le tampon Tris ou CLARK et LUBS à pH = 7.

Pour chaque essai d'un même matériel végétal, deux témoins sont parallèlement préparés : 1) la poudre végétale dans le tampon à pH = 7 ; 2) le tampon+urée sans matériel végétal.

Après incubation pendant deux heures à la température de 43° C, la suite des opérations est celle décrite pour l'arginase.

## J. Utilisation de l'argine marquée au $^{14}\text{C}$ -5.

### 1° AUTORADIOCHROMATOGRAPHIE

Les chromatogrammes sur papier Whatman n° 1 ont préalablement été réalisés dans des conditions décrites par ailleurs. On rappellera que la quantité de l'extrait déposée sur un chromatogramme correspond respectivement à 6 mg de matériel végétal sec pour la fraction dite soluble et à 1 mg pour la fraction dite insoluble provenant de l'hydrolyse du résidu d'extraction hydro-alcoolique.

Dans ces deux fractions, la radioactivité totale varie selon la quantité de traceur absorbée par la plante et selon l'organe dans lequel ce traceur s'est localisé.

Il suffit donc, en chambre noire, de fixer directement un film KODIREX (support bleu, émulsionné sur deux faces) sur le papier chromatographique préalablement obtenu. L'ensemble film-chromatogramme est laissé en contact, à plat, à l'obscurité pendant le temps nécessaire à l'impression du film sensible. Ce temps d'exposition peut varier selon les taux de radioactivité de la fraction étudiée, ainsi qu'il a été indiqué plus haut. Pour la fraction soluble dont la radioactivité est plus importante, le temps d'exposition est généralement plus court ; il peut aller de 15 jours à 2 mois. Pour la fraction insoluble dont la radioactivité totale est plus faible, le temps d'exposition peut atteindre 3 à 4 mois. Après ce laps de temps, le film est développé selon les méthodes classiques.

La superposition du film développé sur le chromatogramme révélé à la ninhydrine, permet de localiser les endroits où se trouvent les produits radioactifs qui ont provoqué un noircissement local plus ou moins important du film. La comparaison avec les taches d'acides aminés étalons non radioactifs, révélés à la ninhydrine, facilite la détermination des acides aminés radioactifs.

### 2° MESURES DE LA RADIOACTIVITÉ

Nous avons compté la radioactivité des solutions correspondant aux fractions solubles et protéiques (après hydrolyse acide).

Les solutions ont été déposées dans les coupelles en acier de 30 mm de diamètre. Après évaporation à sec à l'infra-rouge, les coupelles sont fixées sur des supports et passées sous le compteur 9 fois.

Les comptages de la radioactivité du  $^{14}\text{C}$  ont été réalisés à l'aide d'une installation électronique de comptage automatique de radiations dont les caractéristiques sont les suivantes :

- compteur sans fenêtre à circulation de gaz (argon-méthane) ;
- faible mouvement propre par montage anticoincidence éliminant le bruit de fond dû aux causes secondaires ;
- très haute tension jusqu'à 5.000 V ;
- ensemble de comptage électronique à 5 décades à lampes ;
- passeur automatique d'échantillons de 60 mm de diamètre ;
- imprimeur-marqueur de temps sur précomptage d'impulsions.

Le diamètre des coupelles de 30 mm correspond à la moitié de la surface utile du compteur ce qui assure une très bonne géométrie. Le rendement est de 40 %.

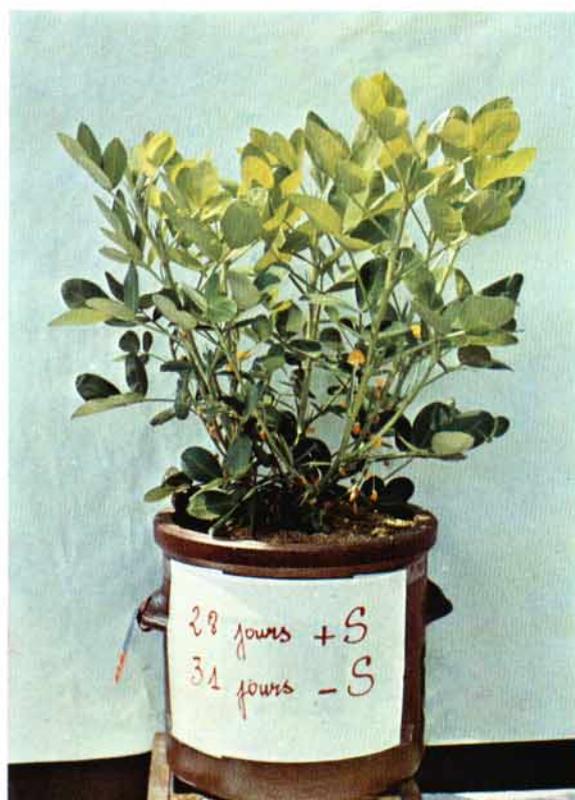
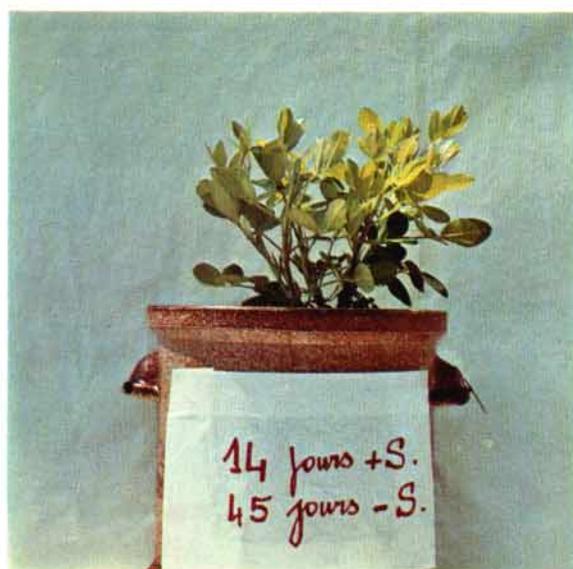


Fig. 8. — Influence de l'induction de la déficience en soufre sur la taille et la pigmentation des feuilles.

# *PARTIE EXPÉRIMENTALE*

## **I — INFLUENCE DE LA DÉFICIENCE EN SOUFRE SUR LA MORPHOLOGIE DES PLANTS D'ARACHIDE**

Ce problème a été étudié en détails dans une autre thèse [26] qui a été préparée en même temps que la présente sur le même matériel végétal. Néanmoins, il nous paraît indispensable de dégager très succinctement l'essentiel sur l'aspect morphologique de l'arachide déficiente en soufre.

### **A. PIGMENTATION.**

La chlorose des feuilles des étages supérieurs se manifeste très tôt, au stade de 5-6 feuilles, c'est-à-dire 2 semaines environ après la levée. On observe une coloration plus claire, jaunâtre, des plus jeunes feuilles d'abord. Ce phénomène se généralise à mesure que la déficience se prolonge.

Notons que ces symptômes visibles ne se sont pas manifestés chez les cultures réalisées dans les conditions d'éclairage insuffisantes, comme par exemple sous éclairage artificiel en journées courtes ou sous éclairage naturel en hiver. De même, ces symptômes n'apparaissent pas chez une variété d'arachide tardive : la 28.206.

L'induction et la correction de la déficience en soufre se traduisent très rapidement par un changement de coloration des jeunes feuilles, ainsi que l'on peut le voir sur les photographies (fig. 8).

### **B. TAILLE ET FORME DES PLANTES.**

On observe non seulement des modifications quantitatives mais également des changements qualitatifs sous l'influence de la déficience en soufre. On enregistre un retard très net de la croissance et du développement des plantes déficientes par rapport aux témoins — ralentissement du rythme de la croissance, apparition des fleurs et formation des gynophores et des gousses retardées.

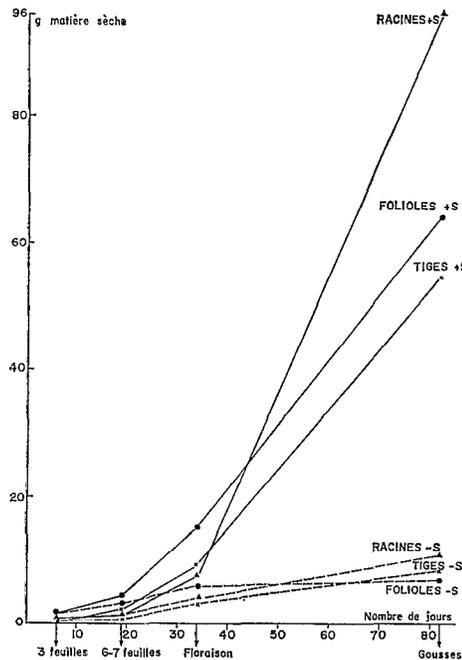


Fig. 9. — Matière sèche par organes de 10 plantes.

La taille des plantes déficientes est très réduite et n'atteint jamais la dimension normale. Ceci concerne tous les organes, sauf les racines, qui, elles, deviennent plus allongées. De plus, les folioles prennent une forme plus oblongue et plus pointue ; les tiges et les pétioles deviennent plus minces. La texture des tiges se trouve être modifiée de sorte que ces organes deviennent fragiles et cassantes.

Le nombre de pousses latérales de même que celui des fleurs, de gynophores et de gousses est sensiblement réduit.

En ce qui concerne le poids des plantes déficientes, on observe une diminution très importante pour tous les organes. L'effet dépressif est cependant moins marqué pour certains d'entre eux (par exemple les racines) que pour les autres, notamment les graines. La réduction de la production globale de la matière sèche peut atteindre, à la récolte, 91 %.

Voici, à titre d'exemple, un graphique illustrant les variations au cours de la croissance de la matière sèche des trois organes de plantes provenant de cultures en 1966 (fig. 9). On voit que les différences pondérales deviennent particulièrement sensibles à partir de la floraison et au moment de la formation des gousses, les trois organes des plantes +S pèsent 8 fois plus que les organes correspondants des plantes -S. Ce rapport monte à 15 si l'on prend en considération tous les organes de la plante (y compris les tiges latérales) pour lesquels nous n'apportons pas ici de données détaillées.

## II — ÉVOLUTION, AU COURS DE LA CROISSANCE, DE L'AZOTE DANS LES DIFFÉRENTS ORGANES DE L'ARACHIDE EN FONCTION DE LA DÉFICIENCE EN SOUFRE

### INTRODUCTION

Divers auteurs ont montré que le métabolisme de l'azote des végétaux est profondément altéré par suite d'une déficience en soufre.

Ainsi, par exemple NIGHTINGALE et coll. [143] constatent que les tomates déficientes en soufre contiennent beaucoup plus de nitrate que les plantes qui ont été alimentées normalement. Ils expliquent ce phénomène par le fait que la réduction des nitrates se trouve être ralentie sinon complètement inhibée par le manque de soufre.

EATON chez le soja [60], le tournesol [61], la moutarde noire [62] et la tomate [63] déficients en soufre, note également une accumulation des nitrates qu'il attribue à leur faible utilisation résultant de la basse teneur des plantes en réductase. Cet auteur constate en outre, chez les plantes — S et plus particulièrement dans les tiges, des teneurs élevées des fractions solubles en azote organique. Ceci est attribué, du moins en partie, à la protéolyse et en partie aux synthèses nouvelles de ces composés, ainsi qu'à un défaut de la protéosynthèse du fait d'un manque d'acides aminés soufrés.

THOMAS et coll., étudiant la luzerne [179], confirment les résultats obtenus par EATON avec d'autres espèces en montrant notamment que l'excès d'azote organique soluble chez la plante déficiente en soufre correspond à de l'azote sous la forme amide et amine.

ERGLE et EATON [66] puis ERGLE [65] constatent chez le cotonnier que les concentrations élevées de nitrate et d'azote organique soluble chez les plantes — S vont de pair avec une réduction importante de l'azote protéique dans les parties supérieures de jeunes plantes et dans les feuilles. Dans les tiges — S au contraire, ils trouvent davantage de protéines que dans les tiges + S. Ils arrivent ainsi à la conclusion que la réponse de la plante à la déficience en soufre, en ce qui concerne l'azote protéique, varie d'une espèce à l'autre. Chez le cotonnier et le soja, la concentration en protéines augmente ; elle varie peu chez la tomate alors que chez le tournesol et la moutarde la réduction est faible.

MERTZ et MATSUMOTO [129] notent chez la luzerne — S une baisse de l'azote protéique.

TOKUNAGA et TOKUOKA [185] [184] constatent une baisse de la concentration en protéines chez le riz privé de soufre et attribuent ce phénomène à l'inhibition de la protéogénèse.

Coïc et coll. [36] notent une faible augmentation de l'azote total et un fort accroissement de l'azote soluble chez l'orge —S.

Il résulte de cette revue bibliographique que la déficience en soufre conduit à une accumulation des composés azotés solubles, tandis que la protéogénèse se trouve freinée ou retardée, stimulée quelquefois. Certaines modifications de la composition en acides aminés libres et protéiques ainsi qu'en amides ont été signalées. La nature de ces modifications varie selon les espèces. Ce dernier point sera traité plus en détail dans l'introduction au chapitre sur l'arginine.

Dans notre étude, nous avons suivi chez l'arachide, l'évolution au cours de la croissance, des teneurs en azote total, en azote soluble et en azote protéique. Les dosages portaient sur diverses parties de la plante. Cette étude a été effectuée sur des récoltes s'échelonnant sur les années 1962 à 1967. En 1962 les dosages portaient sur deux fractions : parties aériennes prises ensemble et racines à partir du stade de 6 feuilles [84]. Dans les expériences réalisées depuis 1963, les parties aériennes ont été sectionnées en leurs différents organes figurant dans les tableaux et sur les graphiques, et les dosages ont été effectués également aux stades plus jeunes. Si les dosages de l'azote ont été repris chaque année, c'est d'abord afin de pouvoir calculer les autres déterminations par rapport à la teneur en azote. De plus, les stades physiologiques auxquels les prélèvements des plantes ont été effectués diffèrent d'une année à l'autre selon les besoins des expériences respectives.

D'autre part, en 1963-1964, nous avons étudié l'influence de l'induction et de la correction de la déficience en soufre au cours de la croissance sur les teneurs en azote.

## RÉSULTATS

Lorsqu'on se propose de comparer les résultats concernant les formes d'azote dans différents organes de la plante, il est sans doute logique que les chiffres soient rapportés à un nombre déterminé d'individus. Toutefois, dans le cas concret d'une comparaison entre les mêmes organes de plantes déficientes ou non en soufre, les différences pondérales arrivent à atteindre un tel degré que ce mode d'expression des résultats masquerait certaines perturbations du métabolisme azoté dues à la déficience en soufre. D'ailleurs, les auteurs qui ont étudié les incidences de la déficience en soufre sur le métabolisme de l'azote, ont adopté le mode d'expression des résultats par rapport à la matière sèche.

Ces raisons nous ont amenés à adopter les deux modes d'expression.

Les résultats provenant des analyses du matériel végétal de 1962 et ceux de 1965 ayant été déjà publiés antérieurement [84] [85], nous ne les représenterons plus ici.

Pour ne pas alourdir la présentation des résultats des autres années d'études, nous bornerons ici à ceux de l'année 1966, pour le cas des plantes +S et —S, couvrant un cycle végétatif allant du stade de 2-3 feuilles jusqu'au stade de la formation des gousses, et à ceux de l'année 1964 se rapportant au stade plus avancé de la formation des graines pour le cas de l'induction et de la correction de la déficience en soufre.

De plus, nous rapportons les résultats d'une autre expérience réalisée dans d'autres conditions (voir p. 61 : « Variation de l'arginine au cours de l'induction et de la correction de la carence en soufre ») traduisant l'effet de l'induction et de la correction de la déficience en soufre sur l'azote soluble et insoluble.

## A. PLANTES +S et —S.

### a. TENEURS DES PLANTES EN AZOTE (fig. 10 -a-b-c-d-e).

#### *α. Plantes non déficientes en soufre.*

Entre le stade de 3 feuilles et celui de la formation des gousses (entre 6 et 82 jours après la levée), on remarque une tendance à la diminution des teneurs en azote sous ses trois formes. Cette tendance s'avère être propre à tous les organes pris séparément. Entre les stades de 3 feuilles et de 6 feuilles (entre 6 et 19 jours après la levée), les teneurs des organes en azote protéique ne diminuent pas encore notablement. Les résultats obtenus pour le matériel végétal provenant des cultures de 1965 au stade intermédiaire de 4-5 feuilles, ont confirmé que la teneur des feuilles en azote protéique présentait un maximum à ce jeune stade de la végétation.

La fraction soluble diminue bien plus rapidement que la fraction protéique, ce qui est particulièrement sensible au jeune stade. A partir de la floraison jusqu'à la fin de l'expérience, l'azote soluble ne semble pratiquement plus varier.

La majeure partie de l'azote est en général constituée d'azote protéique. Toutefois, au jeune stade, l'azote soluble représente un pourcentage important de l'azote total, pourcentage qui, dans les tiges et les hypocotyles, peut même dépasser celui de l'azote protéique.

Les teneurs en azote total des racines sont toujours inférieures à celles des parties aériennes prises dans leur ensemble. Mais comparativement aux tiges il n'en est pas ainsi. Ce sont les folioles qui ont des teneurs en azote total les plus élevées, puis viennent les racines et enfin les tiges.

#### *β. Plantes déficientes en soufre.*

Les teneurs en azote total sont à tous les stades de la végétation supérieures à celles des organes des plantes +S, sauf dans les folioles jusqu'au stade de la floraison. A partir de ce stade, dans les folioles également, la situation change au profit des —S. La différence est plus importante pour les racines et surtout pour les tiges — où elle va s'accroissant au cours de la végétation — que pour les folioles. Dans ces derniers organes, la différence peu marquée d'ailleurs, entre les +S et les —S ne commence à se manifester que relativement tard. C'est surtout la fraction de l'azote soluble, laquelle constitue une partie importante de l'azote total, qui est responsable de l'écart entre les teneurs en azote total des organes +S et —S. Ce sont les tiges qui accusent, à partir de la floraison et jusqu'à la fin des expériences, les plus grandes différences entre l'azote soluble des plantes +S et —S. Quant à l'azote protéique, les teneurs sont généralement inférieures chez les organes des plantes —S que chez ceux des plantes +S.

Il est à noter que les teneurs en azote des cotylédons sont également plus élevées chez les —S que chez les plantes +S, ce qui laisse supposer que les plantes —S utilisent moins rapidement leurs réserves cotylédonaires que les plantes +S.

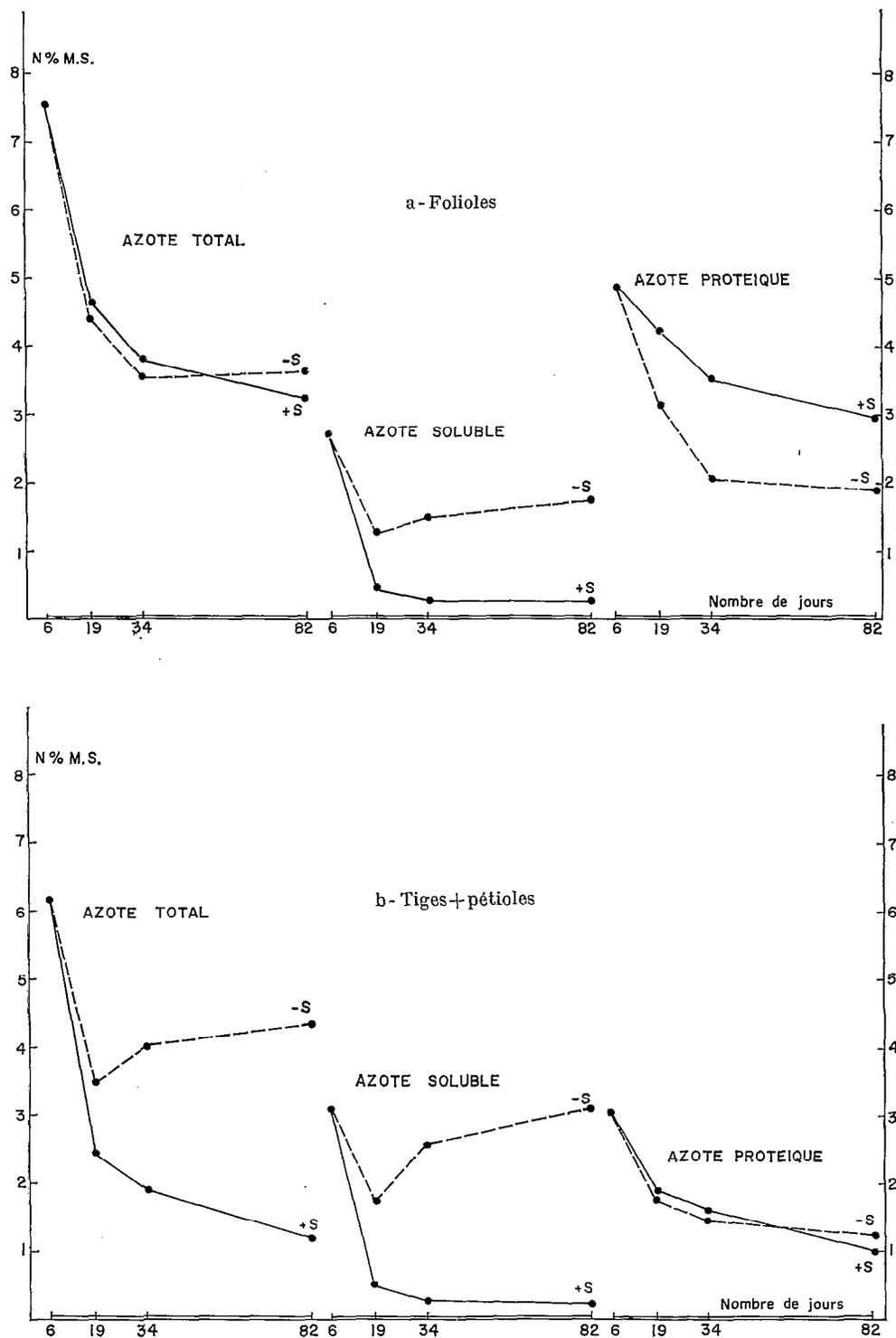


Fig. 10. — Évolution des teneurs en azote au cours de la croissance.

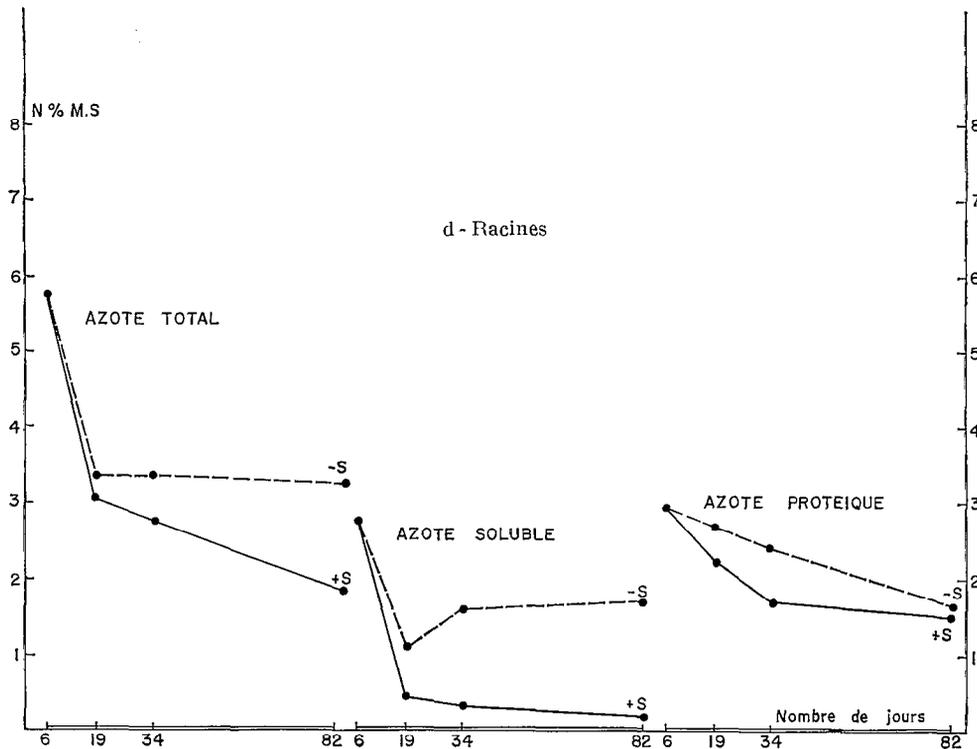
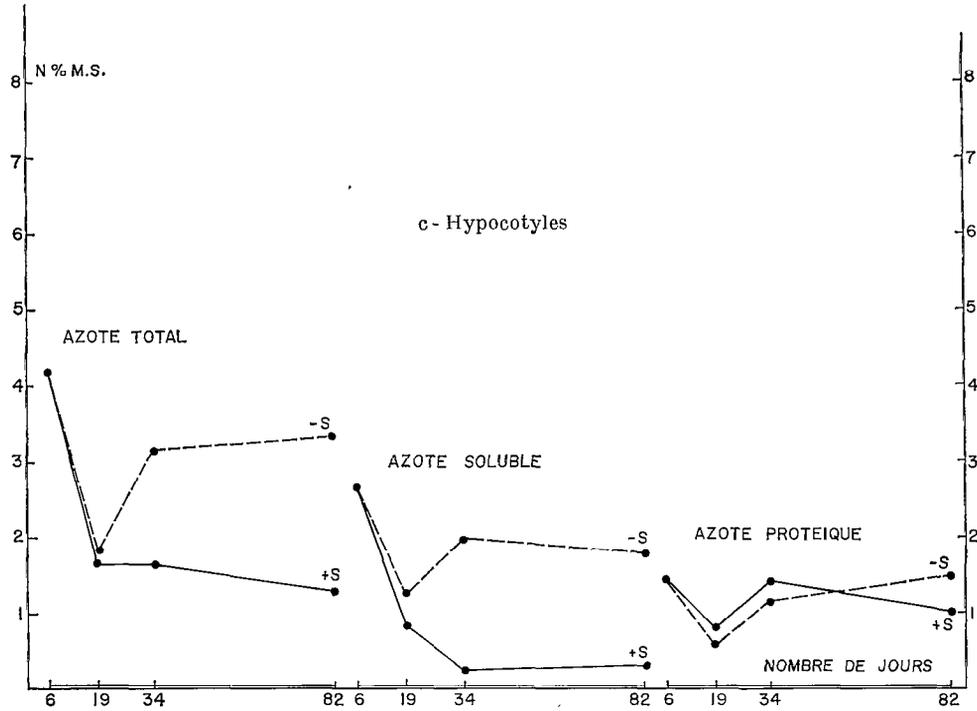


Fig. 10 (suite). — Évolution des teneurs en azote au cours de la croissance.

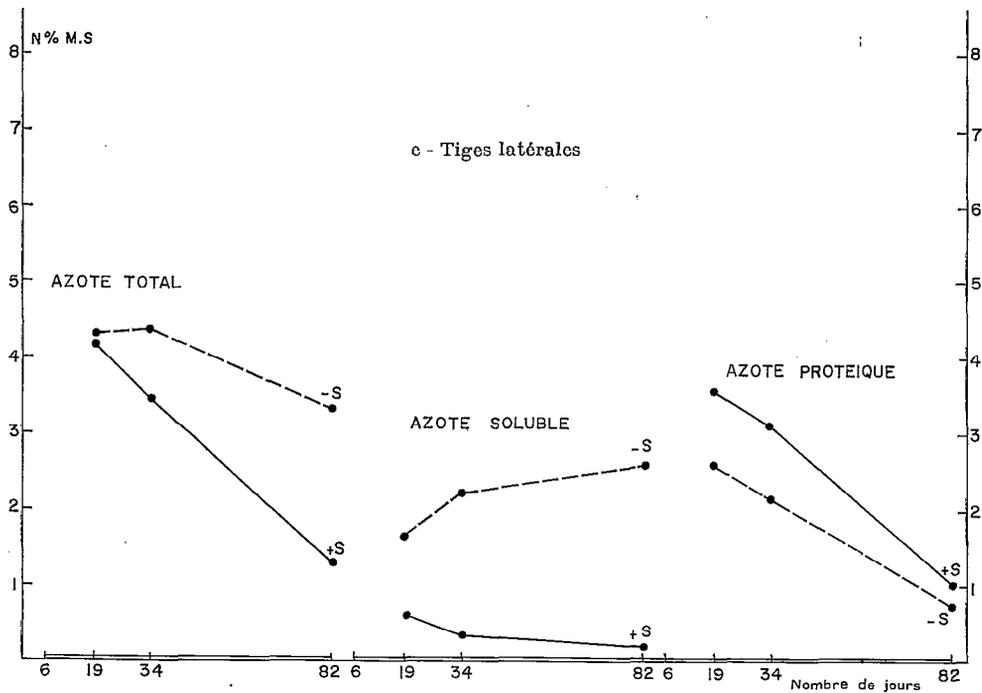


Fig. 10 (suite). — Évolution des teneurs en azote au cours de la croissance.

#### b. AZOTE EN MG PAR PLANTE (tableau II).

Si l'on calcule les résultats par rapport au poids de la plante, la tendance s'inverse naturellement, étant donné l'augmentation de ce poids qui devient très spectaculaire à partir de la floraison.

##### *α. Plantes non déficientes en soufre.*

L'azote total augmente tout au long de l'expérience dans tous les organes sauf, bien entendu, dans les cotylédons qui s'épuisent rapidement. La fraction de l'azote protéique qui constitue d'ailleurs la majeure partie de l'azote total, augmente bien plus rapidement que l'azote soluble. Cette dernière forme d'azote commence du reste par baisser et ce n'est qu'à partir de la floraison que l'azote soluble augmente également.

Jusqu'au dernier stade de la végétation, ce sont les folioles qui contiennent le plus d'azote sous les deux formes — soluble et insoluble. Au stade de la formation des gousses, les organes reproducteurs — les gynophores et les gousses — contiennent des quantités d'azote soluble beaucoup plus importantes que les folioles. Les racines, à tous les stades de la végétation, sont plus riches que les tiges en azote protéique.

Si l'on considère les rapports N soluble/N total, on constate qu'ils diminuent au cours de la végétation ; inversement, les rapports N protéique/N total augmentent, sauf dernier stade de la végétation, lorsqu'apparaissent les organes reproducteurs.

##### *β. Plantes déficientes en soufre.*

On observe chez les plantes —S la même tendance que chez les plantes +S à l'augmentation de l'azote sous ses trois formes au cours de la croissance des plantes. Mais contrairement aux plantes +S, cette augmentation chez les plantes —S est continue et on n'y observe pas de baisse au stade de 6-7 feuilles. De même, à l'inverse des plantes

+S, la forme soluble augmente chez les plantes —S plus rapidement que l'azote protéique et constitue, à la fin de la végétation, la forme dominante d'azote. Ce sont les tiges qui deviennent les plus riches en azote soluble de tous les organes.

TABLEAU II  
INFLUENCE DE LA DÉFICIENCE EN SOUFRE SUR LES DIFFÉRENTES FORMES D'AZOTE — Arachide 1966.  
(Résultats par organes de 10 plantes)

PARTIE DE LA PLANTE	AZOTE SOLUBLE en mg		AZOTE PROTÉIQUE en mg		AZOTE TOTAL en mg		AZOTE SOLUBLE		AZOTE PROTÉIQUE	
	en % de l'azote total									
STADE 2-3 FEUILLES										
Folioles.....	15,75		28,85		44,60		35,32		64,68	
Tiges + pétioles....	11,51		11,17		22,68		50,75		49,25	
Hypocotyles.....	14,52		7,87		22,39		64,85		35,15	
Cotylédons.....	33,76		107,42		141,18		23,91		76,09	
Racines.....	14,80		15,82		30,62		48,33		51,67	
Plantes entières....	90,34		171,13		261,47		34,55		65,45	
STADE 6-7 FEUILLES										
	+S	—S	+S	—S	+S	—S	+S	—S	+S	—S
Folioles.....	15,93	33,15	152,76	81,95	168,69	115,10	9,44	28,80	90,56	71,20
Tiges + pétioles....	10,61	26,95	39,17	26,95	49,78	53,90	21,31	50,00	78,69	50,00
Hypocotyles.....	3,28	4,15	3,16	2,04	6,44	6,19	50,93	67,04	49,07	32,96
Tiges latérales + feuilles.....	8,17	13,19	47,30	20,70	55,47	33,89	14,73	38,92	85,27	61,08
Cotylédons.....	9,80	11,98	28,99	30,96	38,78	42,94	25,27	27,90	74,76	72,10
Racines.....	8,40	20,16	46,90	40,50	55,30	60,66	15,19	33,23	84,81	66,77
Plantes entières....	56,19	109,57	318,26	203,10	374,46	312,68	15,07	35,04	85,00	64,95
FLORAISON										
Folioles.....	41,79	85,65	505,79	115,91	547,58	201,56	7,63	42,49	92,37	57,51
Tiges + pétioles....	28,86	78,54	144,32	45,28	173,18	123,82	16,66	63,43	83,34	36,57
Hypocotyles.....	1,90	8,00	10,07	4,52	11,97	12,52	15,87	63,90	84,13	36,10
Tiges latérales + feuilles.....	122,76	137,34	1050,28	136,71	1173,04	274,05	10,47	50,11	89,53	49,89
Racines.....	27,75	64,13	197,47	67,25	225,22	131,38	12,32	48,81	87,68	51,19
Plantes entières....	223,06	373,66	1907,93	369,67	2130,99	743,33	10,47	50,27	89,53	49,73
FORMATION DES GOUSSES										
Folioles.....	170,99	131,78	1887,32	141,56	2058,32	273,34	8,31	48,21	91,69	51,79
Tiges + pétioles....	125,05	235,74	538,26	93,99	663,31	329,73	18,85	71,49	81,15	28,51
Hypocotyles.....	16,69	20,57	60,20	16,61	76,89	37,18	21,70	55,33	78,29	44,67
Tiges latérales + feuilles.....	1388,37	864,25	12434,99	560,22	13823,36	1424,47	10,04	60,67	89,96	39,33
Fleurs.....	30,77	4,67	154,76	7,36	185,53	12,03	16,58	38,82	83,42	61,18
Gynophores.....	372,51	19,52	707,77	23,80	1080,28	43,32	34,48	45,06	65,52	54,95
Gousses.....	536,45	13,32	1051,01	15,61	1587,46	28,93	33,79	46,04	66,21	53,96
Racines.....	191,06	185,02	1566,69	164,47	1757,75	349,49	10,87	52,94	89,13	47,06
Plantes entières....	2831,89	1474,87	18401,00	1023,62	21232,90	2498,49	13,34	59,03	86,66	40,97

Contrairement aux plantes +S les rapports N protéique/N total chez les plantes —S diminuent au cours de la végétation, tandis que ceux de N soluble/N total augmentent.

Si à présent l'on compare les +S et —S du point de vue de leurs quantités d'azote, on constate que les dernières accumulent plus d'azote soluble dans tous les organes jusqu'au stade de la formation des gousses.

Au dernier stade de la formation des gousses, seuls les organes de transport des plantes —S contiennent toujours davantage d'azote soluble que les organes correspondants des plantes +S. En ce qui concerne l'azote protéique, à tous les stades, tous les organes +S en contiennent davantage que les —S.

## B. INDUCTION ET CORRECTION DE LA DÉFICIENCE EN SOUFRE.

Les résultats présentés ci-dessous proviennent de deux expériences différentes : l'une réalisée en 1964, l'autre en 1966. Pour la première nous ne disposons que des résultats en azote total ; pour la seconde les résultats portent sur les fractions de l'azote soluble et insoluble.

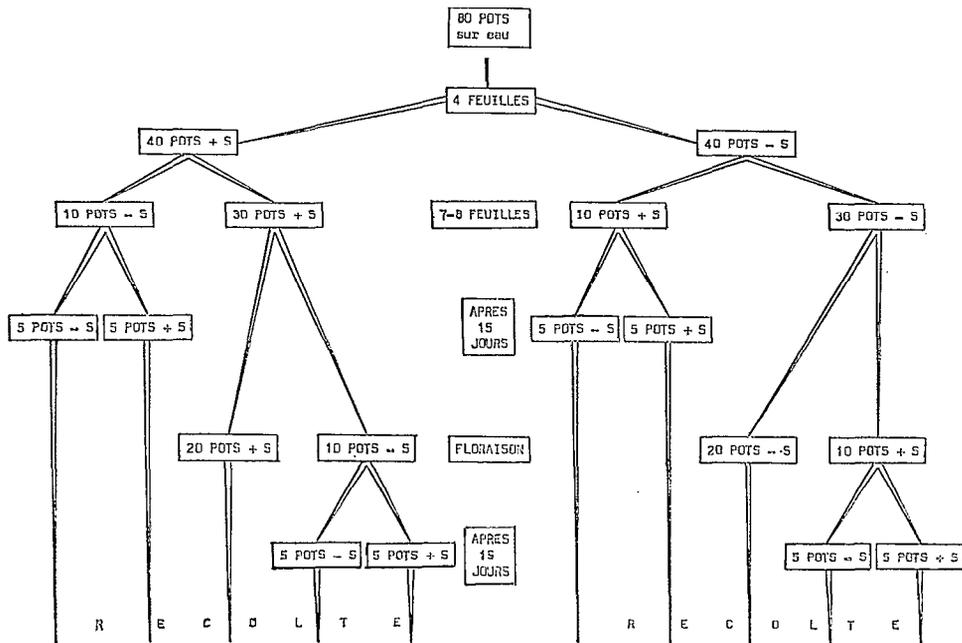


Fig. 11. — Schéma de l'expérience : « Induction et correction de la carence en soufre chez l'arachide », 1964.

La figure 11 représente le schéma de l'expérience de 1964. On y voit, en plus des traitements nutritionnels extrêmes +S et —S, des régimes intermédiaires. En effet, au stade de 7-8 feuilles, ainsi qu'à la floraison, les régimes nutritionnels ont été changés pour une partie des plantes +S et —S. Ainsi, à partir des deux stades ci-dessus mentionnés, un lot de plantes +S a été nourri avec la solution —S et inversement, un lot de plantes —S avec la solution +S. De plus, la moitié des lots ayant subi les changements de régimes nutritionnels a été remise après 15 jours dans les conditions des traitements nutritionnels primitifs.

Ainsi, au moment de la récolte, au stade de la fructification, on a des échantillons provenant de dix traitements nutritionnels différents : quatre correspondant à l'induction de la déficience pour une durée de plus en plus longue et un témoin +S ; quatre correspondant à la correction de la déficience pour des périodes analogues et un témoin —S.

De plus, les graines en provenance de toutes les variantes ont été divisées en trois lots : graines, dont le poids unitaire était inférieur à 100 mg [1], compris entre 100 mg et 200 mg [2], supérieur à 200 mg [3].

En ce qui concerne le schéma de l'expérience de l'année 1966 — voir plus loin (p. 61) : « Variation de l'arginine au cours de l'induction et de la correction de la déficience en soufre ».

#### a. TENEURS EN AZOTE

Le tableau III rend compte des répercussions de l'induction et de la correction de la déficience en soufre sur les teneurs en azote total des organes de l'arachide au stade de la formation des graines.

Notons que les graines au départ avaient une teneur en azote total de 4,62 %.

##### *α. Folioles.*

En comparant les variantes 1, 4, 5 puis 6, 9, 10 on constate que, lorsqu'on prolonge la durée de la déficience, les teneurs en azote total augmentent.

L'apport du soufre pendant 15 jours, soit au stade de 7-8 feuilles, soit à la floraison, a fait baisser les teneurs en azote total par rapport au témoin —S. Inversement, l'induction de la déficience pour une durée de 15 jours aux mêmes stades ne se traduit pratiquement pas par une élévation des teneurs par rapport au témoin +S.

##### *β. Tiges.*

En gros, les tendances sont les mêmes mais beaucoup plus accentuées pour les tiges que pour les folioles dans les cas des variantes 1, 4, 5 et 6, 9, 10 c'est-à-dire que plus la plante est déficiente en soufre, plus élevée se trouve être la teneur de la tige en azote total.

Comme chez les folioles, l'induction de la déficience pour une durée de 15 jours n'exerce pas d'influence sur les teneurs des tiges en azote total. Les effets de ce traitement ont été complètement corrigés par l'introduction ultérieure du soufre et ceci indépendamment de l'époque de l'induction de la déficience.

La correction de la déficience pour une courte durée a provoqué chez les deux variantes 7 et 8 une baisse très sensible des teneurs en azote total par rapport au témoin —S. Cette baisse est toutefois plus importante chez la variante 7. Ceci indique que l'apport du soufre au moment de la floraison corrige mieux la déficience du point de vue de la teneur en N total, que celui du stade précédent.

La correction de la déficience chez les organes conducteurs se montre rapide et durable.

##### *γ. Gynophores.*

Comme dans les cas des folioles et des tiges, plus on prolonge la déficience en soufre, plus les teneurs des gynophores en azote total augmentent.

Il est à noter que bien que ces organes ne se forment que tardivement, dans le cas présent 40 jours environ après la levée, l'influence du traitement nutritionnel au cours

TABLEAU III  
INDUCTION ET CORRECTION DE LA DÉFICIENCE EN SOUFRE CHEZ L'ARACHIDE.  
AZOTE TOTAL AU STADE DE FORMATION DES GRAINES

INDUCTION DE LA DÉFICIENCE															
TRAITEMENT NUTRITIONNEL	FOLIOLES		TIGES PRINCIPALES + PÉTIOLLES		TIGES LATÉRALES + FEUILLES		GYNO-PHORES		RACINES		GRAINES		PLANTE ENTIÈRE		
	NOMBRE DE JOURS 0 15 30 45 60 75 93							N % MS	mg N par plante	N % MS	mg N par plante	N % MS	mg N par plante	N % MS	mg N par plante
1+S → R	2,34	166,24	0,71	47,67	1,69	1.492,44	2,02	66,80	1,38	146,45	3,59	315,02	2.234,62		
2+S → -s → R	2,44	160,55	0,72	49,31	1,53	1.236,39	2,06	51,89	1,39	136,18	3,43	274,22	1.908,54		
3+S → -s → R	2,51	159,66	0,73	48,56	1,70	1.292,68	2,26	60,61	1,48	109,59	3,58	292,28	1.963,38		
4+S → -s → R	2,47	96,53	1,60	74,18	2,24	1.239,44	2,45	67,94	1,80	146,00	3,81	266,02	1.890,11		
5+S → -s → R	2,90	69,63	3,03	107,17	3,64	785,88	3,09	18,76	2,81	145,28	3,46	21,55	1.148,27		
CORRECTION DE LA DÉFICIENCE															
6-S → R	3,39	37,60	3,84	64,01	3,91	417,24	3,41	4,09	3,31	77,59	3,54	10,93	611,46		
7-S → +s → R	2,72	113,26	1,34	63,69	2,19	1.203,78	2,63	66,20	1,85	80,60	3,49	26,42	1.553,95		
8-S → +s → R	2,76	104,63	1,80	75,04	2,66	1.129,62	2,46	46,94	2,15	123,35	3,80	22,13	1.501,71		
9-S → +s → R	2,48	136,25	0,84	55,16	1,74	1.130,55	2,13	53,04	1,36	62,22	3,32	92,06	1.529,28		
10-S → +s → R	2,48	167,25	0,78	52,04	1,62	1.171,92	2,00	53,08	1,44	113,20	3,35	188,84	1.746,73		

R = Récolte

de la période préflorale se fait toutefois sentir. Aussi, la teneur en azote dans la 2<sup>e</sup> variante égale celle de la première et est inférieure à celle de la 3<sup>e</sup>. De même, la correction de la déficience en soufre a fait baisser davantage la teneur en azote total dans la variante 8 (c'est-à-dire celle où le soufre a été administré plus tôt) que dans la variante 7.

#### δ. Racines.

On remarque dans cet organe la même tendance que chez les autres à l'augmentation de la teneur en azote total en fonction de la prolongation de la durée de la déficience (variantes 1, 4, 5, 6) ; chez les 4 autres variantes (2, 3, 9, 10) on observe peu de différences, ce qui est dû sans doute à la rapide réponse des racines aux apports de l'élément déficient. Cette rapidité de réponse à la correction de la déficience s'observe aussi dans les variantes 7 et 8. On distingue néanmoins une différence entre les teneurs en azote des racines des variantes 7 et 8 au profit de la dernière. Sous ce rapport elles ressemblent aux variantes correspondantes chez les tiges. Ceci traduit les effets très différents de l'apport du soufre, suivant l'époque de son application.

#### ε. Graines.

Ainsi qu'on pouvait le prévoir, il y a peu de différence entre les teneurs moyennes en azote total des graines des diverses variantes. Ces différences deviennent plus marquées lorsqu'on examine les variantes des trois catégories des graines prises séparément (tableau IV). Une tendance à l'augmentation des teneurs en azote se dessine lorsqu'on prolonge la durée de la déficience en soufre. D'autre part, chez toutes les variantes, plus les graines sont lourdes, plus leur teneur en azote est élevée. On sait par ailleurs [26] que tant la quantité des graines que leur poids se trouvent être diminués sous l'effet de la déficience en soufre.

De ce fait, il est intéressant d'examiner les quantités d'azote total des graines en mg par plante.

### b. AZOTE TOTAL EN MG PAR ORGANES

En considérant les tableaux III et IV il faut tenir compte du fait que cette façon de présenter les résultats traduit la résultante de deux facteurs opposés : la teneur en azote de la matière sèche et la croissance plus ou moins intense de la plante sous l'influence de l'induction ou de la correction de la déficience en soufre.

#### α. Graines.

L'examen des résultats (tableau IV) fait apparaître que l'induction de la déficience en soufre provoque une baisse de l'azote dans les graines tout en retardant leur maturation.

Plus le stade auquel on induit la déficience est précoce plus le phénomène est marqué — variantes 4 et 5. En comparant à présent les variantes 2 et 3 on observe également un retard dans la maturation des graines : chez les graines pesant plus de 200 mg, l'accumulation d'azote, lorsqu'on a supprimé l'apport de soufre pendant 15 jours, à la floraison, est moins importante que chez celles où l'induction de la déficience pour le même laps de temps a été réalisé plus tôt.

La correction de la déficience provoque une accumulation d'azote dans les trois lots de graines, celle de la 10<sup>e</sup> variante étant deux fois plus élevée que celle de la 9<sup>e</sup>. La différence est de 2,5 pour les graines les plus mûres.

TABLEAU IV  
INDUCTION ET CORRECTION DE LA DÉFICIENCE EN SOUFRE CHEZ L'ARACHIDE  
AZOTE TOTAL DES GRAINES PAR PLANTE

n°	TRAITEMENT NUTRITIONNEL	GRAINES >200 mg		GRAINES <200 mg >100 mg		GRAINES <100 mg		TOTAL par plante	
		N % MS	N total mg	N % MS	N total mg	N % MS	N total mg	N % MS	N total mg
1	+S	3,71	234,80	3,33	68,82	3,00	11,40	3,59	315,02
2	+S → -S <sub>2</sub> → +S	3,63	182,34	3,24	74,11	2,59	17,77	3,43	274,22
3	+S → -S <sub>1</sub> → +S	3,69	240,72	3,32	39,98	2,66	11,58	3,58	292,28
4	+S → -S <sub>2</sub>	4,07	187,14	3,38	64,45	2,99	14,43	3,81	266,02
5	+S → -S <sub>1</sub>			3,81	18,69	2,91	3,86	3,46	21,55
6	-S			3,57	8,51	3,43	2,42	3,54	10,93
7	-S → +S <sub>2</sub> → -S	4,26	12,70	3,41	8,78	2,77	4,94	3,60	26,42
8	-S → +S <sub>1</sub> → -S	4,20	10,33	3,61	6,89	2,72	4,91	3,58	22,13
9	-S → +S <sub>2</sub>	3,64	38,88	3,30	36,25	2,79	16,93	3,32	92,06
10	-S → +S <sub>1</sub>	3,77	98,48	3,14	58,55	2,75	31,81	3,35	188,84

S<sub>1</sub> = Induction ou correction de la carence au jeune stade

S<sub>2</sub> = Induction ou correction de la carence à la floraison

Toutefois, en aucun cas la correction de la déficience n'a été suffisante pour que la formation des graines et l'accumulation par elles d'azote soient comparables au témoin +S.

### β. Folioles.

A mesure que la déficience s'accroît — variantes 1, 4, 5 et 6, 9, 10 — la quantité d'azote diminue. Les variantes 2, 3, 10 égalent le témoin +S. Une déficience de courte durée qu'elle soit induite tout au début de la croissance, au stade de 7-8 feuilles, ou à la floraison demeure sans effet sur la quantité d'azote accumulée dans les folioles.

La comparaison des résultats calculés en teneurs d'azote de la matière sèche avec ceux exprimés en mg/folioles montre que le fait marquant est la réduction de la croissance provoquée par la déficience en soufre.

### γ. Tiges.

Dans ces organes, malgré une croissance réduite, l'augmentation des teneurs est de telle importance que l'azote en mg/tige augmente à mesure que la déficience s'accroît. Dans toutes les variantes correspondant à la correction de la déficience, l'azote en mg dépasse la quantité obtenue pour le témoin +S.

Une induction de la déficience de courte durée (variante 2, 3) est sans influence.

#### δ. *Gynophores.*

Dans ces organes la déficience a plutôt pour effet de diminuer la quantité d'azote, surtout la déficience prolongée (variante 5) ou tardive (variante 2).

Il y a prédominance de la réduction de la croissance sur l'augmentation des teneurs en azote.

L'apport du soufre à l'époque de la floraison (variante 7) est plus bénéfique que celui appliqué au stade plus jeune (variante 8). Il faut supposer que ces organes qui ne se forment que lors de la deuxième moitié du cycle vital de la plante bénéficient plus directement de l'apport tardif du soufre que de celui qui a été mis à la disposition de la plante au plus jeune stade.

#### ε. *Racines.*

Dans ces organes, l'effet de la croissance neutralise la progression des teneurs en azote (variantes 1, 4, 5), lesquelles sont en augmentation à mesure que l'induction de la déficience se prolonge.

Dans le cas de la correction de la déficience, l'effet dominant de la diminution de la croissance est tel que l'azote en mg diminue malgré l'augmentation des teneurs.

### C. AZOTE TOTAL PAR PLANTE

L'examen des résultats correspondant aux sommes de l'azote total par plante des dix variantes consignées dans le tableau III conduit aux conclusions globales suivantes :

1) Plus la plante est déficiente en soufre plus elle est pauvre en azote (variantes 1, 4, 5 et 6, 9, 10).

2) L'induction de la déficience pour une durée de 15 jours soit au jeune stade soit à la floraison se traduit par une légère baisse de l'azote total par plante mais on ne remarque pratiquement pas de différence entre ces deux variantes.

3) Il est intéressant de souligner que les quantités d'azote sont comparables dans les variantes 7, 8 et 9, quoique la répartition de l'azote parmi les différents organes soit très différente. L'apport de soufre aux plantes déficientes pendant 15 jours (variantes 7 et 8) a un effet comparable à la correction de la déficience pendant deux mois à partir d'un stade plus avancé de floraison.

4) La réponse à l'induction et à la correction de la déficience varie selon l'organe. Dans les tiges, sous l'influence de la déficience en soufre, les teneurs en azote acquièrent de telles proportions, que malgré la réduction très substantielle de la croissance, l'accumulation de l'azote demeure très importante.

### D. AZOTE SOLUBLE ET INSOLUBLE

Les résultats confirment (tableau V) une fois de plus, l'incidence de la déficience en soufre sur l'augmentation de la teneur en azote soluble et la diminution de l'azote protéique. Si l'on calcule l'azote par plante entière on constate que sa quantité a diminué de presque la moitié chez les plantes —S. L'azote protéique chute de plus de trois fois. Cette chute est extrêmement importante dans les folioles et relativement faible chez les racines.

TABLEAU V  
AZOTE EN % M.S. (1966)

ORGANE	FRACTION	+S	—S	+S→—S	—S→+S
Folioles supérieures	Soluble	0,71	1,92	0,90	1,02
	Protéique	3,84	1,47	3,35	3,53
Racines	Soluble	0,42	2,02	0,85	0,69
	Protéique	2,08	1,60	1,97	1,84
Autres organes	Soluble	0,69	2,02	0,98	0,85
	Protéique	2,84	1,42	2,53	2,67
AZOTE EN MG PAR ORGANE ET PAR PLANTE					
Folioles supérieures	Soluble	5,34	5,66	5,83	3,70
	Protéique	28,88	4,34	21,71	12,81
Racines	Soluble	2,97	13,13	5,47	3,93
	Protéique	14,71	10,40	12,67	10,47
Autres organes	Soluble	17,16	24,85	22,42	11,82
	Protéique	70,63	17,47	57,89	37,11
	Soluble	25,47	43,64	33,72	19,56
	Protéique	114,22	32,21	92,27	60,39
TOTAUX	SOMME	139,69	75,85	125,99	79,95

La quantité d'azote soluble chez les plantes —S, malgré un poids très inférieur des plantes (voir tableau XXI, p. 72), reste au contraire très supérieure en comparaison avec les plantes +S. La différence est surtout sensible chez les racines (coefficient >4), et à peine amorcée chez les folioles. La répercussion si différente sur ces deux organes s'explique par leur poids qui diffère peu pour les racines et qui est au contraire très affecté pour les folioles. Cette différence de poids explique également que l'induction et la correction de la déficience tout en donnant des chiffres intermédiaires entre les extrêmes lorsqu'on exprime les résultats en pourcentage de la matière sèche, conduit, dans le cas des folioles —S→+S à un chiffre inférieur à celui obtenu pour +S, lorsque les résultats sont exprimés par individu. L'azote ayant beaucoup baissé et le poids n'a pas encore augmenté sensiblement.

## CONCLUSIONS

La déficience en soufre se traduit par une altération très profonde de l'équilibre entre les composés azotés solubles et les protéines. La fraction de l'azote soluble est plus atteinte que celle de l'azote protéique. L'augmentation de la teneur en composés azotés solubles dépasse de beaucoup la réduction des taux des protéines. Les parties aériennes sont plus affectées que les racines. La déficience en soufre a réduit évidemment la croissance. Malgré une différence pondérale très importante, la quantité d'azote soluble accumulée par les plantes —S dépasse celle des plantes +S et ceci jusqu'au stade de la fructification. A ce stade, seuls les organes de transport continuent à contenir une plus grande quantité d'azote soluble.

En pourcentage par rapport à l'azote total, les plantes déficientes en soufre contiennent à la fin de l'expérience (tableau II) à peu près 41 % de l'azote sous forme protéique et 59 % sous forme soluble, alors que les plantes +S ne contiennent à ce stade que 13 % d'azote sous forme soluble et le reste — 87 % — sous forme protéique.

Ceci témoigne en faveur de la thèse d'un freinage de la protéosynthèse chez les —S.

Soulignons également que les cotylédons sont au début les plus riches de tous les organes en azote protéique. Par la suite, les cotylédons +S en contiennent moins que les cotylédons —S, leur azote étant plus rapidement utilisé.

En ce qui concerne l'induction et la correction de la déficience la réponse varie selon l'organe considéré. D'une façon générale, plus la plante est déficiente en soufre, plus elle est pauvre en azote total (N en mg par individu).

Quant aux formes d'azote, l'induction de la déficience se traduit par une nette augmentation des teneurs en azote soluble, alors qu'elle affecte peu celles de l'azote protéique.

La correction de la déficience, tout en provoquant une diminution sensible des teneurs en azote soluble se répercute également d'une façon appréciable sur l'augmentation des teneurs en azote protéique.

Si donc l'introduction du soufre se traduit rapidement par une protéosynthèse, le processus inverse, la protéolyse, est longue à se manifester.

### III — ÉTUDE DE LA GRAINE D'ARACHIDE EN GERMINATION

Les études du métabolisme de l'azote en fonction de la déficience en soufre nous ont naturellement conduits à des recherches sur les acides aminés. Mais avant d'aborder les études sur la vie hétérotrophe de la plante d'arachide nous avons effectué une étude de la graine en germination.

On ne trouve en effet, dans la littérature que très peu de données se rapportant à cette période de la vie de l'arachide et en particulier en ce qui concerne le mécanisme d'utilisation des glucides et les transformations subies par les acides aminés aux tous premiers stades de la germination.

DUPERON [57] qui a étudié l'évolution des glucides au cours de la germination, dosait les glucides dans les semences puis dans les graines germées dont les radicules avaient de 1 à 30 mm, c'est-à-dire à partir du 5<sup>e</sup> jour de la germination. Il nous a paru intéressant d'analyser séparément les cotylédons et les germes dans les toutes premières phases de la germination. De même en ce qui concerne les acides aminés, FOWDEN, qui a découvert avec DONE [54] un nouvel acide aminé chez l'arachide — l'acide  $\gamma$  — méthylène-glutamique et son amide — la  $\gamma$  — méthylène-glutamine — s'est surtout penché sur l'étude de ces composés. Les recherches ultérieures de FOWDEN [70] se rapportent à la germination des graines d'arachide à partir du 3<sup>e</sup> jour de leur ensemencement.

Il y avait donc là également une lacune à remplir.

#### RÉSULTATS

##### A. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DES GLUCIDES SOLUBLES.

Ainsi que l'a déjà signalé DUPERON [57] nous trouvons (fig. 12) dans les graines d'arachide non germées du saccharose, du stachyose et des traces de raffinose. Les cotylédons ne contiennent que le premier de ces trois oses. Dans les deux parties analysées le glucide le plus abondant est le saccharose.

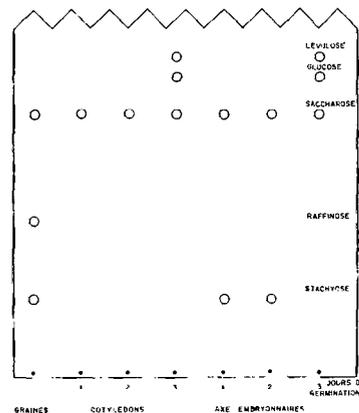


Fig. 12.

Dès l'apparition des germes, après 24 heures de germination, dans nos expériences, on ne décèle sur les chromatogrammes des cotylédons que du saccharose. Dans les mêmes conditions le stachyose persiste dans les radicules pendant 24 heures encore pour ne disparaître qu'après. En même temps dans les deux parties apparaissent les sucres réducteurs (glucose et fructose).

## B. DOSAGE DES SUCRES SOLUBLES.

Le tableau VI résume les données de l'expérience réalisée.

TABLEAU VI  
LA GRAINE D'ARACHIDE EN GERMINATION

Nombre de jours de germination	État initial 0		Apparition des germes 1 jour		3 jours		4 jours		5 jours		6 jours		
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A1	A2	B
Longueur moyenne des pousses en cm.	—	—	—	—	2,0	—	5,0	—	9,0	—	12,0	2,0	—
Matière fraîche de 100 plants en g...	1,34	55,27	3,35	75,73	35,30	80,46	64,93	94,37	79,93	79,20	170,78	23,62	79,49
Humidité %.....	2,81	11,04	58,49	35,08	86,61	43,92	87,33	52,27	87,36	43,28	89,14	88,70	40,03
Matière sèche de 100 plants en g...	1,30	49,17	1,39	49,16	4,73	45,12	8,23	45,04	10,10	44,92	18,55	2,67	47,67
Résidu insoluble en g pour 100 plants.	1,13	48,77	0,69	48,32	4,31	44,63	7,39	44,56	8,60	44,40	17,29	2,65	46,04
Sucres totaux en g par 100 plants....	0,10	1,65	0,07	0,84	0,41	0,49	0,83	0,48	1,50	0,51	1,25	0,02	0,16
Sucres réducteurs en g par 100 plants..	traces	0,10	0,02	0,24	0,39	0,43	0,44	0,38	1,33	0,03	1,15	0,02	0,12
Sucres hydrolysables en g par 100 plants	0,10	1,55	0,05	0,60	0,02	0,06	0,39	0,10	0,17	0,48	0,10	traces	0,04

A : axes embryonnaires, B : cotylédons, A1 : radicules, A2 : partie aérienne.

Pendant les premières heures de la germination il y a diminution des sucres hydrolysables dans la proplantule sur le point de percer. A partir de l'apparition du germe et jusqu'à la formation apparente des feuilles les sucres totaux et réducteurs augmentent dans les radicules.

Dans les cotylédons les sucres totaux continuent à diminuer jusqu'au 3<sup>e</sup> jour de la germination. Entre le 3<sup>e</sup> et le 5<sup>e</sup> jour ils se maintiennent presque au même niveau, puis diminuent à nouveau. Les sucres réducteurs, dans les cotylédons, augmentent au contraire jusqu'au 3<sup>e</sup> jour de la germination puis diminuent.

## C. ÉVOLUTION DES ACIDES AMINÉS LIBRES. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.

Après 8 heures d'imbibition des graines on a pu identifier 13 composés dans les cotylédons et 11 dans les axes embryonnaires. Ils sont repérés sur les chromatogrammes présentés sur la figure 13.

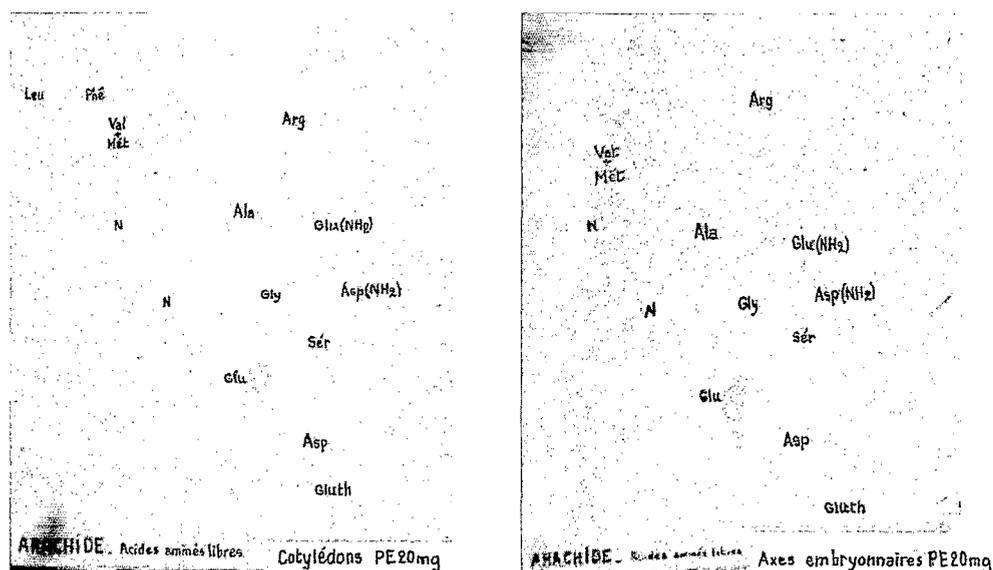


Fig. 13. — Acides aminés libres après 8 heures de germination : (N = non identifié).

On remarque que ce sont les acides glutamique et aspartique qui sont de loin les mieux représentés dans les deux fractions de la graine. Les axes embryonnaires semblent en contenir davantage que les cotylédons. Ce fait peut-il être mis sur le compte de l'hydrolyse des amides ? Dans la plupart des plantes une grande partie de l'azote protéique libéré se transforme finalement en amides : asparigine et glutamine.

Après 24 heures de germination on a révélé, sur les chromatogrammes des cotylédons, 7 nouveaux composés : la proline, la thréonine, la tyrosine, l'acide  $\gamma$ -NH<sup>2</sup>-butyrique, l'histidine et la lysine ainsi que le composé correspondant au R<sub>f</sub> de la  $\gamma$ -méthylène glutamine.

Sur les chromatogrammes des axes embryonnaires on trouve, à ce stade de la germination, les mêmes composés que sur ceux des cotylédons, ce qui porte leur nombre à 20.

Plus tard, après 3 jours de germination apparaît la tache correspondant à l'acide  $\gamma$ -méthylène glutamique.

## DISCUSSION ET CONCLUSIONS

### GLUCIDES

Il a été démontré que les lipides des réserves emmagasinées dans les cotylédons d'arachide et de tournesol se transforment au cours de la germination en glucides [133] [15] [83].

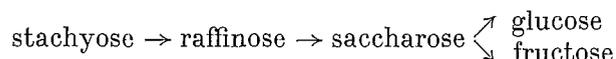
KORNBERG et BEEVERS [111] ont prouvé que la dégradation des acides gras et la synthèse des glucides dans l'endosperme du ricin s'effectue par l'intermédiaire du cycle glyoxylique. BRADBEER et STUMPF [16] pensent que le cycle glyoxylique est également applicable dans le cas de l'arachide et du tournesol. La voie métabolique allant des lipides vers les glucides pourrait donc être la suivante : acide gras  $\rightarrow$  acétyl — CoA  $\rightarrow$  cycle glyoxylique  $\rightarrow$  malate  $\rightarrow$  phosphoénol pyruvate  $\rightarrow$  triose phosphate  $\rightarrow$  hexose.

Le catabolisme des réserves glucidiques se manifeste avant la consommation des réserves lipidiques. Ce n'est qu'après que commence la conversion des acides gras en glucides.

Il y a dans la première phase de la germination, une utilisation très rapide des sucres de la proplantule, puis une mobilisation des sucres des cotylédons sous forme de sucres simples pour les besoins des radicules.

COURTOIS [41] a montré que lors des tous premiers moments de la germination, les deux saccharides (raffinose et stachyose) disparaissent. Par contre, le glucose, le fructose et le galactose augmentent avec le temps.

L'utilisation des sucres par la graine d'arachide en germination paraît suivre la voie :



Nous pouvons conclure avec DUPERON que les sucres de réserve présents dans la graine d'arachide sont utilisés dès le début de la germination, avant la consommation massive des lipides.

Les différences dans le temps de dégradation et d'utilisation des glucides au cours de la germination entre nos observations et celles de DUPERON proviennent très vraisemblablement des conditions thermiques des expériences ; nous pensons que la température de germination de 27° C convient mieux aux arachides que celle de 20° C utilisée par DUPERON.

#### SUBSTANCES AZOTÉES

Les variations des composés azotés dans les graines au cours de la germination ont fait l'objet de nombreuses études et revues bibliographiques [126] [109].

Aussi nous bornerons-nous à ne rapporter ici, très succinctement que les résultats de quelques-uns des travaux, relativement récents, pouvant servir pour l'interprétation de nos propres résultats.

Ainsi SIRCAR et coll. [166] distinguent 2 stades dans le métabolisme azoté du riz en germination. Durant les premières 72 heures prédomine l'hydrolyse des protéines endospermiques et l'azote soluble est transporté vers « l'embryon ». Ce dernier synthétise ensuite activement des protéines à partir d'azote provenant de l'endosperme.

DUMAZET et coll. [56] dans une étude sur *Phaseolus aureus* constatent que l'activité maximum des remaniements protéiques se situe au deuxième jour de la germination.

Le fait qu'après 8 heures d'imbibition nous ayons déjà trouvé toute une série d'acides aminés libres, semble indiquer que l'on est déjà là en présence d'un début de dégradation des protéines. Comment expliquer l'abondance des acides glutamique et aspartique par rapport aux autres acides aminés ?

Selon PRIANISHNIKOV [149], lors de la germination des graines, il se forme davantage d'asparagine qu'on en trouve dans les protéines. Ce fait semble indiquer que l'asparagine se forme non seulement à partir des protéines mais aussi par une voie secondaire, à partir d'autres acides aminés.

Depuis qu'EULER et coll. [67] [1] ont découvert en 1938 une glutamate deshydrogénase, KRETOVICH [113] a signalé cette enzyme dans le germe de blé et démontré la formation de l'acide glutamique à partir de l' $\alpha$ -cétoglutarate d'ammonium. Une intense synthèse de l'acide aspartique et d'alanine a lieu dans les extraits de blé et d'orge en germination, additionnés d'acide oxaloacétique. D'autres acides aminés des extraits

sont utilisés dans les réactions de transamination avec les acides oxaloacétique et pyruvique [114] [115] [117].

PANALAKS et coll. [146], en étudiant la biosynthèse de l'asparagine dans les plantules étiolées de pois, concluent que la formation de l'amide dans les cotylédons a lieu à partir de leurs réserves protéiques en passant par une transamination mettant en jeu l'acide oxaloacétique. Ils notent une conversion *in vitro* des acides glutamique et aspartique en asparagine en fonction du temps de germination.

LAWRENCE et GRANT [118] notent des différences entre les acides aminés de protéines et les acides aminés libres chez le pois en germination. Ils observent en particulier une augmentation considérable de l'homosérine alors que ce composé est absent au départ. Ils trouvent en outre que l'arginine est aussi importante du point de vue quantitatif que l'acide glutamique et l'asparagine, au cours de la germination.

BOULTER et BARBER [14] trouvent surtout de l'arginine dans les cotylédons de la fève entre 0 et 6 jours de germination.

MOSOLOV et ALEKSANDROWSKAJA [138] trouvent une diffusion des acides aminés dans le milieu extérieur lors de la germination des graines. La plus importante concerne l'asparagine et l'arginine et ceci au cours des quatre premières heures.

FOLKES et YEMM [68] émettent l'hypothèse que les graines de l'orge, durant la germination, respirent surtout aux dépens des acides aminés.

Il résulte de tout ceci que la quantité et le nombre d'acides aminés libres que l'on trouve dans les graines en germination ne peuvent pas être déterminés par la simple dégradation des protéines.

Dès le départ, les protéines semblent avoir une composition en acides aminés très différente selon l'espèce étudiée. Ensuite, dans l'axe embryonnaire, les protéines déjà existantes au moment de la germination, subissent une dégradation, en même temps qu'une protéosynthèse active s'y produit à partir des matériaux qui y ont été transportés en provenance de l'endosperme.

D'autre part, il y a interconversion des acides aminés libres entre eux.

Les données enregistrées par chromatographie représentent en fait une résultante d'un processus très complexe qui comporte, à côté de la dégradation des réserves cotylédonaire, celles des protides de la proplantule, et le transport sous forme soluble des produits de dégradation vers la nouvelle plantule. Dans cette dernière, il y a à la fois dégradation et synthèse des protéines. Chaque nouvelle elongation s'accompagne d'hydrolyse. Chaque édification de nouveau tissu, de synthèse.

A tous les stades du processus il y a amination, désamination, transamination, consommation et diffusion dans le milieu extérieur de certains composés.

Dans le cas de l'arachide, il y a probablement un début d'hydrolyse des protéines au cours des huit premières heures d'imbibition. L'abondance de l'acide glutamique indique que cet acide aminé joue un rôle extrêmement important dans le transport de composés azotés lors de la toute première phase de la germination de l'arachide. Ce composé, ainsi que l'acide aspartique, doit être vraisemblablement dû entre autres, à la dégradation des amides.

Ce n'est que plus tard, lorsque la plantule se prépare à former les parties vertes, que l'on observe l'apparition de quantités importantes de  $\gamma$ -MG et  $\gamma$ -MGA très caractéristiques et à l'existence desquels on attribue un rôle très particulier dont nous reparlerons. Ces composés sont absents dans les hydrolysats acides des protéines.

## IV — ÉTUDES DES ACIDES AMINÉS CHEZ L'ARACHIDE AU COURS DE LA CROISSANCE

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### A. ÉVOLUTION DES ACIDES AMINÉS LIBRES. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.

On a effectué par la méthode de la chromatographie sur papier, des études systématiques de la fraction des acides aminés libres des différents organes de l'arachide au cours de la croissance. Ces études avaient pour but de déterminer d'une part la nature et les variations qualitatives et semi-quantitatives des composés positifs à la ninhydrine et d'autre part de caractériser ceux ou celui d'entre eux qui sont le plus atteints par la déficience en soufre.

La figure 14 représente la composition de la fraction des acides aminés libres et les amides des trois organes (cotylédons, racines et folioles) au stade de deux feuilles (plantules sur H<sub>2</sub>O). Ainsi, on constate la présence, dans les cotylédons, de toute la gamme de composés en proportion inégale, y compris de l'acide  $\gamma$  — MG et de son amide qui n'a pas pu être jusqu'à présent décelé dans les protéines dites de réserve. Dans les deux autres organes, folioles et racines, on observe à quelques exceptions près, les mêmes composés mais en quantités différentes. Les taches dans les deux organes paraissent en général plus petites et moins intenses que chez les cotylédons et plus petites chez les racines que chez les folioles. Seule l'asparagine paraît se trouver en plus grandes quantités que chez les cotylédons.

Aussi bien dans les folioles que dans les racines, on trouve au niveau horizontal et à droite de l'arginine une tache qui a été désignée comme étant un peptide. Cette tache apparaîtra dans tous les organes tout au long de la croissance. Elle disparaît avec les amides y compris la  $\gamma$  — MG après hydrolyse.

L'absence de l'acide  $\gamma$  — méthylène glutamique dans les racines a déjà été signalée.

La figure 15 représente la composition de la fraction des acides aminés libres et des amides au stade un peu plus avancé de 2-3 feuilles des trois organes végétatifs : racines, tiges, folioles (plantules sur H<sub>2</sub>O).

On remarque la place prépondérante qu'occupe dans la réserve d'acides aminés solubles, l'acide  $\gamma$  — méthylène glutamique et son amide ainsi que l'asparagine chez les folioles.

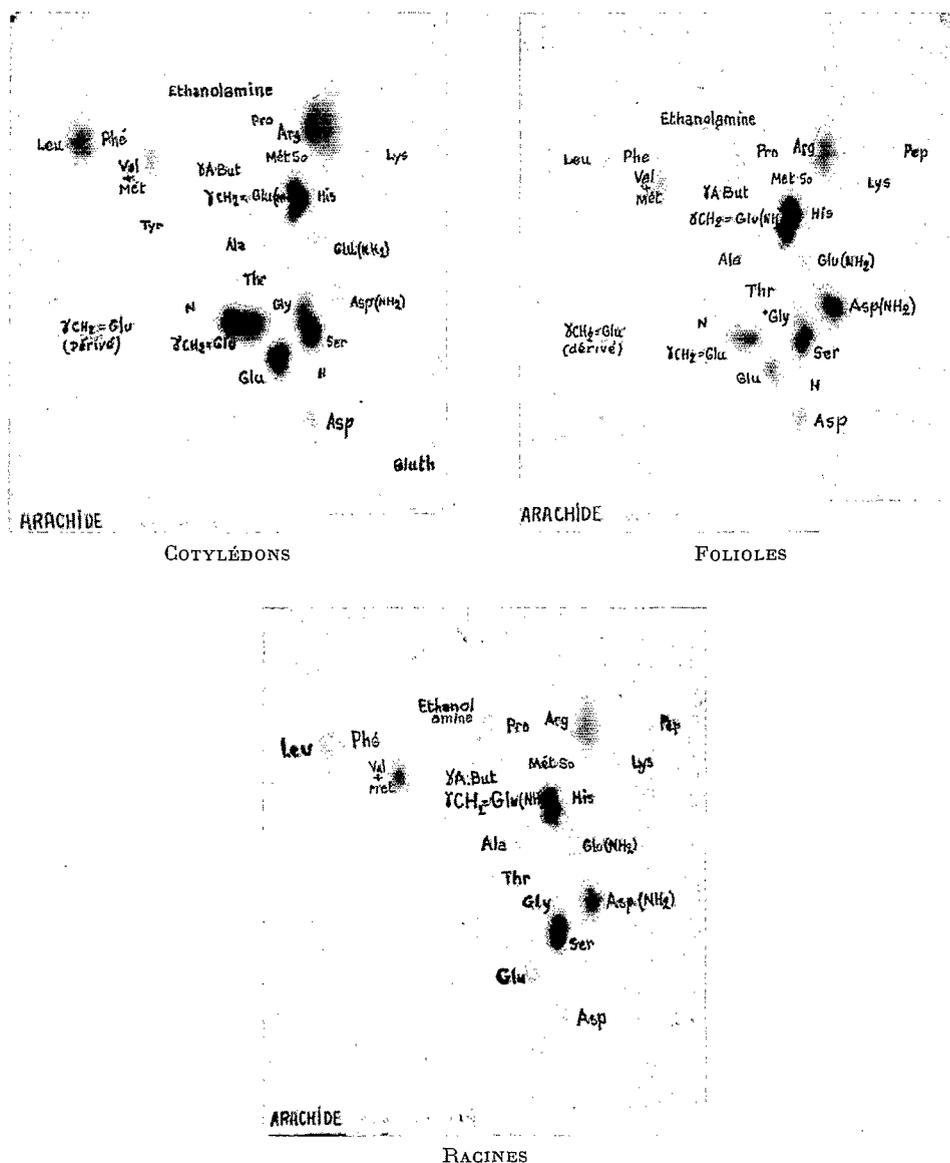


Fig. 14. — Acides aminés libres de l'arachide au stade de 2 feuilles : (N = non identifié).

On note également l'absence du glutathion dans les racines.

Les tiges, tout en comportant la même gamme de composés positifs à la ninhydrine, viennent après les folioles quant à leur quantité.

A mesure que la plante se développe, les taches correspondant à tous les acides aminés libres diminuent dans tous les organes de la plante. On ne décèle de différences qualitatives entre les organes qu'en ce qui concerne l'acide  $\gamma$  — méthylène glutamique absent dans des racines.

La déficience en soufre se traduit par une tache de plus en plus importante de

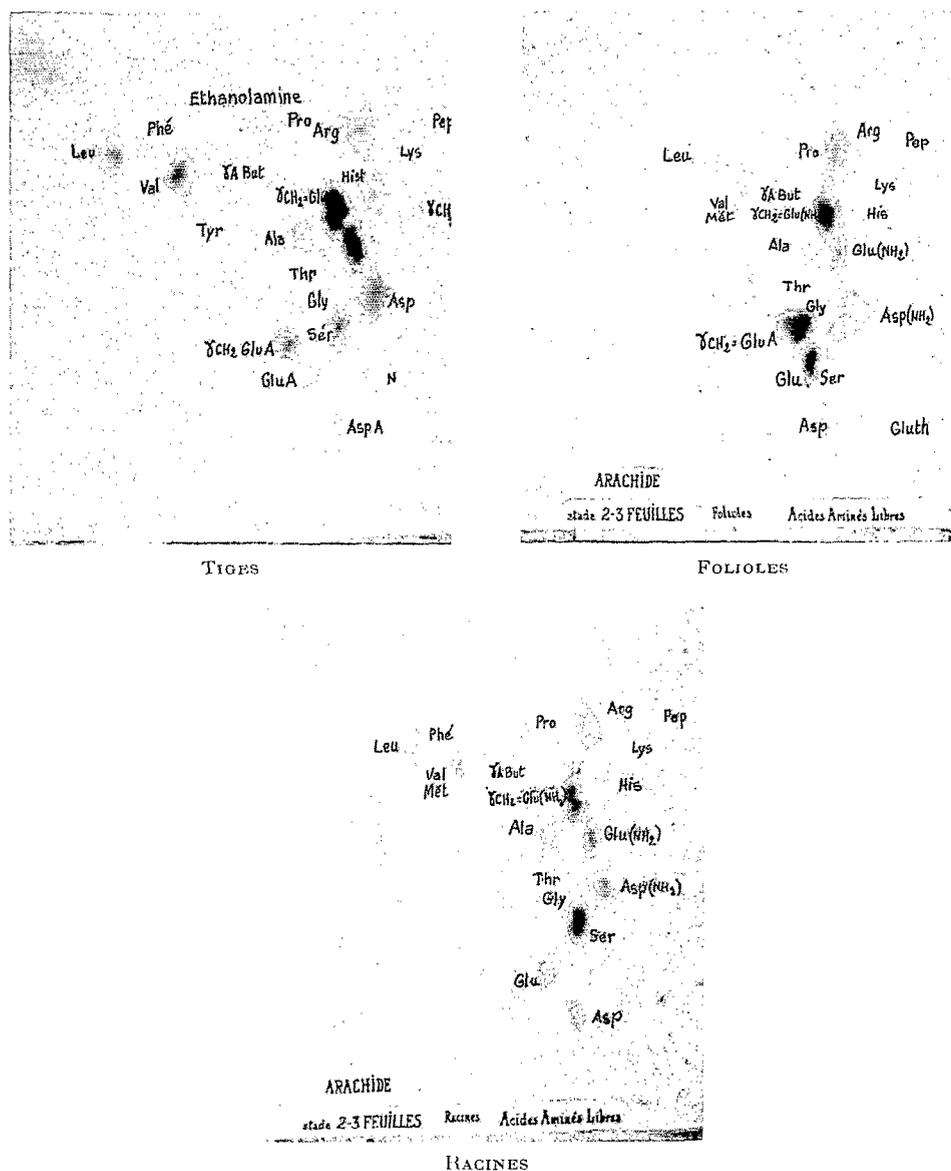


Fig. 15. - Acides aminés de l'arachide au stade de 2-3 feuilles.

l'arginine dans tous les organes à côté d'une tache assez importante de l'asparagine. La tache de l'arginine prend des proportions considérables au stade avancé de la végétation.

Signalons que nous avons pu constater également le phénomène d'accumulation de l'arginine dans les racines et les parties aériennes, chez le cotonnier déficient en soufre. Dans les parties aériennes on a observé de même une accumulation d'asparagine se formant sous l'influence de cette déficience.

Signalons aussi que le même phénomène d'accumulation de l'arginine a pu être

constaté chez les plantes déficientes ne présentant pas encore de signes visibles de carence en soufre.

En effet, les plantes cultivées dans des conditions déficientes du point de vue de l'éclairage, en hiver sous éclairage naturel notamment, ou sous éclairage artificiel de 5000 à 8000 Lux pendant 8-9 heures par jour, ne présentent pas de symptômes extérieurs de déficience en soufre. Il faut prolonger le temps d'éclairage jusqu'à 12-14 heures pour voir apparaître les symptômes de la déficience chez les plantes — S. Ce fait semble indiquer que l'accumulation de l'arginine n'est pas une conséquence directe de la déficience de l'appareil pigmentaire de la plante, lequel, dans les conditions normales d'éclairage, se trouve être très affecté par la déficience en soufre.

Encore serait-il très intéressant de rechercher quels sont précisément les composants pigmentaires affectés par cette déficience.

En ce qui concerne l'acide  $\gamma$  — méthylène glutamique et son amide, on sait que les plantes supérieures contiennent divers dérivés de l'acide glutamique dont ces deux composés pourraient faire partie. Le processus par lequel ils se forment n'est pas connu avec certitude.

#### **B. COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DE LA FRACTION PROTÉIQUE. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.**

La composition de la fraction insoluble des plantes +S et — S paraît être sensiblement la même. Il faudrait avoir recours à des déterminations plus fines pour pouvoir conclure avec certitude s'il existe du point de vue quantitatif quelques différences.

Toutefois, il est possible de constater d'après les chromatogrammes des acides aminés protéiques que pour la même prise les taches correspondant aux acides aminés des organes des plantes +S sont plus importantes que celles correspondant aux — S.

Nous y avons pu identifier les acides aminés suivants : glycine + sérine, acide aspartique, acide glutamique, lysine, leucine + phénylalanine, valine + méthionine, arginine, alanine, thréonine, histidine, tyrosine, acide cystéique, hydroxyproline.

#### **C. ÉTUDE DE L'EXUDAT DES TIGES ET DES PÉTIOLLES. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER.**

La découverte par DONE et FOWDEN [54] d'un nouvel amide chez l'arachide et les recherches poursuivies par FOWDEN [70] à la suite de cette découverte nous ont incités à reprendre l'étude du transport de ce composé en relation avec la déficience en soufre.

L'étude a été effectuée par chromatographie sur papier des exudats des tiges et des pétioles.

On a sectionné des lots de tiges et de pétioles sans enlever les plantes des milieux sur lesquels elles poussaient. Chacun des lots a été sectionné à un niveau différent de la tige. Les sections supérieures ont été écartées. Le jus ascendant, apparaissant à la surface sectionnée des plantes dont les racines trempaient soit dans l'eau, soit dans les solutions nutritives, a été déposé sur des papiers chromatographiques à mesure qu'il s'exudait. On a ainsi obtenu des chromatogrammes de la sève ascendante en provenance des plantes +S et — S, qui a été recueillie séparément à des niveaux différents de la tige et à partir des pétioles des différents étages foliaires.

Ceci a été réalisé d'une part avec des plantes au stade de 3 feuilles cultivées sur eau, donc sans apport d'azote exogène, et d'autre part avec des plantes au stade de 6-7 feuilles, cultivées en pots de sable avec solutions nutritives +S et --- S.

La chromatographie sur papier ne révèle, pratiquement dans tous les cas étudiés, qu'un seul composé la  $\gamma$  — méthylène glutamine. Dans l'exudat des pétioles on décèle, en plus, des traces de l'acide  $\gamma$  — méthylène glutamique. L'exudat des tiges — S permet de révéler, en plus de la  $\gamma$  — MG, des traces d'asparagine et des acides aspartique et glutamique.

Ainsi la  $\gamma$  — MG apparaît être la forme principale de transport de l'azote chez l'arachide. Ce qui confirme les résultats de FOWDEN.

Notons à cette occasion que les chromatogrammes des jus de presse en provenance des parties aériennes et des racines correspondant aux mêmes plantes révèlent les gammes habituelles d'acides aminés et d'amides. Parmi eux, on remarque la tache non plus à l'état de trace, mais très bien représentée dans les parties aérienne, de l'acide  $\gamma$  — méthylène glutamique, composé totalement absent dans les racines.

Ajoutons encore que FOWDEN, qui a étudié la désaminase chez l'arachide avec comme substrat la  $\gamma$  — MG, a trouvé une forte activité dans les feuilles et pas d'activité du tout dans les racines\*.

#### D. VARIATION DES ACIDES AMINÉS LIBRES AU DÉBUT DE LA CROISSANCE. CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNES.

Nous avons dosé, par chromatographie sur colonne à l'aide d'un auto-analyseur, les acides aminés et amides de folioles récoltées aux stades de 2-3 feuilles et de 6-7 feuilles. Au stade de 2-3 feuilles, les plantes se trouvent encore sur l'eau sans apport de sels nutritifs. Les solutions nutritives +S et — S ont été fournies immédiatement après le premier prélèvement.

Le tableau VII présente les résultats des dosages calculés en  $\mu$ moles par gramme de matière sèche.

On remarque qu'au jeune stade, les folioles sont très riches en amides, en arginine et en acide  $\gamma$  — méthylène glutamique et son amide. La colonne relâche d'une part, l'acide glutamique en même temps que la  $\gamma$  — méthylène glutamine, d'autre part la glycine en même temps que l'alanine et l'acide  $\gamma$  — méthylène glutamique. Il est difficile dans ces conditions d'évaluer la part de l'acide glutamique, de la glycine et de l'alanine, lesquels, à ce stade, sont encore assez abondants dans la plante.

Au stade ultérieur on observe en général une diminution de la teneur des acides aminés et des amides, aussi bien chez les folioles +S que chez les folioles — S. Dans les deux cas la proline disparaît, alors qu'apparaissent un composé non identifié X et l'homoserine. Seul l'acide aspartique n'a pas diminué par rapport au stade précédent.

L'abaissement de la quantité des acides aminés au stade de 6-7 feuilles est, d'une manière générale, moins importante chez les folioles --- S que chez les folioles +S. Toutefois, certains acides aminés diminuent davantage, au contraire, chez les folioles

\* Nous tenons à exprimer ici nos vifs remerciements au Professeur FOWDEN de nous avoir si aimablement fourni des échantillons de ses poudres — la  $\gamma$ -MG et la  $\gamma$ -MGA.

TABLEAU VII  
ACIDES AMINÉS ET AMIDES DES FOLIOLES EN  $\mu$ MOL. POUR 1 G DE MATIÈRE SÈCHE

ACIDES AMINÉS	2/3 Feuilles Plantes sur H <sub>2</sub> O	6/7 Feuilles	
		+S	—S
Lysine.....	2,35	0,41	1,41
Histidine.....	12,31	0,27	2,29
Arginine.....	46,78	1,69	89,75
$\gamma$ NH <sub>2</sub> Butyrique.....	1,23	0,45	0,38
Ornithine.....	Traces	0,07	0,38
non identifié X.....	—	0,68	0,75
SO-Méthionine.....	7,95	1,80	3,63
Acide aspartique.....	9,40	10,58	10,00
non identifié Y.....	5,37	3,71	5,00
Thréonine.....	9,07	2,36	3,69
Sérine.....	20,48	7,65	11,38
Amides.....	313,94	8,33	174,38
Homosérine.....	—	1,80	Traces
Proline.....	30,67	—	—
Acide glutamique + $\gamma$ -méthylène glutamine.....	141,02	79,01 { 1 — 41,08 2 — 37,93	53,44 { 1 — 25,61 2 — 27,83
Glycine + Alanine + acide $\gamma$ -méthy- lène glutamique.....	96,03	9,62 { 1 — 1,91 2+3—7,71	8,56 { 1 — 2,19 2+3—6,37
Cystéine.....	—	Traces	—
Valine.....	6,16	0,96	0,50
Méthionine.....	—	Traces	Traces
Isoleucine.....	5,04	0,54	0,63
Leucine.....	3,36	0,43	0,56
Tyrosine.....	1,12	0,43	Traces
Phénylalanine.....	2,13	0,62	Traces

— S que chez les folioles +S. Ce sont l'acide  $\gamma$ -amino-butyrique, les mélanges acide glutamique +  $\gamma$ -méthylène glutamique et glycine + alanine + acide  $\gamma$ -méthylène glutamique, la valine, la tyrosine et la phénylalanine.

Les autres acides aminés ont une teneur plus élevée chez les folioles — S que chez les folioles +S.

Il est curieux d'observer que les folioles déficientes en soufre retiennent une plus grande quantité de SO-méthionine que les folioles abondamment pourvues en cet élément. Cependant, et bien que les amides soient à ce stade encore présentes en abondance chez les folioles — S, c'est l'arginine qui est le seul acide aminé dont la teneur augmente chez ces folioles entre les deux stades. C'est donc le seul composé au sujet duquel il est permis de dire qu'il s'accumule.

Cette dernière constatation nous a conduit à l'étude du métabolisme de l'arginine.

Le calcul de l'azote aminé et amidé en pourcentage de l'azote soluble montre que si au stade de 2-3 feuilles il représente plus de 70 % il tombe, au stade de 6-7 feuilles, chez les folioles +S, à environ 47 % alors que chez les — S il se maintient aux environs de 70 %. L'arginine chez ces dernières constitue plus de 2/5 de la somme de l'azote aminé et amidé (tableau VIII).

TABLEAU VIII  
ACIDES AMINÉS ET AMIDES DES FOLIOLES EN % DE L'AZOTE SOLUBLE

ACIDES AMINÉS	2/3 Feuilles Plantes sur H <sub>2</sub> O	6/7 Feuilles	
		+S	-S
Lysine.....	0,27	0,21	0,23
Histidine.....	2,10	0,21	0,57
Arginine.....	10,61	1,73	29,69
γNH <sub>2</sub> Butyrique.....	0,07	0,12	0,03
Ornithine.....	Traces	0,04	0,06
Non identifié X.....	—	0,17	0,06
SO-Méthionine.....	0,45	0,46	0,30
Acide aspartique.....	0,53	2,71	0,83
Non identifié γ.....	0,31	0,95	0,41
Thréonine.....	0,51	0,61	0,31
Sérine.....	1,16	1,96	0,94
Amides.....	35,61	4,27	28,84
Homosérine.....	—	0,46	Traces
Proline.....	1,74	Traces	Traces
Acide glutamique + γ - méthylène glutamine.....	12,00	30,01 { 1—10,54 { 2—19,47	6,72 { 1—2,12 { 2—4,60
Glycine + Alanine + Acide méthylène glutamique.....	5,45	2,47 { 1—0,49 { 2+3—1,98	0,71 { 1—0,18 { 2+3—0,53
Cystéine.....	—	Traces	—
Valine.....	0,35	0,25	0,04
Méthionine.....	—	Traces	Traces
Isoleucine.....	0,29	0,14	0,05
Leucine.....	0,19	0,11	0,05
Tyrosine.....	0,06	0,11	Traces
Phénylalanine.....	0,12	0,16	Traces
TOTAUX.....	71,82	47,15	69,84

## V — L'ARGININE

### INTRODUCTION

Il est bien connu que la déficience de certains éléments minéraux dans les milieux nutritifs provoque une altération du métabolisme azoté chez les végétaux. Elle se traduit par une réduction du taux des protéines accompagnée d'une accumulation des composés azotés solubles et plus particulièrement de certains acides aminés ou amides.

Ainsi, ont été signalés l'accroissement considérable de la teneur en arginine dans les cas de carence en phosphore [71] [77] [145] [173] [181], en fer [93], en manganèse [91] et en potassium [145] [148] [161], la présence de grandes quantités d'acide pipécolique chez les plantes privées de magnésium, l'apparition de la citrulline consécutive à un manque de phosphore [71], l'enrichissement en glutamine sous l'effet de la déficience en phosphore [71] [181], en potassium [42] [71], en calcium [71], en cuivre et en bore [42] et l'augmentation notable de la teneur en asparagine, comme réponse aux carences en fer [42] [51], en phosphore [42], en manganèse [42], [174], en potassium [42] et en calcium [181].

Récemment on signale une accumulation de l'agmatine chez le houblon carencé en  $K^+$  et l'accumulation de l'agmatine et de putrescine chez douze autres espèces de plantes cultivées avec carences en  $K^+$  [167].

L'accumulation de la putrescine sous l'effet de la déficience en potassium avait été déjà signalée auparavant par RICHARDS et COLEMAN [162]. En nourrissant des feuilles d'orge avec de la putrescine ces auteurs ont pu constater des symptômes comparables à ceux de la déficience en potassium.

Ces perturbations ont donné l'occasion de rechercher de nouvelles voies métaboliques des acides aminés du cycle de l'ornithine chez les végétaux.

Il en ressort que les carences minérales très diverses peuvent produire des effets semblables en conduisant à l'accumulation d'un même composé azoté. D'autre part, du point de vue du métabolisme de l'azote, la réponse à la déficience en soufre qui nous préoccupe plus particulièrement, n'est pas identique chez toutes les espèces végétales.

Ainsi, la déficience en soufre chez le *Desmodium uncinatum* D C, le trèfle blanc et le lin est suivie selon COLEMAN [39] [38] d'une accumulation de l'arginine, accompagnée chez la dernière espèce d'une apparition de la citrulline et de l'ornithine; chez la tomate c'est en premier lieu la glutamine qui accuse un accroissement notable, dépassant celui de l'arginine, de la glycine, de la sérine et de l'asparagine; chez l'orge l'augmentation des teneurs en deux amides, en glycine et en sérine est à peu près du même ordre.

Coïc et coll. [36] qui a aussi étudié la carence en soufre chez l'orge, trouve l'accroissement de l'asparagine et de la glycine beaucoup plus spectaculaire que celui de la glutamine et de la sérine. Chez la menthe [42] la déficience en soufre a pour effet d'augmenter fortement la glutamine et l'arginine.

L'accumulation de l'asparagine [158] ou de l'arginine et de l'asparagine est le trait prépondérant du manque de soufre chez la luzerne [129]. Récemment on signale l'accumulation de l'agmatine et de la putrescine chez le tabac déficient en soufre [199], et de la citrulline chez les plantules de melon carencé en cet élément [186].

En règle générale, ce sont principalement les molécules riches en azote — les amides et l'arginine — qui s'accumulent.

Dans nos expériences avec l'arachide [85] [84] et le cotonnier nous avons également observé une accumulation de l'arginine et de l'asparagine, celle de l'arginine étant de beaucoup la plus importante. Ceci nous a incités à l'étude de l'évolution de l'arginine libre au cours du cycle vital de l'arachide et à rechercher les causes de l'altération du métabolisme azoté sous l'effet de la déficience en soufre.

Une des causes possibles de l'accumulation de l'arginine libre pouvant être le freinage de son incorporation dans les protéines, on a recherché si et dans quelle mesure la déficience en soufre se répercute sur la composition des protéines.

On admet généralement que la composition des protéines est relativement stable. On trouve cependant, dans la littérature des travaux signalant certaines modifications de la composition des protéines sous l'influence de la déficience en soufre.

Ainsi, ERGLE et EATON [66] observent les variations de la teneur en soufre des protéines chez le cotonnier cultivé sur des milieux de plus en plus pauvres en sulfate. Les protéines foliaires s'enrichissent en soufre tandis que sa teneur diminue dans les tiges.

MERTZ et MATSUMOTO [129], à la suite d'une étude sur la luzerne, concluent que l'accumulation de l'asparagine et de l'arginine dans la fraction soluble est compensée par une diminution de leur teneur dans les protéines.

THOMPSON et coll. [181] étudient l'effet des diverses carences minérales sur la composition en acides aminés de la fraction soluble et protéique chez le navet. Ils ne trouvent pas de différences sensibles entre les teneurs en méthionine des protéines de feuilles +S et — S.

FUJIWARA et TORII [73] ont étudié l'effet de la déficience en soufre sur les fractions cellulaires de six espèces végétales (betterave, tomate, blé, riz, soja, orge). Selon ces auteurs, la déficience provoque une réduction pondérale de la fraction des protéines cytoplasmiques sans pour autant affecter leurs teneurs en N, P et S.

CRANE et STEWARD [42], tout en soulignant la stabilité de la composition des protéines de la menthe soumise à des carences minérales diverses, notent cependant certaines variations possibles dans les proportions des acides aminés particuliers, les protéines pouvant s'enrichir en arginine en cas de carence en soufre.

Coïc et coll. [36] trouvent que sous l'influence de la déficience en soufre l'acide aspartique augmente et la cystine diminue dans les protéines de l'orge.

JORDAN [97], à la suite des expériences sur l'avoine cultivée sur un sol déficient en soufre avec et sans apport extérieur de cet élément, démontre que les proportions des acides aminés dans les protéines de plantes +S et —S restent sensiblement les mêmes.

ALLAWAY et THOMPSON [4] soutiennent l'opinion selon laquelle la composition des

protéines est considérée comme étant stable et peu dépendante des variations du régime nutritionnel de la plante.

En cas d'alimentation insuffisante en soufre les concentrations de tous les acides aminés protéiques, y compris les acides aminés soufrés, tendent à diminuer dans la même proportion.

WILLENBRINK [195] étudie les chloroplastes isolés des feuilles de tomate. Il constate que la déficience en soufre modifie peu le rapport S protéique/N protéique dans les chloroplastes tout en provoquant une baisse sensible de la teneur en S des protéines cytoplasmiques.

Dans la présente étude sur l'influence de la déficience en soufre sur la composition des protéines, nous avons pris en considération la teneur des protéines de l'arachide en arginine.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### A. ÉVOLUTION DE L'ARGININE LIBRE AU COURS DE LA CROISSANCE.

Les études de l'évolution de l'arginine au cours de la croissance ont été effectuées sur des plantes cultivées en pots, sur sable, en 1965 et en 1966. En 1966 l'écart entre les plantes +S et — S a été beaucoup plus spectaculaire qu'en 1965 : les +S ont été très vigoureuses et les — S beaucoup plus carencées.

#### a) 1965

Le tableau IX résume les résultats des dosages de l'arginine libre exprimés en mg par organes de 10 plantes.

TABLEAU IX  
ARGININE LIBRE EN MG PAR ORGANES DE 10 PLANTES (1965)

Stade du développement	ORGANES VÉGÉTAUX ANALYSÉS											
	Cotylédons	Folioles*	Tiges + pétioles**	Hypocotyles	Racines	Gynophores						
PLANTES SUR H <sub>2</sub> O												
2 feuilles non étalées.....	16,39	1,96	1,20	3,72	3,11							
2-3 feuilles.....	9,42	8,90	2,05	3,21	4,00							
PLANTES SUR SOLUTIONS NUTRITIVES +S ET —S												
	+S	—S	+S	—S	+S	—S	+S	—S	+S	—S	+S	—S
4-5 feuilles.....	3,90	2,76	7,95	14,50	1,69	3,52	1,49	1,52	2,86	4,08		
6-7 feuilles.....	2,48	1,49	7,31	51,78	1,68	23,02	0,52	1,43	2,08	15,28		
Début floraison...			13,41	131,58	4,41	60,17	1,22	9,50	6,94	61,90		
Début gynophores.....			16,60	141,66	9,67	114,53	1,59	11,73	9,23	120,72	2,19	2,29

\* Folioles des tiges principales.

\*\* Tiges principales.

Au départ, 10 graines non germées contiennent des quantités négligeables d'arginine libre : 1, 32 mg. Dès la germination, alors que les plantules vivent encore sur leurs propres réserves, l'arginine libre apparaît en quantité importante dans les cotylédons, provenant vraisemblablement de la protéolyse. Au cours du développement de jeunes plantules sur l'eau, les cotylédons perdent la moitié de leur arginine libre alors que les feuilles s'en enrichissent rapidement.

Au stade de 2-3 feuilles les plantes sont soumises aux régimes nutritifs +S et — S.

On remarque alors, chez les plantes +S pendant les deux stades suivants, que l'arginine libre diminue légèrement dans tous les organes analysés. Ensuite elle accuse un net accroissement qui se maintient jusqu'à la fin de l'expérience.

Chez les plantes — S, l'arginine libre disparaît plus rapidement dans les cotylédons et s'accumule considérablement dans tous les autres organes tout au long de la croissance. Cette accumulation commence dès le stade de 4-5 feuilles, bien que les symptômes visibles caractéristiques de la carence en soufre ne se manifestent pas encore. Les folioles sont les organes dans lesquels les quantités d'arginine libre sont les plus élevées. Le phénomène est particulièrement sensible à partir du stade de 6-7 feuilles, et alors se manifeste également dans les tiges et les racines.

Les mêmes résultats mais exprimés en pourcentage de l'azote soluble sont réunis dans le tableau X. Ce mode d'expression souligne l'importance du phénomène. L'arginine libre représente chez les plantes déficientes en soufre une proportion très élevée de l'azote soluble pouvant aller jusqu'à 54 % (folioles au stade de la floraison), contre 12 % pour les mêmes organes au même stade chez les plantes témoins.

TABLEAU X  
ARGININE LIBRE EN % DE L'AZOTE SOLUBLE (1965)

Stade	ORGANES VÉGÉTAUX ANALYSÉS									
	Cotylédons		Folioles*		Tiges pétioles**		Hypocotyles		Racines	
PLANTES SUR H <sub>2</sub> O										
2 feuilles.....	19,82		8,68		5,92		9,02		7,62	
2-3 feuilles.....	14,92		15,25		6,64		10,92		8,51	
PLANTES SUR SOLUTIONS NUTRITIVES +S ET —S										
	+S	—S	+S	—S	+S	—S	+S	—S	+S	—S
4-5 feuilles.....	13,11	13,35	15,57	17,68	5,07	7,11	9,30	9,29	6,04	7,47
6-7 feuilles.....	10,61	17,31	12,80	36,50	4,21	23,80	5,26	12,14	4,61	18,51
Floraison.....			12,51	54,25	6,00	32,30	7,53	33,57	5,06	27,68
Gynophores.....			12,44	53,05	5,93	29,48	7,87	35,22	4,42	33,70

\* Folioles des tiges principales.

\*\* Tiges principales.

#### b) 1966

Les résultats de 1965 nous ont incités à reprendre les dosages de l'arginine libre sur des nouvelles cultures afin de les compléter par des dosages de l'arginine protéique.

TABLEAU XI  
ARGININE LIBRE EN MG PAR ORGANES DE 10 PLANTES (1966)

Stade du développement	ORGANES VÉGÉTAUX ANALYSÉS									
	Coty-lédons	Folioles	Tiges princ. + pétioles	Hypocotyles	Tiges latérales + feuilles	Racines	Gynophores	Gousses		
PLANTES SUR H <sub>2</sub> O										
2-3 feuilles.....	12,07	5,58	2,88	5,65	—	5,34				
PLANTES SUR SOLUTIONS NUTRITIVES +S ET -S										
		+S	-S	+S	-S	+S	-S	+S	-S	+S
6-7 feuilles.....	—	4,38	46,69	1,94	25,76	0,30	2,61	1,57	10,36	1,35
Floraison.....	—	15,42	180,38	5,86	87,50	0,67	9,90	32,74	166,76	5,71
Formation des gousses.....		66,50	315,88	30,45	310,10	—	—	392,37	1390,31	69,74
Formation des graines.....		—	—	—	—	—	—	—	—	95,81
										108,86
										1526,13
										41,99
										1614,54
										6,90
										150,58

TABLEAU XII  
N ARGININE EN % DE N SOLUBLE (1966)

Stade du développement	ORGANES VÉGÉTAUX ANALYSÉS										
	Coty-lédons	Folioles	Tiges princ. + pétioles	Hypocotyles	Tiges lat. + feuilles	Racines	Fleurs	Gynophores	Gousses		
PLANTES SUR H <sub>2</sub> O											
2-3 feuilles.....	11,52	11,39	8,04	12,54	—	10,71					
PLANTES SUR SOLUTIONS NUTRITIVES +S ET -S											
	+S	-S	+S	-S	+S	-S	+S	-S	+S	-S	+S
6-7 feuilles.....	—	9,00	45,28	5,96	30,74	—	6,23	25,27	5,21	20,89	—
Floraison.....	—	11,72	67,73	6,56	35,84	—	8,61	39,04	6,76	40,12	—
Formation des gousses.....		12,59	77,09	7,83	42,32	—	9,13	51,74	11,50	52,69	—
Formation des graines.....		—	—	—	—	—	—	—	8,42	73,40	—
										17,95	—
										9,44	32,56
										17,88	34,51
										22,76	16,67
										20,91	32,30

Il était, en effet, intéressant de savoir si et dans quelle mesure l'accumulation considérable de l'arginine libre sous l'influence de la déficience en soufre est en rapport avec la richesse en arginine des protéines.

On a prolongé les cultures en 1966 jusqu'au stade de début de la formation des graines.

Le tableau XI résume les résultats des dosages de l'arginine libre calculées en mg par organes de 10 plantes.

On observe les mêmes tendances que dans l'expérience de l'année précédente. Toutefois les écarts entre les plantes +S et — S sont beaucoup plus importants qu'en 1965. Ceci s'explique par le fait que la déficience en soufre a été particulièrement prononcée en 1966 et les plantes +S nettement plus vigoureuses qu'en 1965.

Si l'on considère les chiffres correspondant aux stades « Formation des gousses » et « Formation des graines » — stades qui n'ont pas été analysés précédemment — on constate que l'arginine continue à augmenter dans les différents organes +S et — S. L'accumulation de l'arginine libre chez les — S atteint des chiffres élevés quoique la matière sèche des organes augmente relativement peu. Si au stade de floraison on arrive à avoir environ 10 fois plus d'arginine libre dans la plante — S que dans la plante +S, au stade de formation des gousses ce rapport n'est plus que d'environ 2 à 1.

On remarque qu'il y a mobilisation de l'arginine libre dans les organes de reproduction-gynophores et gousses. La quantité d'arginine libre y est la plus élevée de tous les organes +S (Fig. 16).

Ce sont les seuls organes où l'arginine libre dépasse chez les plantes +S les quantités présentes chez les plantes — S. Dans tous les autres organes on trouve à ce stade final encore bien plus d'arginine libre chez les plantes — S que dans les organes correspondant des plantes +S. Malgré cela cette arginine n'est transportée qu'en quantité relativement faible vers les organes reproducteurs, leur développement chez les plantes — S étant fortement réduit.

Soulignons que les teneurs (arginine en % de la matière sèche) de tous les organes, y compris les organes reproducteurs, sont beaucoup plus élevées chez les plantes — S que chez les plantes +S. On est tenté d'employer le terme d'intoxication des plantes — S par l'arginine.

Le tableau XII présente les résultats calculés en pourcentage de l'azote soluble. Ces données confirment les tendances notées pour l'année précédente et complètent en outre les résultats obtenus pour les organes reproducteurs. Les pourcentages de l'arginine libre par rapport à l'azote soluble sont très significativement plus élevés chez les gynophores — S que chez les gynophores +S. Quant aux gousses, au début de leur formation, c'est l'inverse qui se produit. Par la suite ce rapport chez les gousses — S double sa valeur alors que chez les gousses +S il diminue légèrement. L'arginine se trouve mobilisée pour la formation des graines.

## B. VARIATIONS DE L'ARGININE PROTÉIQUE.

Si l'on considère les résultats se rapportant à la quantité d'arginine protéique par organe (tableau XIII) on constate qu'au jeune stade la majeure partie se trouve dans les cotylédons. Les folioles en contiennent beaucoup moins que les cotylédons mais très

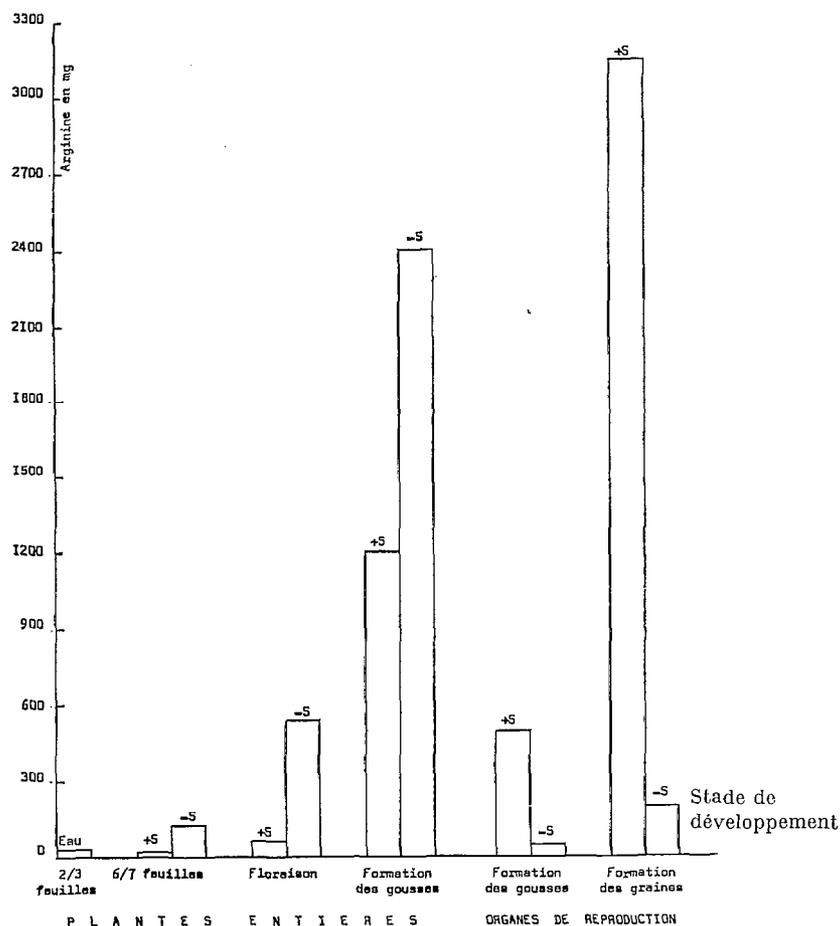


Fig. 16. — Arginine libre en mg par 10 plantes.

nettement plus que les autres organes des jeunes plantules. Ceci prouve que la grande quantité des protéines dites de réserve n'a pas encore été utilisée mais les folioles sont déjà le siège d'une protéogenèse intense.

Par la suite, à mesure que les plantes se développent, les réserves protéiques des cotylédons diminuent. Par contre, dans tous les organes aussi bien chez les plantes +S que chez les plantes — S, l'arginine protéique augmente au cours de la croissance et alors ce sont les folioles qui deviennent les plus riches en arginine protéique. A l'apparition des organes reproducteurs, gynophores et fruits, ceux-ci s'enrichissent très rapidement en arginine protéique. On observe une mise en réserve intense des protéines de la graine riche en arginine.

La quantité d'arginine protéique des organes des plantes — S est très inférieure à celle des organes correspondants des plantes +S. Ceci tient à cette raison essentielle : les poids et les teneurs en protéines des plantes — S sont très réduits par rapport aux plantes +S. Rappelons à ce propos la figure 9 (p. 20) représentant la matière sèche en g par organes de 10 plantes +S et — S à chacun des quatre stades de la végétation. Sur la figure 17 nous avons porté les résultats des dosages de l'azote insoluble exprimés en mg par organes de 10 plantes +S et — S aux mêmes stades. Au moment de la formation

TABLEAU XIII  
 ARGININE PROTÉIQUE EN MG PAR ORGANES DE 10 PLANTES (1966)

Stade du développement	ORGANES VÉGÉTAUX ANALYSÉS																	
	Coty- lédons		Folioles		Tiges princ. +pétioles		Hypo- cotyles		Tiges lat. +feuilles		Racines		Gyno- phores		Gousses		Plantes entières	
PLANTES SUR H <sub>2</sub> O																		
2-3 feuilles.....	68,0		14,0		5,1		4,7		—		6,8						99	
PLANTES SUR SOLUTIONS NUTRITIVES +S ET —S																		
	+S	—S	+S	—S	+S	—S	+S	—S	+S	—S	+S	—S	+S	—S	+S	—S	+S	—S
6-7 feuilles (13 jours +S et —S).....	15,7	19,5	70,4	39,0	17,6	15,5	2,1	1,5	20,1	10,5	16,8	13,8					143	100
Floraison (28 jours +S et —S).	—	—	234,9	73,1	63,0	32,3	4,0	2,5	449,1	71,1	71,2	26,3					822	205
Formation des gousses (76 j. +S et —S).....			917,0	93,6	341,4	84,7	—	—	7666,2	338,2	588,5	69,0	401,9	10,4	569,3	8,5	10484	604
Formation des graines (122 j. +S et —S).....			—	—	—	—	—	—	—	—	984	112	3385	21	14314	161	—	—

TABLEAU XIV  
 ARGININE PROTÉIQUE EN % DE M.S.

Stade du développement	ORGANES VÉGÉTAUX ANALYSÉS																	
	Cotylédons		Folioles		Tiges princ. +pétioles		Hypocotyles		Tiges lat. +feuilles		Racines		Fleurs		Gynophores		Gousses	
PLANTES SUR H <sub>2</sub> O																		
2-3 feuilles.....	1,99		2,38		1,36		0,85		—		1,26							
PLANTES SUR SOLUTIONS NUTRITIVES +S ET —S																		
	+S	—S	+S	—S	+S	—S	+S	—S	+S	—S	+S	—S	+S	—S	+S	—S	+S	—S
6-7 feuilles.....	1,55	1,73	1,95	1,50	0,86	1,01	0,54	0,44	1,50	1,33	0,96	0,77						
Floraison.....	—	—	1,63	1,28	0,70	1,05	0,55	0,63	1,32	1,13	0,87	0,67	0,69	0,81				
Formation des gousses.....			1,45	1,24	0,63	1,12	—	—	1,27	0,99	0,62	0,64	0,69	0,50	0,97	0,87	1,04	1,15
Formation des graines.....			—	—	—	—	—	—	—	—	0,52	0,76	—	—	0,81	0,96	1,92	1,59

des gousses, la quantité d'azote protéique est dix fois plus élevée dans les trois organes +S et dix-huit fois plus élevée pour la plante entière en comparaison avec les plantes — S.

Si l'on considère les teneurs en arginine protéique en pourcentage de la matière sèche (tableau XIV) on constate que même au stade de 2-3 feuilles, alors que les cotylédons sont encore gorgés de protéines, les jeunes folioles sont déjà des organes dans lesquels la teneur en arginine protéique est la plus élevée de tous. Par la suite ces teneurs diminuent, en général, au cours de la croissance, aussi bien chez les organes des plantes +S que chez ceux des plantes — S. Les gousses font exception à cette règle.

Les teneurs en arginine des organes de transport sont particulièrement remarquables. En effet, si dans les autres organes l'arginine protéique est plus abondante chez les +S, dans les organes de transport c'est l'inverse qui se produit.

Ce phénomène peut traduire la différence existant dans la composition protéique des organes de transport des plantes +S et — S, chez lesquels l'azote protéique (en pourcentage de la matière sèche) ne varie pas beaucoup en fonction de l'alimentation en soufre (voir Fig. 10 b, c). Le tableau XV traduit d'ailleurs ces différences de la composition des protéines. On y voit que les rapports N — arginine protéique/N — protéique sont souvent nettement plus élevés chez les organes des plantes — S que chez ceux des plantes +S.

Pour les plantes +S ces rapports ne varient pratiquement pas au cours de la croissance, les tiges au stade de la formation des gousses exceptées. Il n'en est pas de même pour les plantes — S où ces rapports vont en augmentant dans tous les organes, devenant nettement supérieurs à ceux des plantes +S.

En résumé, la déficience en soufre n'a pas freiné l'incorporation de l'arginine dans les protéines. Bien plus, ainsi que le démontre le tableau XV, la déficience en soufre a entraîné des modifications de la composition des protéines lesquelles deviennent au contraire, plus riches en arginine ; les racines sont les moins affectées.

YEMM [197] a comparé les acides aminés présents dans les préparations suivantes de protéines de l'orge : 1) protéines totales des feuilles, contenant les fractions cytoplasmiques et chloroplastiques ; 2) protéines cytoplasmiques des feuilles ; 3) protéines totales de jeunes plantules. Un haut degré d'uniformité a été trouvé dans la composition des acides aminés de toutes les trois préparations, la seule différence notée étant la proportion élevée de la lysine dans les préparations cytoplasmiques et les plantules.

Reste à savoir quel est le mécanisme d'une protéosynthèse aboutissant aux modifications constatées de protéines et quelles sont les conséquences de ces modifications pour leurs propriétés. Est-ce que l'arginine s'incorpore en plus grande proportion dans les protéines à la place d'autres acides aminés, par exemple des acides aminés soufrés ? La déficience en soufre influence-t-elle en ce sens le messenger ou l'activité des systèmes ribosomiques catalysant l'incorporation des acides aminés ? On sait que l'activité des

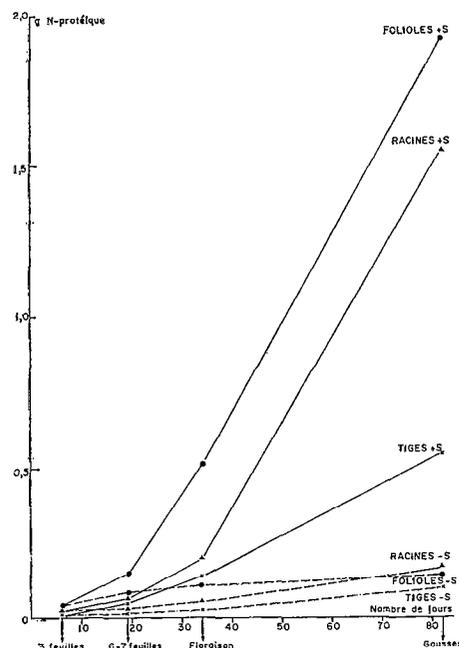


Fig. 17. — Azote protéique par organes de 10 plantes.

TABLEAU XV  
TENEURS DES PROTÉINES EN ARGININE : N-ARGININE EN G PAR 100 G DE N-PROTÉIQUE

Stade du développement	ORGANES VÉGÉTAUX ANALYSÉS							
	Folioles des tiges principales		Tiges principales + pétioles		Tiges latérales + feuilles		Racines	
PLANTES SUR H <sub>2</sub> O								
2-3 feuilles.....	15,62		14,54		—		13,82	
PLANTES SUR SOLUTIONS NUTRITIVES +S ET —S								
	+S	—S	+S	—S	+S	—S	+S	—S
6-7 feuilles.....	14,83	15,32	14,48	18,51	13,68	16,26	11,49	10,98
Floraison.....	14,93	20,30	14,00	22,93	13,77	16,73	11,57	12,56
Formation des gousses.....	15,64	21,28	20,40	29,03	19,81	19,39	12,07	13,49

systèmes ribosomiques passe d'un taux très faible dans la graine sèche à un taux maximum dans la graine imbibée [124].

Notons à ce propos les recherches très intéressantes de LE GOFF et coll. [120]. Ces auteurs travaillant sur la fixation *in vitro* des acides aminés par des acides ribonucléiques de *Datura stramonium L.*, constatent l'existence des différences significatives entre certains types d'ARN des tissus sains et tumoraux. Les résultats montrent que certaines fractions d'ARN des tissus tumoraux possèdent une capacité accrue pour la fixation de l'arginine comparativement à celle des tissus normaux.

Pour d'autres acides aminés essayés, on n'observe pratiquement pas de différence significative en ce qui concerne le taux d'incorporation.

Ceci prouve qu'au moins une fraction d'ARN particulière est présente dans les tissus tumoraux.

La synthèse des protéines peut s'effectuer en de nombreux points du cytoplasme, dans les différentes particules cellulaires. Au niveau du tissu, certaines cellules ou groupes de cellules peuvent être beaucoup plus actives dans la synthèse ou la dégradation des protéines que d'autres.

De plus, les protéines peuvent avoir une composition différente selon qu'elles sont fabriquées par telle ou telle autre particule cellulaire, par telle ou telle autre cellule ou groupe cellulaire.

A son tour, la déficience en soufre peut se répercuter davantage ou autrement sur tel ou tel groupe de cellules ou sur telle ou telle partie du cytoplasme.

A ce propos, il est intéressant de souligner que les dosages du phosphore insoluble nous ont constamment donné des chiffres plus élevés pour les organes — S en comparaison avec les organes +S. Le tableau XVI résume ces résultats.

Or, on sait que les acides nucléiques interviennent à plusieurs stades de la protéosynthèse.

D'autre part, il a été démontré qu'il existe, pour une espèce donnée et pour une protéine donnée, une constante de composition et que la séquence des acides aminés

pour chacune d'elles est constante. Aussi a-t-on été conduit à penser que la synthèse d'une protéine était commandée par le matériel génétique des cellules [43] [44] [45] [144] [188].

Quels sont donc les mécanismes régissant la modification de la composition protéique chez les plantes — S ?

Voilà une question à laquelle il est impossible de répondre pour l'instant autrement que par des hypothèses et à l'élucidation de laquelle nous aimerions pouvoir apporter dans l'avenir notre contribution.

TABLEAU XVI  
PHOSPHORE INSOLUBLE EN % DE M.S.

Stade du développement	Folioles		Tiges + pétioles		Racines	
	+S	—S	+S	—S	+S	—S
7-8 feuilles.....	0,079	0,087	0,040	0,041	0,032	0,042
Floraison.....	0,074	0,106	0,038	0,057	0,039	0,046
Formation des gynophores.....	0,051	0,110	0,044	0,061	0,089	0,095
Début de formation des gousses..	0,055	0,119	0,038	0,089	0,073	0,097

### C. VARIATION DE L'ARGININE AU COURS DE L'INDUCTION ET DE LA CORRECTION DE LA CARENCE EN SOUFRE.

Les résultats obtenus dans les cas extrêmes des cultures normalement approvisionnées en soufre ou sans apport de soufre nous ont conduits à étudier les variations de l'arginine, ainsi que le devenir de l'arginine —  $^{14}\text{C}$ -5 lors de l'induction et de la correction de la déficience en cet élément.

L'étude de l'arginine au cours de l'induction et de la correction de la carence ainsi que celle relative au devenir de l'arginine —  $^{14}\text{C}$ -5 par absorption radiculaire, ont été effectuées sur des plantes cultivées en aquiculture. Les autres conditions culturales ont été les mêmes que dans les autres expériences.

60 plantules au stade de 2 feuilles ont été repiquées dans 6 bacs en matière plastique à raison de 10 par bac. Trois bac contenaient la solution +S et trois autres la solution — S.

Au stade de 4 feuilles (5<sup>me</sup> en développement), on a introduit dans les bacs des solutions nutritives contenant l'arginine marquée.

Après une semaine de végétation et au stade de 6-7 feuilles, on a inversé les milieux nutritifs pour une partie des plantes +S et — S : les +S ont été transférées sur la solution nutritive — S et inversement, les — S sur la solution +S. Les plantes d'un bac +S et celles d'un bac — S sont restées dans les milieux primitifs comme témoins.

Au bout d'une semaine, au stade de 7-8 feuilles, 9<sup>e</sup> en développement, on a effectué la récolte.

On a observé une anomalie : presque systématiquement les feuilles du sommet avaient 6 folioles, quelquefois 5.

Les plantes récoltées ont été divisées en 3 parties :

— folioles des étages supérieurs à partir de la 5<sup>e</sup> feuille, c'est-à-dire celles développées après le contact avec  $^{14}\text{C}$  ;

— racines ;  
 — autres organes de la plante pris ensemble, c'est-à-dire feuilles restantes, tiges, hypocotyles, cotylédons.

Le tableau XVII illustre les différences pondérales enregistrées pour les 4 variantes au moment de la récolte. Ce moment correspond au stade de 7-8 feuilles, 27 jours après le semis, 20 jours après le repiquage sur solutions nutritives et 8 jours après l'induction et la correction de la déficience.

TABLEAU XVII  
 MATIÈRE SÈCHE DE 10 PLANTES (EN G)

Organes	+S	—S	+S→—S	—S→+S
Folioles des étages supérieurs.	7,52	2,95	6,48	3,63
Racines.....	7,07	6,50	6,43	5,69
Autres organes.....	24,87	12,30	22,88	13,90
TOTAL.....	39,46	21,75	35,79	23,22

On voit que l'induction de la déficience s'est traduite par une diminution de la matière sèche des plantes +S et inversement, la correction de la déficience a fait monter la matière sèche des plantes — S.

Les résultats des dosages de l'arginine libre et de l'arginine protéique effectués sur ces récoltes sont réunis dans le tableau XVIII.

#### a) ARGININE LIBRE

Sous l'influence de la déficience en soufre, on observe, comme on a déjà pu le constater auparavant, une accumulation très spectaculaire de l'arginine libre. Comparativement au témoin — S, la correction de la déficience se traduit par une baisse sensible de l'arginine libre dans tous les organes. Cette baisse est beaucoup plus importante pour les racines que pour les folioles. Inversement, l'induction de la déficience fait augmenter la teneur en arginine par rapport à celle des plantes +S. Le taux d'arginine libre après correction est toutefois toujours plus élevé qu'après induction de la déficience.

Ce qui plus est, les deux valeurs médianes obtenues après induction ou correction de la déficience ne se situent pas à égale distance des deux extrêmes.

La désaccumulation de l'arginine lors du passage — S→+S est beaucoup plus importante que l'accumulation lors du passage inverse +S→— S. Ce fait est illustré dans la figure 18.

Autrement dit, la correction s'avère beaucoup plus rapide que l'induction de la déficience.

#### b) ARGININE PROTÉIQUE

La réduction de la teneur en arginine protéique sous l'effet de la déficience en soufre, déjà constatée, se confirme ici dans toutes les parties analysées de la plante. L'induction de la déficience reste pratiquement sans influence sur l'arginine protéique, alors que la

TABLEAU XVIII  
 ARGININE EN % DE M.S. ET EN MG POUR 10 PLANTES

Organes	+S				-S				+S → -S				-S → +S			
	Soluble		Protéique		Soluble		Protéique		Soluble		Protéique		Soluble		Protéique	
	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg
Folioles supérieures.....	0,23	17,3	1,92	144,4	3,40	100,3	0,94	27,7	0,81	52,5	1,78	115,3	1,24	45,0	1,85	67,2
Racines.....	0,17	12,0	0,95	67,2	2,20	143,0	0,66	42,9	0,43	27,6	0,80	51,4	0,56	31,9	0,83	47,2
Autres organes.....	0,14	34,8	1,48	368,1	2,31	284,1	0,63	77,5	0,36	82,4	1,34	306,6	0,55	76,5	1,39	193,2
Total.....		64,1		579,7		527,4		148,1		162,5		473,3		153,4		307,6
Sommes.....	643,8				675,5				635,8				461,0			

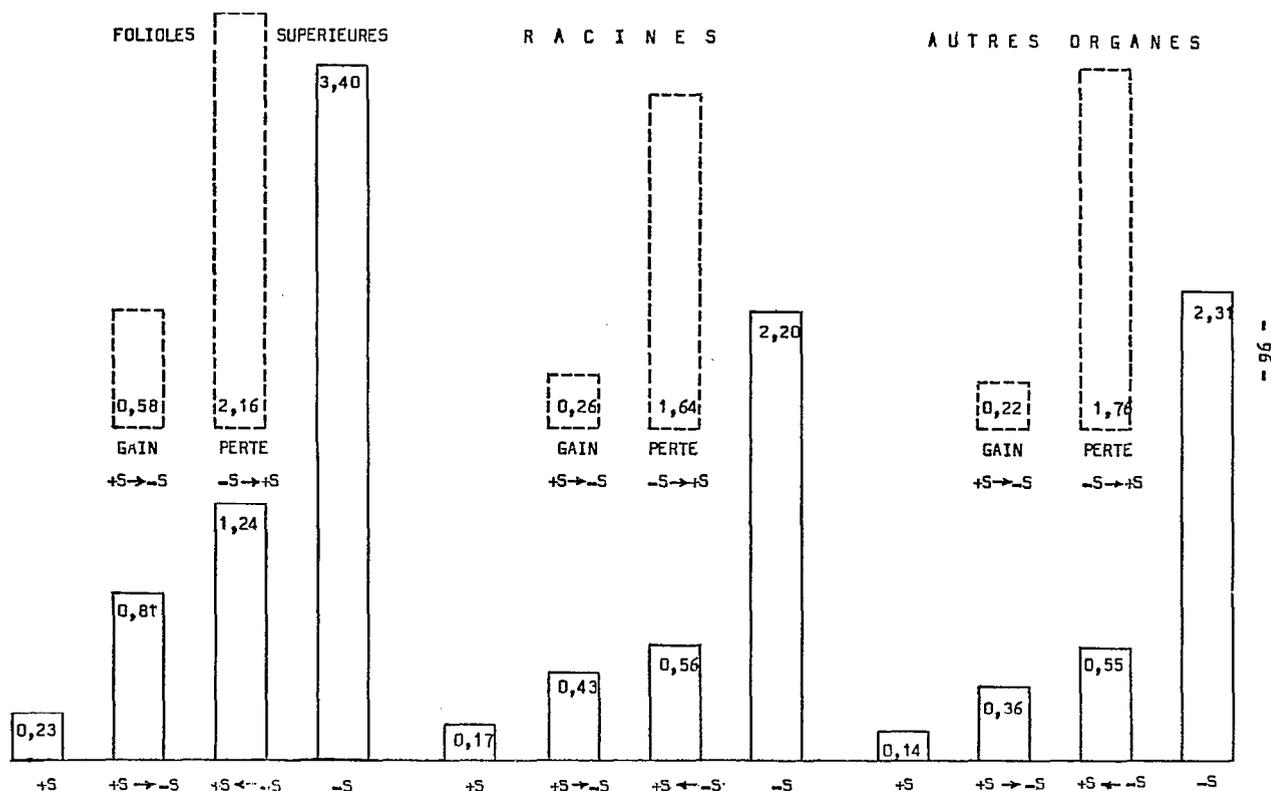


Fig. 18. — Arginine libre en % m.s. (1966).

correction de la déficience provoque une augmentation beaucoup plus nette de sa teneur par rapport à celle des plantes — S.

On pourrait en conclure que dès que l'on met du soufre à la disposition de la plante, celle-ci se met à fabriquer de la protéine dans laquelle une partie de l'arginine libre se trouve incorporée.

Il convient de souligner que la somme des deux formes d'arginine — libre et protéique — se trouve presque au même niveau dans les plantes +S et — S. L'arginine protéique faisant défaut chez les dernières se trouve compensée sous forme d'arginine libre. Il y a visiblement équilibre entre les deux.

Quant aux changements de régime nutritionnel, on voit que la correction de la déficience a fait tomber de façon très appréciable la somme de deux fractions d'arginine. C'est la fraction libre qui est responsable de cet abaissement. La protéolyse est plus lente à se produire que la protéosynthèse.

ERGLE [65] travaillant sur l'influence des apports de petites doses d'azote et de soufre sur leur accumulation chez le cotonnier, arrive à cette conclusion que si la protéolyse est d'une évidence frappante dans le cas d'une déficience en azote, elle ne se manifeste pas dans le cas de la déficience en soufre.

A ce propos on doit remarquer que les besoins en soufre du cotonnier sont plus importants que ceux de l'arachide.

## e) L'ARGININE EN POURCENTAGE DE L'AZOTE

*α. Fraction soluble.*

L'azote de l'arginine libre (tableau XIX) représente un très haut pourcentage de l'azote soluble dans le cas de la déficience en soufre.

TABLEAU XIX  
AZOTE DE L'ARGININE EN % DE L'AZOTE SOLUBLE ET PROTÉIQUE

ORGANES	FRACTION	+S	—S	+S→—S	—S→+S
Folioles des étages supérieurs	Soluble	10,42	56,95	28,94	39,10
	Protéique	16,08	20,56	17,09	16,85
Racines	Soluble	13,02	35,03	16,27	26,10
	Protéique	14,69	13,27	13,06	14,51
Autres organes	Soluble	6,53	36,78	11,21	20,81
	Protéique	16,76	14,27	17,03	16,74

L'induction et la correction de la déficience situent les rapports de l'azote de l'arginine sur l'azote soluble entre les deux extrêmes qui sont les plantes +S et —S. Dans tous les cas sauf pour les racines +S, ces rapports sont les plus élevés pour les folioles en comparaison avec les autres parties de la plante.

*β. Fraction insoluble.*

Le rapport de l'arginine protéique sur l'azote protéique constitue le critère que nous avons choisi ici pour apprécier et comparer les différences dans la composition des protéines selon organes et traitements :

1) Pour les plantes +S au stade de préfloraison les protéines des trois parties analysées (folioles, racines, autres organes) ont sensiblement la même teneur en arginine.

2) Pour les plantes —S au même stade, les protéines des folioles sont au contraire plus riches en arginine que celles des racines.

3) Il en résulte que les protéines des folioles —S sont plus riches en arginine que celles des folioles +S. La différence pour les racines est minime.

Ce qui vient d'être constaté au point 3 confirme nos résultats exposés plus haut à l'occasion d'autres expériences.

4) La correction de la déficience s'opère plus rapidement que l'induction de la déficience.

## VI — DEVENIR DE L'ARGININE -<sup>14</sup>C-5

### INTRODUCTION

Nos études précédemment exposées concernant l'influence de la déficience en soufre sur le métabolisme de l'arginine, nous ont conduits à envisager le problème du devenir de cet acide aminé à l'aide de l'arginine radio-active.

Depuis que KREBS et HENSELEIT ont découvert en 1932 [112] le fameux cycle de l'urée dans le foie de mammifères, les chercheurs se sont efforcés de démontrer l'existence de ce cycle dans le règne végétal. Bien que certains chercheurs en admettent aujourd'hui l'existence chez les végétaux, les résultats des recherches que l'on trouve dans la littérature ne sont que fragmentaires. De plus, certains auteurs signalent d'autres voies métaboliques que le cycle de l'ornithine.

C'est SRB et HOROWITZ en 1944 [171] qui, les premiers ont émis l'hypothèse de l'existence du cycle de l'ornithine chez les végétaux.

COLEMAN (1953) [37] démontre l'accumulation de l'arginine chez l'orge nourrie avec de la citrulline.

THOMAS et KRAUS (1955) [180] en ajoutant au milieu de culture de l'urée ou de l'ornithine ont obtenu une augmentation de l'arginine dans le *Scenedesmus*.

KASTING et DELWICHE (1955) [98] rapportent qu'en utilisant l'ornithine 2-<sup>14</sup>C et l'arginine <sup>14</sup>C il leur a été possible de démontrer que le cycle de KREBS-HENSELEIT fonctionne dans les tissus de *Citrullus vulgaris*, plante particulièrement riche en ornithine, citrulline et arginine. Deux ans plus tard [99] ils sont moins affirmatifs en ce qui concerne le fonctionnement du cycle de l'ornithine. Il est, en effet, évident que la seule présence de ces trois composés n'explique pas leur fonction dans le métabolisme de la plante, ni n'autorise à préjuger des voies de leur formation.

COLEMAN et HEGARTY (1957) [40] constatent la rapide transformation de l'ornithine 2-<sup>14</sup>C chez l'orge et le trèfle blanc. On retrouve de la radioactivité dans la citrulline, l'arginine et la proline et aussi dans l'acide glutamique, l'acide  $\gamma$ -amino-butyrique et la glutamine.

Ils suggèrent que le matériel étudié contient certains enzymes responsables de la conversion des acides aminés du cycle de KREBS-HENSELEIT, encore que ceux-ci n'aient pas été isolés.

Toutefois, l'impossibilité de mettre en évidence la présence de l'arginase chez de nombreuses plantes supérieures amène COLEMAN (1958) [39] à penser que la formation de l'urée à partir de l'arginine n'est pas un processus métabolique important.

KASTING et DELWICHE (1958) [100] font incuber des plantules de pastèque ou leurs homogénats avec de l'ornithine  $^{14}\text{C}$  et de l'arginine  $^{14}\text{C}$ . Ils constatent une rapide inter-conversion des trois acides aminés du cycle de l'ornithine. A la suite de l'infiltration de l'ornithine  $^{14}\text{C}$ , une forte radioactivité a été retrouvée dans la citrulline et, à un degré beaucoup moindre, dans l'arginine et la proline. L'utilisation de l'arginine  $^{14}\text{C}$  a donné lieu à une forte radioactivité de l'ornithine et de la citrulline et à une activité plus faible de l'acide glutamique et la proline.

KLECZKOWSKI et REIFFER (1959) [105] procèdent à l'incubation des organes excisés de plantules de pois et de blé avec de l'ornithine préparée à partir de l'arginine. Constatant que l'ornithine se transforme en citrulline, arginine et urée, ils concluent que les plantules contiennent tous les enzymes du cycle de l'ornithine.

DURANTON (1959) [58] dans les cultures *in vitro* de tissus de topinambour constate que l'arginine donne naissance à de la proline, de l'hydroxyproline et de l'acide glutamique.

BARNES et NAYLOR (1961) [10] observent la transformation de l'ornithine chez de jeunes conifères en germination, en citrulline et en arginine libres. Ils n'y trouvent cependant pas d'urée. Dans les hydrolysats l'arginine, la proline et l'acide glutamique deviennent radioactifs. Les auteurs concluent qu'il n'y a pas de processus cyclique.

Par la suite (1962), BARNES [9] en travaillant sur des aiguilles de *Pinus taeda L.* de 32 ans démontre que parmi les acides aminés formés à partir de l'ornithine  $^{14}\text{C}$ , le plus important est l'acide glutamique. Moins marquées sont la glutamine, la citrulline et la proline.

D'après TOUZÉ (1964) [186] l'absorption de l'ornithine  $^{14}\text{C}$  par le melon conduit très rapidement à la radioactivité de la citrulline, de l'acide glutamique et de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique, puis ce sont la proline et les amides qui deviennent radioactives. L'arginine n'a jamais été décelée sur les autoradiogrammes.

GUITTON (1964) [82] démontre, chez de jeunes plantules de *Pinus pinea L.* la rapide transformation de l'ornithine  $^{14}\text{C}$  en acide glutamique, citrulline et arginine. Ce dernier acide aminé étant hydrolysé par une arginase active.

Parmi les voies métaboliques possibles autres que le cycle de l'ornithine on signale :

— la désamination oxydative de l'arginine aboutissant à l'acide  $\gamma$ -guanidobutyrique, réaction rencontrée dans les graines de ricin [139] et dans divers fruits [95] ; MÉNAGÉ et MOREL (1962) [127] (1964) [128] par des expériences réalisées avec de l'arginine  $^{14}\text{C}$  montrent que des guanidines qui n'existent pas dans les tissus normaux cultivés *in vitro* apparaissent dans les tissus de tumeur ; les recherches de DURZAN (1968) [59] avec l'arginine uniformément marquée appliquée à *Picea glauca* ont prouvé que le carbone de cet acide aminé se retrouve rapidement dans la proline en passant par l'ornithine. Et quoique une quantité trace ait été incorporée dans la citrulline, bien plus de  $^{14}\text{C}$  se retrouve dans l'acide  $\gamma$ -guanidinobutyrique. Ces constatations amènent l'auteur à la conclusion que cette dernière voie, ainsi que d'autres non encore identifiées, compte bien plus dans le métabolisme de l'arginine que le seul cycle de l'ornithine ;

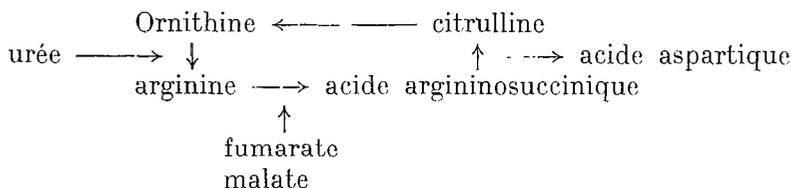
— la transamination du groupement aminé de l'arginine sur les acides  $\alpha$ -cétoglutarique, pyruvique, fumarique et butyrique [49] [155] [104] [75] ;

— la décarboxylation de l'arginine pour donner de l'agmatine [64] [167] [168] [139] [199], celle de l'ornithine donnant de la putrescine ou de l'acide glutamique et de la proline [40] [74].

On signale également la transamidation du groupement amidine de l'arginine chez *Galega officinalis* [160].

De plus, on doit noter que la citrulline  $^{-14}\text{C}$  a été signalée comme étant un précurseur des pyrimidines et surtout de la cytosine [52], et que l'arginine, l'ornithine et la putrescine sont des précurseurs lors de la synthèse des alcaloïdes [46] [96] [119] [199]. L'ornithine  $^{-14}\text{C}$  et l'arginine entrent dans la composition de l'anneau pyrrolidinique de la nicotine [53].

WALKER (1952) [190] et HATTORI (1958) [86] ont émis l'hypothèse selon laquelle l'urée peut entrer dans le métabolisme en sens inverse du cycle de l'ornithine :



Ces auteurs ont travaillé sur *Chlorella*, espèce dans laquelle on ne trouve ni arginase ni uréase. L'arginine et l'urée peuvent toutes les deux servir de source d'azote. Lorsqu'on ajoute au milieu du fumarate on retrouve rapidement de l'acide argininosuccinique.

De même BOULTER et BARBER (1963) [14] travaillant à l'aide de l'arginine marquée sur le métabolisme des acides aminés dans les graines de *Vicia faba* en germination indiquent que l'arginine peut être dégradée en sens inverse du cycle de l'ornithine.

LINKO et coll. [121] traitent des algues bleue-vertes — *Nostoc muscorum* — avec du  $^{14}\text{CO}_2$  à la lumière. Près de 20 % du carbone fixé se retrouve dans la citrulline. Chez les algues vertes seule une quantité-trace se fixe dans ce composé. Dans le *Nostoc* on ne trouve ni urée ni arginine libres et il apparaît que la voie métabolique de la citrulline est différente de celle du cycle de l'ornithine.

Il est généralement admis que certains acides aminés ne se forment que par une seule suite de réactions alors qu'en fait il peuvent être formés par plusieurs voies différentes, peut-être à divers moments ou endroits [175].

À la lumière de cette courte revue bibliographique, il apparaît que le problème du fonctionnement du cycle de KREBS-HENSELEIT chez les végétaux supérieurs et par là-même de la fonction et des voies métaboliques de l'arginine, ne peut pas être considéré comme étant définitivement tranché.

Il nous a paru important, dans le cas de l'arachide, de vérifier si la dégradation de l'arginine s'effectuait selon la réaction de KREBS-HENSELEIT, laquelle serait bloquée chez l'arachide —S à l'étape de l'arginine.

Dans les pages qui vont suivre nous étudierons donc comparativement le devenir de l'arginine  $^{-14}\text{C}$  — 5 chez l'arachide +S et —S.

Nous consacrons plus loin un chapitre à la recherche de l'arginase.

## RÉSULTATS

### A. ABSORPTION RADICULAIRE.

#### a) RADIOCOMPTAGE

Notons d'abord que dans cette expérience réalisée en 1966, chaque bac de 10 litres a reçu 0,0833 mCi d'arginine  $^{-14}\text{C}$ -5 (voir schéma de l'expérience page 61).

Le tableau XX illustre la répartition de  $^{14}\text{C}$  entre les fractions soluble et insoluble

TABLEAU XX  
RADIOACTIVITÉ EN DPM PAR MG DE POUDRE SÈCHE

ORGANES	FRACTIONS	+S	—S	+S→—S	—S→+S
Folioles des étages supérieurs	Soluble	18,6	36,8	23,3	37,8
	Insoluble	76,8	16,6	68,2	58,5
Racines	Soluble	80,4	322,9	108,7	215,0
	Insoluble	392,1	240,9	392,6	366,7
Autres organes	Soluble	14,6	52,6	18,6	34,1
	Insoluble	53,7	14,6	50,5	49,7
RADIOACTIVITÉ PAR ORGANES D'UNE PLANTE (EN DPM × 10 <sup>-3</sup> )					
Folioles des étages supérieurs	Soluble	14,0	10,9	15,0	12,8
	Insoluble	57,8	4,9	44,2	21,2
Racines	Soluble	56,8	209,9	69,9	122,3
	Insoluble	277,2	156,6	252,4	208,7
Autres organes	Soluble	36,3	64,7	42,6	47,4
	Insoluble	133,6	18,0	115,5	69,1
TOTAUX	Soluble	107,1	285,5	127,5	192,5
	Insoluble	468,6	179,5	412,1	299,0
SOMMES DE DEUX FRACTIONS		575,7	465,0	539,6	481,5

selon l'organe et le traitement nutritionnel. Dans toutes les variantes, les racines ont retenu plus d'isotope radioactif que les folioles ou les autres organes de la plante.

La répartition de la radioactivité entre les deux fractions (soluble et insoluble) varie selon l'organe et le traitement. Dans les organes des plantes +S la plus grande partie de l'isotope radioactif se trouve être incorporée dans les protéines. Les pourcentages de la radioactivité des protéines par rapport à la radioactivité totale sont, à peu de chose près, les mêmes pour les folioles et les racines. Chez les plantes —S, au contraire, les fractions solubles sont plus radioactives que les fractions protéiques. La répartition entre les fractions solubles et insolubles est très différente pour les folioles et les racines.

Une très grande partie de l'isotope radioactif est restée dans les racines —S à l'état soluble et non incorporée dans les protéines.

En comparant la radioactivité totale des plantes +S avec celle des —S, on constate que la fraction protéique des premières est 2,6 fois plus radioactive que celle des secondes alors que pour la fraction soluble la proportion est exactement inversée.

L'induction et la correction de la déficience modifient la répartition de la radioactivité entre les deux fractions : soluble et insoluble. L'importance de ces modifications varie selon les organes. D'une façon générale, l'induction de la déficience entraîne une diminution de la radioactivité des fractions protéiques ; au contraire, la correction de la déficience provoque une augmentation de cette radioactivité. Ce dernier phénomène est beaucoup plus net que le premier. En considérant la plante entière on constate qu'en cas d'induction de la déficience, la radioactivité de la fraction soluble augmente aux dépens de celle de la fraction protéique. On observe une tendance inverse dans le cas de la correction de la déficience en soufre. Encore une fois cette dernière tendance est plus nette que la précédente. Autrement dit, la protéosynthèse est très rapide alors que la protéolyse est au contraire un processus très lent.

### b) AUTORADIOCHROMATOGRAPHIE

Il y a lieu de remarquer au départ que l'arginine marquée fournie par le C.E.N. de SACLAY que nous avons utilisée dans cette expérience donne plusieurs taches au niveau horizontal de l'arginine lorsqu'on la passe à la chromatographie bidimensionnelle. Ces taches radioactives parasites peuvent provenir des impuretés inhérentes aux opérations de purification de l'arginine — dégradation spontanée par désamination oxydative et décarboxylation oxydative. Dans l'interprétation des résultats il faut donc tenir compte de ces artefacts.

#### *α. Fraction soluble.*

La majeure partie de la radioactivité se retrouve au niveau de l'arginine. Les films les plus impressionnés sont ceux correspondant aux racines. Sur les radiochromatogrammes des organes —S (folioles exceptées) on distingue en plus de l'arginine, fortement marquée, la radioactivité au niveau de l'asparagine (Fig. 19). Sur ceux des organes +S seule une tache faiblement marquée de l'arginine apparaît. En cas de correction de la déficience la tache de l'asparagine disparaît chez les racines, alors qu'elle apparaît sous forme de trace radioactive après l'induction de la déficience. Sur les films correspondant aux autres organes de la plante, il n'y a pas trace d'asparagine radioactive ni après induction ni après correction de la déficience.

Dans la fraction soluble des folioles — S on ne trouve de radioactivité qu'au niveau de l'arginine. Chez les +S l'arginine apparaît mais est très faiblement marquée.

L'induction de la déficience n'a pas modifié l'image dans les folioles alors que la correction de la déficience a fait disparaître la tache de l'arginine.

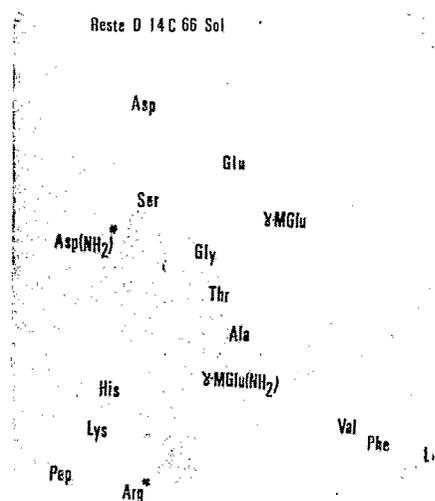


Fig. 19. — Autoradiogramme de la fraction soluble.  
Reste = Autres organes  
D = Déficiences en soufre

### $\beta$ . Fraction insoluble.

Les radiochromatogrammes correspondant aux hydrolysats des racines +S et —S comportent les taches les plus marquées.

On y révèle, en plus de l'arginine, la plus radioactive, une série de taches très faiblement marquées correspondant à l'acide glutamique, l'acide aspartique, l'hydroxyproline, la proline, la thréonine, la leucine-phénylalanine.

La prolongation du temps d'exposition au radiofilm jusqu'à 165 jours renforce ces taches et fait apparaître, en plus, de la radioactivité au niveau de la sérine-glycine (Fig. 20).

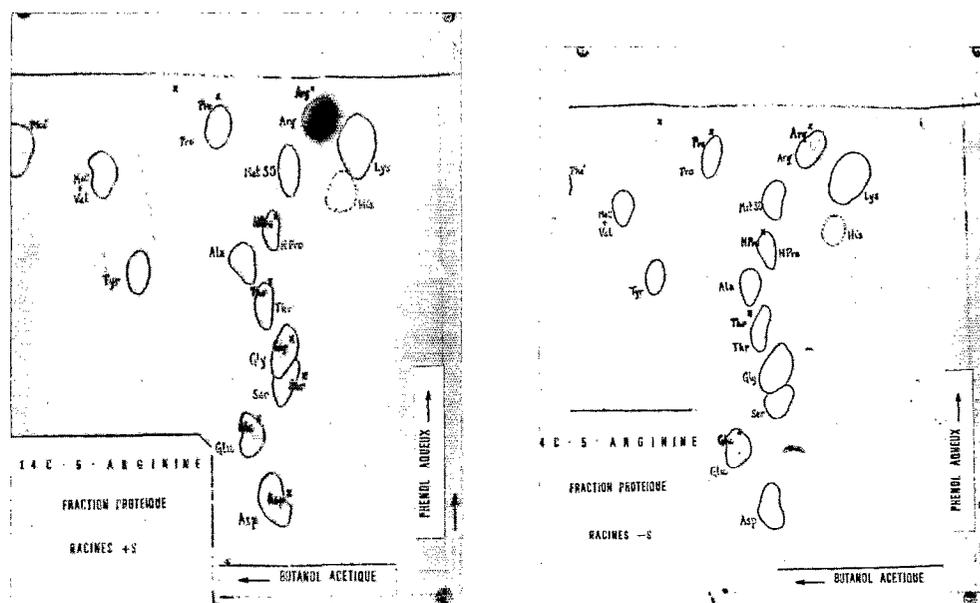


Fig. 20. — Autoradiochromatogrammes de la fraction insoluble. — 165 jours d'exposition sur radiofilm.

L'induction ou la correction de la déficience ne fait pas apparaître de changement sur les radiochromatogrammes des racines.

Les fractions protéiques des autres organes des plantes +S, folioles incluses, sont moins marquées que celles des racines et on n'y distingue que la tache radioactive de l'arginine.

Les fractions correspondantes issues des rognons — S ne révèlent pas de taches radioactives.

La correction de la déficience fait apparaître la tache de l'arginine, alors que l'induction de la déficience ne détermine pas de changement par rapport aux organes +S.

## B. ABSORPTION PÉTIOLAIRE.

L'étude effectuée en 1966 sur le devenir de l'arginine  $^{14}\text{C}$  par la méthode de l'absorption radiculaire ne nous a pas permis d'identifier d'autre composé radioactif du cycle de l'ornithine que de l'arginine.

Nous avons repris le problème en 1967 par la technique de l'absorption pétioleaire en mettant à la disposition des feuilles des quantités plus élevées de traceur. De plus,

nous avons fait absorber celui-ci soit à la lumière soit à l'obscurité et essayé de déterminer ainsi s'il n'y avait pas un rapport entre les termes intermédiaires du cycle, l'incorporation dans les protéines et l'éclaircissement. Nous avons également opéré en 1967 sur les feuilles de plantes plus jeunes qu'en 1966.

Pour l'étude de l'absorption pétiolaire on a effectué des cultures sur sable dans les conditions habituelles.

Au stade de préfloraison on a coupé les avant-dernières feuilles des plantes +S et --S. Leurs pétioles ont été immédiatement introduites dans des tubes contenant 1 ml de solution nutritive additionnée de l'arginine  $^{-14}\text{C}$ -5 à raison de 0,5 mCi par 50 ml.

Pour la durée du contact avec le radiotraceur qui était de 3 heures et de 6 heures, la moitié des tubes a été placée à l'obscurité, l'autre moitié à la lumière du jour. De plus, un lot de témoins a été fixé immédiatement après excision des feuilles et un autre mis en contact avec l'arginine non radioactive.

Un échantillon moyen a été constitué par 12 folioles. Après le contact les pétioles ont été éliminées et les folioles lyophilisées.

Le tableau XXI représente les poids secs moyens des folioles constituant les différents échantillons. Il y avait deux échantillons par traitement ; chacun d'eux se composait de trois feuilles c'est-à-dire 12 folioles.

TABLEAU XXI  
MATIÈRE SÈCHE DES FOLIOLES PAR ÉCHANTILLON (en mg)

Durée du contact  Traitement nutritionnel	0 heure témoin	6 heures l. témoin	6 heures ob. témoin	3 heures l. *	3 heures ob. *	6 heures l. *	6 heures ob. *	échan- tillon moyen
	+S	843,7	859,2	931,6	845,4	1021,5	926,5	
--S	506,6	709,0	627,4	716,9	587,7	729,8	602,6	640,0

- témoin = contact pétiolaire avec la solution exempte de traceur.
- \* = contact pétiolaire avec la solution contenant le traceur.
- l. = contact à la lumière.
- ob. = contact à l'obscurité.

Le tableau fait ressortir une certaine variabilité entre les échantillons des différents traitements, en dépit de nos efforts pour prélever des feuilles semblables. La variabilité des échantillons est un facteur qui peut entraîner une erreur d'appréciation des résultats quantitatifs. Nous espérons toutefois pouvoir tirer de cette expérience certaines conclusions quantitatives valables ainsi que des conclusions qualitatives tout à fait correctes.

#### a) RADIOCOMPTAGE

Le tableau XXII résume les résultats des comptages de la radioactivité des folioles en fonction du traitement nutritionnel +S et --S des plantes et de l'éclaircissement des

TABLEAU XXII  
 ABSORPTION PÉTIOLAIRE DE L'ARGININE —  $^{14}\text{C}$  — 5 EN dpm  $\times 10^{-2}$

Durée du contact		3 heures à la lumière			3 heures à l'obscurité			6 heures à la lumière			6 heures à l'obscurité		
Milieu nutritif	Fraction	par mg m.s.	Poids folioles d'une feuille	par folioles d'une feuille	par mg m.s.	Poids folioles d'une feuille	par folioles d'une feuille	par mg m.s.	Poids folioles d'une feuille	par folioles d'une feuille	par mg m.s.	Poids folioles d'une feuille	par folioles d'une feuille
+S	Hydro-soluble	10,12	$\times 140,9$	1426	10,40	$\times 170,3$	1771	28,91	$\times 154,4$	4464	12,49	$\times 141,8$	1771
	Inso-luble	2,19		309	1,80		307	6,67		1030	3,19		452
	Total			1735			2078			5494			2223
-S	Hydro-soluble	10,28	$\times 119,5$	1228	9,49	$\times 98,0$	930	6,11	$\times 121,7$	744	10,45	$\times 100,5$	1050
	Inso-luble	0,86		103	0,81		79	0,87		106	0,80		80
	Total			1331			1009			850			1130

feuilles pendant la durée du contact. Les résultats sont exprimés séparément pour la fraction hydrosoluble et pour le résidu insoluble ainsi qu'en radioactivité totale des deux fractions en dpm/mg de la matière sèche et en dpm par folioles d'une feuille. Entre les chiffres correspondant aux dpm/mg de la matière sèche et aux dpm par folioles d'une feuille nous avons intercalé les poids moyens des folioles d'une feuille pour chaque variante, afin de mieux rendre compte de la validité des résultats.

Tout d'abord il y a lieu de souligner que pour toutes les variantes la radioactivité des fractions solubles est très supérieure à celle des fractions insolubles, aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité. Si l'on considère les folioles +S on constate qu'à la lumière la radioactivité de deux fractions augmente très nettement entre 3 et 6 heures d'absorption du traceur. A l'obscurité l'augmentation de la radioactivité est beaucoup moins spectaculaire. La radioactivité de la fraction insoluble croît plus vite que celle de la fraction soluble.

La différence entre la radioactivité à la lumière et celle à l'obscurité n'apparaît très nettement qu'après 6 heures. C'est également après 6 heures de contact que l'on voit nettement que l'incorporation de l'arginine marquée dans les protéines des folioles +S est plus intense à la lumière qu'à l'obscurité. Ceci confirme qu'à la lumière la protéosynthèse est plus importante que la protéolyse. Au début, après 3 heures, le phénomène est peu marqué. Cette dernière observation traduit vraisemblablement la chute des protéines due au traumatisme [141] [102].

Considérons à présent les folioles --S. Ici on observe un phénomène inverse : la radioactivité des folioles maintenues à la lumière diminue entre 3 et 6 heures bien que les poids des folioles soient sensiblement les mêmes. Il semble que l'on soit ici en présence d'un phénomène très curieux de relâchement de l'arginine  $^{14}\text{C}$  dans le milieu extérieur, relâchement qui ne se manifeste pas à l'obscurité. L'incorporation dans les protéines étant très faible on n'observe pas de différence importante ni en fonction de l'éclaircissement, ni en fonction de la durée de l'expérience.

Ce qui nous intéresse plus particulièrement dans ces résultats c'est, en premier lieu, que les folioles +S, ne contenant que peu d'arginine non radioactive, absorbent beaucoup plus d'arginine marquée que les folioles --S. Ces dernières semblent même en relâcher dans le milieu entre 3 et 6 heures de contact. D'autre part, si les folioles +S incorporent rapidement beaucoup d'arginine  $^{14}\text{C}$  dans leurs protéines, les folioles --S n'en incorporent que peu.

## b) AUTORADIOCHROMATOGRAPHIE

### *α. Fraction soluble.*

Dans toutes les variantes, après 3 heures de contact, on observe toute une série de composés radioactifs. L'arginine est de loin la plus marquée (fig. 21a). On remarque également de l'ornithine radioactive. Mais on observe aussi de la radioactivité au niveau de l'agmatine tant chez les folioles +S que --S.

L'acide glutamique est très nettement marqué dans le cas +S à la lumière, il l'est très faiblement chez les +S à l'obscurité et chez les --S à la lumière ; on ne le voit pas du tout dans les --S à l'obscurité. Ceci témoignerait en faveur d'un pouvoir de dégradation plus élevé chez les +S.

Après 6 heures d'absorption on obtient des images comparables à celles obtenues après 3 heures, mais les radiochromatogrammes semblent ici moins marqués. Une exception — les +S après 6 heures d'absorption à la lumière — où les acides aminés sont plus



radioactifs (fig. 21 b) Chez les — S à la lumière, seul l'acide glutamique est plus fortement marqué après 6 heures qu'après 3 heures (Fig. 21 c) et apparaît également chez les — S à l'obscurité.

De plus on peut déceler des traces de radioactivité au niveau de la lysine et de l'histidine.

### *β. Fraction insoluble.*

Dans les hydrolysats des folioles +S après 6 heures de contact avec le radiocarbone à la lumière, on observe la présence de l'arginine fortement radioactive ainsi que celle de l'acide glutamique faiblement marqué (Fig. 22). Dans les hydrolysats de toutes les autres variantes on constate la présence de l'arginine radioactive bien marquée à l'exclusion de tout autre acide aminé.

Soulignons toutefois que la tache correspondant à l'arginine est nettement plus marquée sur les autoradiochromatogrammes des hydrolysats des folioles +S que sur ceux des folioles —S. De même chez les folioles +S à la lumière l'arginine est nettement plus marquée que celle des folioles +S à l'obscurité.

L'ensemble de cette série d'autoradiochromatogrammes (fractions solubles et insolubles) permet de dégager quelques points essentiels :

— la presque totalité du  $^{14}\text{C}$  se retrouve dans l'arginine ;

— on trouve également du  $^{14}\text{C}$  dans l'ornithine, mais en quantité relativement peu élevée, ainsi qu'au niveau de l'agmatine ;

— on n'observe de différences qualitatives entre les folioles +S et —S qu'en ce qui concerne l'acide glutamique ;

— dans les hydrolysats des résidus insolubles on retrouve dans tous les cas de l'arginine nettement marquée ;

— les différences de marquage constatées prouvent que le pouvoir d'intégration de l'arginine dans les protéines et du renouvellement de ces dernières est plus élevé chez les +S que chez les —S et à la lumière qu'à l'obscurité.

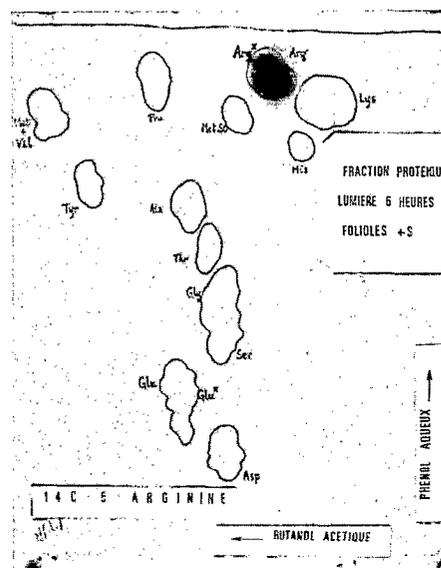


Fig. 22. — Autoradiochromatographie.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

RATNER et UKHINA [154] ont fait absorber (absorption radiculaire) aux plantes de maïs des acides aminés y compris des acides aminés dicarboxyliques et ont constaté que ces composés subissaient dans les racines une désamination avant d'être utilisés sous forme d'aminourée pour la synthèse dans ces mêmes racines, d'une série d'autres acides aminés et amides (essentiellement la glutamine) lesquels sont transportés dans les organes aériens [153]. Dans les expériences réalisées en culture stérile [152] ces auteurs ont repris le problème en modifiant certains points du schéma de l'expérience, tendant à

éliminer des possibilités d'action secondaire. Les acides aminés employés étaient le glyco-colle et l'acide glutamique.

Avant de placer les plantes sur les solutions nutritives contenant des acides aminés, on les maintenait durant 3 jours sur de l'eau en vue de diminuer, dans les racines, la concentration des formes solubles d'azote.

A la suite de ces expériences, les auteurs constatent que dès le début de leur absorption par les racines, les deux composés subissent une désamination avec libération d'ammoniac. Ensuite et parallèlement à l'accroissement de la teneur en ammoniac qui se poursuit, commence son utilisation intensive pour la formation, dans les racines, de différents acides aminés, en particulier de la glutamine. Puis, on observe une accumulation considérable d'alanine. Le glyco-colle se transforme en sérine parallèlement à la réaction principale de sa transformation dans les racines — celle de désamination oxydative.

Dans nos expériences, aussi bien par absorption radiculaire que par absorption pétiolaire, nous retrouvons dans les organes de la plante principalement l'arginine radioactive absorbée.

D'autre part, dans nos expériences avec la sève exsudée (voir p. 46), on a trouvé, comme FOWDEN, surtout la  $\gamma$ -méthylène glutamine.

Ces divergences peuvent s'expliquer de différentes manières ; d'une part le métabolisme des substances azotées doit être différent chez le maïs et chez les légumineuses ayant la possibilité de fixer l'azote de l'air et spécialement chez l'arachide qui semble transporter l'azote vers les parties aériennes sous une forme particulière — la  $\gamma$ -MG.

Peut-être que les voies de l'assimilation de l'azote libre de l'air par les légumineuses sont-elles conformes aux conclusions de VINOGRADSKIJ qui considère comme première étape de ce processus la formation de l'ammoniac. Toutefois, si l'azote libre de l'air passe par l'étape ammoniacale, il n'en est vraisemblablement pas de même pour les autres formes d'azote du milieu et notamment pour l'arginine dans le cas de l'arachide.

D'autre part, il y a lieu de se demander si en plaçant les plantes de maïs pour trois jours sur de l'eau, on n'a pas provoqué une sorte de faim d'azote qui se traduirait ensuite, lorsqu'on les met en présence d'une source d'azote, par une intense fabrication d'ammoniac.

Il y a enfin les sources d'azote qui diffèrent dans les deux cas. D'autre part, nos expériences ultérieures concernant l'arginase prouvent qu'au stade avancé les racines de l'arachide ne manifestent qu'une très faible activité arginasique et nous n'avons pas décelé d'uréase.

Si les conclusions de RATNER et coll. étaient généralisables, si l'assimilation des acides aminés par d'autres plantes se faisait par la voie indiquée par ces auteurs, il faudrait supposer que chez l'arachide le remaniement moléculaire a cette particularité qu'il aboutit à l'arginine. Sinon il conviendrait d'admettre que l'arginine n'est pas métabolisée et migre dans le végétal sans subir de transformation.

L'étude effectuée en 1967 par la méthode de l'absorption pétiolaire de l'arginine  $^{14}\text{C}$ -5 a permis de révéler sur les autoradiochromatogrammes des taches radioactives correspondant à l'ornithine. Ceci suggère la présence, chez l'arachide, d'une arginase capable d'hydrolyser l'arginine en ornithine (voir plus loin le chapitre « Activité arginasique »). Nous n'avons toutefois pas pu identifier de citrulline.

La présence de l'ornithine et, comme on le verra plus loin, de l'arginase chez l'arachide n'est pas encore une preuve suffisante de la dégradation cyclique de l'arginine.

Si l'on considère les travaux publiés se rapportant à l'existence d'un cycle de l'orni-

thine chez les végétaux, on constate qu'ils concernent exclusivement, des graines en germination ou des toutes jeunes plantules.

D'autre part, divers auteurs trouvent de l'urée en quantité assez importante chez les légumineuses [108] [117] aux jeunes stades de la germination des graines immatures, alors que BRUNEL [20] n'en trouve point dans les fleurs et les fruits de légumineuses. WILLIAMS et SHARMA [196] constatent que l'activité uréasique se maintient jusqu'au 9<sup>e</sup> jour de la germination dans les parties vertes et jusqu'au 13<sup>e</sup> dans les parties étiolées.

On signale des plantes chez lesquelles on ne rencontre pas d'uréase ; en outre chez les plantes à uréase l'urée n'est pas un produit final comme chez les mammifères où, conformément au cycle de KREBS-HENSELEIT, l'excès d'ammoniaque apparu à la suite des transformations cataboliques de composés azotés, conduit à une excrétion de l'urée.

Dans le cas de l'arachide on est plutôt tenté de hasarder l'hypothèse suivant laquelle, dans la mesure où il est correct de parler de produit final, ce serait plutôt l'arginine qui en serait un.

En effet, c'est ce composé qui est surtout présent sur les autoradiochromatogrammes que nous avons effectués en 1966. Pourtant les racines ont été en contact avec cet acide aminé pendant une période suffisamment longue pour que les transformations puissent avoir lieu. De même dans nos expériences en 1967 bien que la durée maximum de contact ait été beaucoup plus courte qu'en 1966, son incorporation dans les protéines a déjà pu se faire. Toutefois, la tache de l'arginine reste de loin la dominante parmi les acides aminés libres et la seule, peut-on dire, dans les hydrolysats protéiques.

Les différences entre les composés radioactifs apparues sur les autoradiochromatogrammes de 1966 et de 1967 peuvent avoir des causes très diverses. En effet, en 1966 la quantité d'arginine marquée mise à la disposition de la plante a été beaucoup plus faible que celle de 1967. Dans ces conditions certaines taches faiblement marquées, visibles en 1967, comme par exemple l'agmatine, pouvaient ne pas être décelables en 1966.

D'autre part, les temps de contact ont été très différents — 6 heures au plus en 1967 et une semaine en 1966 — ce qui peut être la cause de la disparition — si elle a été présente au début — de la tache de l'ornithine en 1966, de l'absence de l'asparagine et de la présence de l'acide glutamique en 1967. Enfin, il ne faut pas perdre de vue que le fait de traumatiser les plantes en 1967 (contact pétiolaire) a pu avoir une influence sur la gamme de composés radioactifs apparus, alors qu'en 1966 (absorption radiculaire) l'absorption et le transport se sont effectués normalement et l'interaction des organes pouvait s'y exercer.

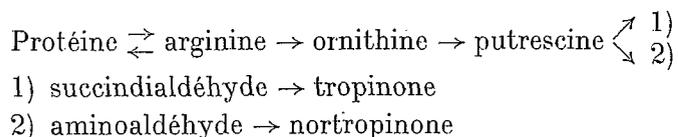
Il n'est certes pas indifférent que l'étude soit réalisée sur des plantes entières ou sur des feuilles détachées.

CHIBNALL [32] [33] soutient que dans les feuilles attachées à la plante, la synthèse des protéines est contrôlée par les hormones venant d'autres parties de la plante. Le fait de détacher les feuilles en 1967 a de même provoqué une protéolyse [141] qui peut être la cause de l'apparition des divers acides aminés très faiblement marqués. KISBAN et coll. [102] ont démontré que le fait de détacher les feuilles chez les plantes a pour effet d'augmenter l'activité d'un certain nombre d'enzymes. Cette augmentation de l'activité enzymatique va de pair avec la chute des protéines totales. Précisons toutefois que ces essais enzymatiques ont été effectués 4 à 7 jours après le découpage des disques foliaires.

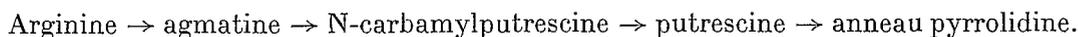
Les auteurs tirent de leur travail une conclusion suivant laquelle le système radiculaire exerce une influence régulatrice sur le métabolisme foliaire en maintenant une balance normale entre la synthèse et la dégradation des protéines.

Les autoradiochromatogrammes nous ont permis de déceler la présence de l'agmatine à côté de l'arginine et de l'ornithine et ceci aussi bien chez les folioles +S que chez les folioles —S. Nous soupçonnons la présence de la putrescine, produit de la décarboxylation de l'ornithine, bien que nous n'ayons pas pu l'identifier avec certitude. Ce point demande à être confirmé.

La putrescine a été trouvée chez *Datura stramonium* par CIAMCIAN et RAVENNA en 1911 [34] ainsi que par CROMWELL [46] qui a suggéré l'existence d'une synthèse des alcaloïdes à partir de ce tétraméthylène-diamine chez *Atropa belladonna* selon le schéma suivant :



YOSHIDA et MITAKE [200] constatent l'incorporation de l'agmatine -G-<sup>3</sup>H et de N-carbamylputrescine -1,4-<sup>14</sup>C dans la nicotine de tabac. Ils pensent que l'anneau pyrrolidine de la nicotine est formé de putrescine selon le schéma suivant :



La putrescine a été signalée dans les inflorescences de *Boletus edulis* [159] et est également un facteur de croissance essentiel chez la bactérie *Hemophilus parainfluenzae* [87] [88] [89] [125].

Il a été démontré qu'elle était également essentielle chez *Neisseria perflava* et qu'elle pouvait être remplacée par l'agmatine, la spermatine et la spermine. La présence de petites quantités de putrescine dans le jus d'orange a été noté chez *Citrus grandis* [92].

La putrescine a été trouvée par COLEMAN et HEGARTY [40], SMITH [167] et YOSHIDA [199] chez les plantes déficientes en potassium. Ce dernier auteur a signalé la présence de l'agmatine dans les racines de tabac déficient en soufre.

Ces considérations conduisent à se demander s'il n'y a pas chez l'arachide, une autre voie métabolique de dégradation de l'arginine que celle du cycle de KREBS-HENSELEIT. Une petite fraction de l'arginine semble se transformer en agmatine et putrescine.

Signalons que dans le cas de la déficience en soufre de l'arachide nous n'avons pas identifié les déviations métaboliques trouvées chez les cultures de tissus tumoraux [122].

En conclusion, si on trouve chez les végétaux tous les termes ainsi que le complexe, enzymatique participant au cycle de KREBS-HENSELEIT ceux-ci ne sont signalés qu'en début de la végétation.

Il est possible que chez l'arachide il soit également décelable aux jeunes stades et chez les organes reproducteurs.

Ces considérations nous conduisent à aborder des recherches enzymatiques et en particulier des recherches sur l'arginase.

## VII — ACTIVITÉS ENZYMATIQUES (ARGINASE ET URÉASE)

### INTRODUCTION

Au cours de nos études antérieures, nous avons observé une accumulation de l'arginine libre chez l'arachide et le cotonnier déficients en soufre [84] [85]. Une des explications possibles de ce phénomène pouvant être le blocage de la dégradation enzymatique de l'arginine, nous avons été amenés à rechercher les enzymes qui en sont responsables et en premier lieu l'arginase.

Depuis que SHIGA [165] en 1904 a découvert l'arginase dans la levure, un certain nombre de travaux ont été effectués sur cette désamidinase chez les plantes supérieures.

KIESEL [101] en 1909 a constaté sa présence chez certaines angiospermes papilionacées (*Vicia sativa L*, *Trifolium pratense L*, *Lupinus luteus L*).

KITAGAWA et TOMITA [103] en 1929 l'ont trouvé chez *Canavalia ensiformis*.

KLEIN et TAUBÖCK [106] [107] en 1932 constatent que l'arginine absorbée par le haricot en culture stérile n'est pas incorporée dans les protéines, mais se trouve être dégradée en urée et ornithine.

DAMODARAN et VANKATESAN [48] en 1948 ont trouvé l'arginase chez *Phaseolus mungo* et *Dolichos biflorus*.

YONEZU en 1952 [198] a découvert l'arginase chez le soja et VAIDYNATHAN et GIRI en 1953 chez *Dolichos lablab* [188].

CLOSE et coll. [35] en 1953, ont constaté une diminution de la teneur en arginine et l'apparition de grandes quantités d'ornithine dans la farine de manioc, au cours de la conservation.

GUIITON [81] en 1957, trouve l'arginase dans les graines de plusieurs espèces de gymnospermes.

KASTING et DELWICHE [100] en 1958, infiltrent de l'arginine uniformément marquée au melon d'eau. Ils trouvent de l'ornithine radioactive.

BALDY et GUIITON [7] en 1962, constatent que chez les ptéridophytes l'enzyme est localisé essentiellement dans les feuilles, alors que les autres organes en sont pratiquement dépourvus.

MORAWSKA et coll. [136] en 1963, signalent la présence de l'arginase dans les graines sèches, les graines germées et les jeunes plantules de 30 espèces d'angiospermes appartenant à 12 familles botaniques différentes.

BENDETSKY [11] en 1964 signale sa présence dans les graines de *Vicia villosa* en germination.

GOAS, en 1965, dans *Pisum sativum L*, met en évidence l'activité arginasique dans les différents organes des plantules et suit son évolution pendant les premiers stades du développement [79].

Enfin BRUNEL et coll. [21] [22] [23] [24] [25] 1965-1967 consacrent des études à la présence et à la répartition de l'arginase chez diverses plantes, ainsi qu'à sa localisation dans tel ou tel organe.

Toutefois, si la présence de l'arginase a été constatée dans la quasi-totalité du règne végétal, on signale des organismes telles que *Serratia marcescens*, ne contenant pas cet enzyme [76].

MIETTINEN et VIRTANEN [132] n'ont pas trouvé l'enzyme dans les racines de l'aune en dépit de la présence de grandes quantités d'ornithine, de citrulline et d'arginine.

MOURGUE et DOKHAN [140] également ne l'observent pas dans *Ricinus communis*.

D'après COLEMAN [39], l'arginase chez les plantes supérieures ne se rencontre que sporadiquement.

MÉNAGÉ et MOREL [128] constatent que les tissus de *Crown-gall* métabolisent l'arginine d'une manière très spéciale : ne possédant aucune activité arginasique, ils transforment cet acide aminé en diverses guanidines.

Nous n'avons trouvé aucun travail sur l'arginase chez l'arachide, ni sur un rapport possible entre l'arginase et la déficience en soufre.

### Essais préliminaires.

Pour le choix des conditions expérimentales, nous nous sommes largement inspirés de l'étude effectuée par GUITTON, non sans en vérifier les données. Les vérifications nous ont d'ailleurs conduits à introduire, par la suite, quelques modifications convenables pour notre matériel végétal.

#### MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTIVITÉ ARGINASIQUE CHEZ L'ARACHIDE

Pour cet essai, nous avons utilisé les parties aériennes des plantules d'arachide, au stade de 3-4 feuilles, séchées sous vide, à la température ambiante et finement broyées.

Les données du protocole expérimental et les résultats sont consignés dans le tableau XXIII.

TABLEAU XXIII

DIFFÉRENTS MILIEUX SERVANT A LA MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTIVITÉ ARGINASIQUE

	E	T	T1	T2	T3
Solution d'arginine 0,4 M à pH = 9,5	5 ml (2mM)	5 ml	—	—	5 ml
Tampon pH = 9,5	—	—	5 ml	5 ml	—
Eau	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Matériel végétal intact	50 mg	—	50 mg	—	—
Matériel végétal bouilli	—	50 mg	—	50 mg	—
Toluène (en gouttes)	2	2	2	2	2
Urée formée en mg	3,1 (0,052mM)	0	0	0	0

Ces différents milieux ont été placés au bain-marie à la température du 43° C, pour une durée de 30 minutes.

On voit, d'après les témoins T1, T2 et T3, que l'urée apparue dans E provient d'une hydrolyse enzymatique de l'arginine.

La formation d'ornithine par suite de cette hydrolyse a été vérifiée dans d'autres essais par chromatographie en couche mince (Fig. 23).

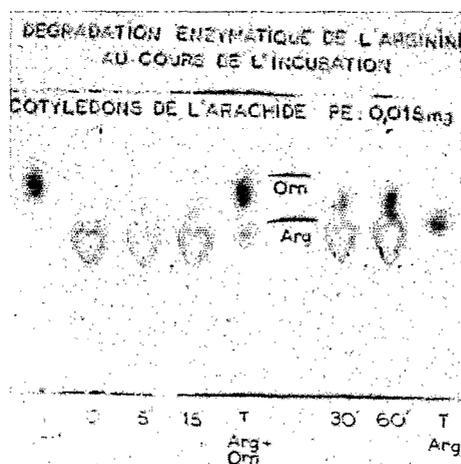


Fig. 23. — Chromatographie en couche mince.

#### MODIFICATIONS INTRODUITES DANS LES CONDITIONS D'INCUBATION

Les essais effectués sur le choix des conditions optima d'action de l'arginase de notre matériel végétal nous ont conduits à introduire 2 modifications se rapportant à la quantité de matériel enzymatique et à la durée de l'incubation.

Les graphiques ci-dessous schématisent les résultats de ces études (Fig. 24). Il en ressort que dans nos conditions expérimentales il y a proportionnalité entre la concentration en matériel enzymatique et l'urée formée.

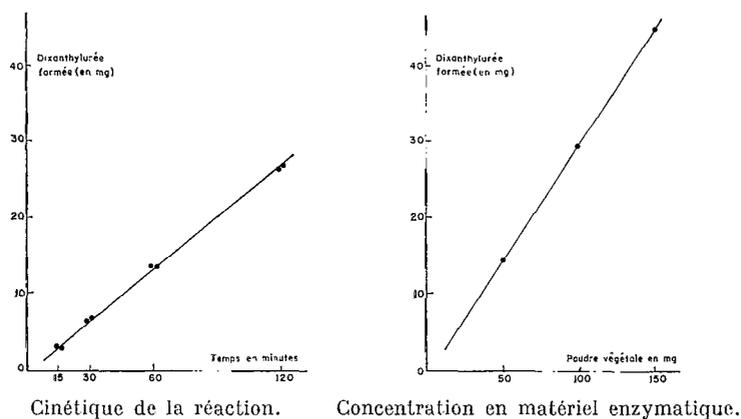


Fig. 24.

Étant donné la faible activité arginasique de notre matériel végétal, nous avons donc adopté dans nos études ultérieures de l'activité arginasique une durée d'hydrolyse de 1 heure pour un matériel végétal de 150 mg.

Nous avons également effectué des essais en blanc avec de l'urée : ainsi, 2 mg d'urée nous ont donné 13, 7 mg de dixanthylurée. Le résultat théorique étant égal à 14 mg.

#### A. ÉVOLUTION, AU COURS DE LA CROISSANCE, DE LA VALEUR ARGINASIQUE CHEZ L'ARACHIDE DÉFICIENTE OU NON EN SOUFRE.

##### DÉFINITION DE LA VALEUR ARGINASIQUE

La valeur arginasique représente le nombre d'unités arginasiques contenues dans 1 gramme de matière sèche. Une unité arginasique correspond à l'hydrolyse en 1 minute, dans nos conditions expérimentales, d'une micromole d'arginine.

##### RÉSULTATS ET DISCUSSION

Cette étude a été faite sur les cultures d'arachides en 1965. Pour chaque stade physiologique, on a effectué deux récoltes, à des dates différentes de l'été. Les échantillons moyens ont été prélevés à raison de 2 à 3 par récolte et par traitement.

L'activité arginasique a été déterminée selon la méthode décrite dans le chapitre « Matériel et techniques ».

Le tableau XXIV rend compte de la répartition de l'activité arginasique selon les organes et les stades de développement. L'activité de l'enzyme est exprimée en valeur arginasique.

Les graines non germées sont inactives. BRUNEL-CAPELLE et coll. [22] [25], à l'occasion des études sur les plantes à bulbe et à rhizome et sur la fève, concluent qu'il est extrêmement rare de pouvoir caractériser l'enzyme dans un tissu qui accumule des réserves.

Dès le départ de la végétation — au stade de 2 feuilles non étalées — on observe la présence d'une forte activité arginasique, aussi bien dans les cotylédons que dans les autres organes des jeunes plantules. Par la suite, l'activité des organes végétatifs diminue progressivement jusqu'à la fin de l'expérimentation. Cette chute est plus ou moins rapide suivant les organes.

L'activité arginasique dans les cotylédons montre tout d'abord une tendance inverse de celle observée dans les organes végétatifs. L'activité de l'enzyme accuse un léger accroissement entre les stades de 2 et 2-3 feuilles. Elle diminue ensuite, mais assez lentement. Encore faudrait-il, pour mieux préciser le phénomène, rechercher les valeurs arginasiques des plantules au stade qui précède celui de 2 feuilles.

En examinant les valeurs arginasiques présentées par les différents organes, on constate qu'au début de la croissance l'enzyme est localisé principalement dans les jeunes folioles et les cotylédons. Aux stades ultérieurs, les folioles perdent rapidement leur activité et deviennent moins actives que, par exemple, les tiges ou les hypocotyles, alors que l'activité des cotylédons demeure importante. Pour les racines, les valeurs arginasiques sont, dans leur ensemble, toujours inférieures à celles des parties aériennes.

Les organes reproducteurs présentent, à leur apparition, des valeurs arginasiques

TABLEAU XXIV  
VALEURS ARGINASQUES CHEZ DES PLANTS D'ARACHIDE CARENCÉS OU NON EN SOUFRE

Stade du développement	ORGANES VÉGÉTAUX ANALYSÉS													
	Cotylédons		Folioles*		Tiges + pétioles**		Hypocotyles		Racines		Fleurs		Gynophores	
PLANTES SUR EAU														
2 feuilles.....	28,7		33,9		18,7		18,0		12,9					
2-3 feuilles.....	31,3		17,5		16,4		16,3		11,2					
PLANTES SUR SOLUTIONS NUTRITIVES +S ET -S														
	+S	-S	+S	-S	+S	-S	+S	-S	+S	-S	+S	-S	+S	-S
4-5 feuilles.....	24,0	23,5	8,9	5,7	6,8	4,7	9,7	6,9	3,1	1,6				
6-7 feuilles.....	16,8	15,5	3,8	0,7	5,8	2,2	4,7	3,6	3,0	0,6				
Début de floraison.....	16,3	13,8	2,1	0,3	4,1	1,6	2,7	1,5	2,7	0,4	19,5	20,1		
Début de formation des gynophores.....			1,6	0,0	2,0	1,4	2,0	traces	0,9	0,0	—	—	6,3	5,2

\* Folioles des tiges principales.

\*\* Tiges principales.

élevées. Les fleurs en particulier montrent une activité intense. Au début de la floraison, celle-ci est nettement supérieure à celle de tous les autres organes de la plante, y compris les cotylédons. De même, au moment de leur formation les gynophores, se révèlent plus actifs que les organes végétatifs déjà vieillissants.

La comparaison des résultats obtenus pour les plantes +S et — S montre que la déficience en soufre entraîne une réduction notable de l'activité arginasique, quels que soient l'organe et le stade physiologique. Seule l'activité des fleurs ne semble pas être affectée par le déséquilibre nutritif. D'une manière générale, l'écart entre les plantes +S et — S va en s'accroissant à mesure que l'état de carence progresse. A la fin de l'expérience certains organes des plantes carencées (les folioles et les racines) sont complètement dépourvus d'activité. Quant aux tiges — S, elles se comportent différemment : leur valeur arginasique ne disparaît pas entièrement mais reste à peu près stationnaire aux deux derniers stades. Ceci fait penser aux échanges possibles entre ces organes et les gynophores dont l'activité est relativement élevée.

#### EN RÉSUMÉ :

La mobilisation des réserves protéiques dans les cotylédons est accompagnée d'une activité arginasique intense.

Comme BRUNEL-CAPELLE et BRUNEL [23] chez *Arum italicum* Mill., nous avons trouvé une activité arginasique importante dans les très jeunes organes.

L'activité arginasique décroît au cours de la croissance des plantes.

La déficience en soufre provoque une réduction notable de l'activité arginasique ; ce qui expliquerait, au moins en partie, l'accumulation de l'arginine libre dans les organes des plantes carencées.

On peut se demander si la réduction de l'activité a pour cause une diminution de l'enzyme dans les organes — S, ou bien si l'arginase y est présente en quantité normale mais se trouve sous une forme inactive. Dans ce dernier cas, il devrait être possible de lever cette inhibition. C'est ainsi que nous avons été amenés à essayer d'activer l'arginase.

#### B. RÉACTIVATION DE L'ARGINASE CHEZ L'ARACHIDE DÉFICIENTE OU NON EN SOUFRE.

Nous avons constaté que les plants d'arachide déficients en soufre accusent une activité arginasique réduite en comparaison avec les plantes normales [27].

Nous nous sommes demandés dans quelle mesure l'activité arginasique des plantes — S pourrait être augmentée par des activateurs.

On sait que, par exemple, certains cations divalents comme :  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , ont la propriété d'augmenter l'activité arginasique des tissus [5], [8], [11], [30], [110], [131], [164], [177], [178].

D'autre part, certains auteurs signalent comme activateurs de l'arginase la cystéine et le glutathion [137], d'autres au contraire n'observent pas d'activation par la cystéine [25].

Nous avons donc essayé sur des poudres de plantes +S et — S l'action activatrice du  $\text{Cl}_2\text{Mn}$  et de la cystéine.

Le matériel végétal provient des cultures faites en 1966 et en 1967 dans les mêmes

conditions que précédemment. Toutefois les symptômes visibles de la déficience en soufre ont été beaucoup plus prononcés et les plantes +S beaucoup plus vigoureuses.

La technique pour déterminer l'activité arginasique a été celle employée auparavant. Les activateurs utilisés — le  $\text{Cl}_2\text{Mn}$  et la cystéine — ont été préparés extemporanément et ajoutés aux milieux en même temps que le substrat. L'incubation préalable s'est avérée inefficace.

Afin d'éviter la précipitation du manganèse, nous avons été amenés à remplacer le tampon phosphate utilisé auparavant (tampon de Clark et Lubs), par un tampon glycinate et surtout par un tampon maléate. Le tampon phosphate a servi de référence. On a ainsi utilisé les trois tampons additionnés du substrat et ces mêmes milieux additionnés d'activateurs.

### RÉSULTATS

#### 1° Ions $\text{Mn}^{2+}$

La première constatation qui s'impose en examinant les résultats consignés dans le tableau XXV, est l'action inhibitrice exercée par le tampon maléique sur l'activité arginasique. Toutefois, si on additionne à ce tampon du  $\text{Cl}_2\text{Mn}$  il y a activation de l'arginase. En présence des ions  $\text{Mn}^{2+}$ , on n'observe plus d'inhibition et qui plus est, l'activité arginasique dans ce milieu se trouve augmentée d'une manière significative par rapport à celle obtenue dans le tampon Clark et Lubs.

TABLEAU XXV

RÉACTIVATION DE L'ARGINASE PAR DU  $\text{Cl}_2\text{Mn}$ . VALEURS ARGINASIQUES. (1966)

ORGANES végétaux	STADES	CULTURES	TAMPON Clark-Lubs	TAMPON maléate	TAMPON maléate + $\text{Cl}_2\text{Mn}$
Cotylédons	2-3 feuilles	$\text{H}_2\text{O}$	28,6	13,5	47,0
Folioles	6-7 feuilles	+S	5,9	5,1	10,4
Folioles	6-7 feuilles	-S	3,2	0,8	5,2
Tiges latérales + feuilles	Floraison	+S	2,8	1,9	5,4
Tiges latérales + feuilles	Floraison	-S	0,5	Traces	2,5
Gynophores	Formation des gousses	+S	2,6	—	6,2

La réactivation est manifeste dans les poudres végétales des différents organes expérimentés à divers stades de la végétation. Toutefois l'activité arginasique des organes des plantes — S reste toujours inférieure à celle des plantes +S.

TABLEAU XXVI  
 RÉACTIVATION DE L'ARGINASE PAR LA CYSTÉINE.  
 VALEURS ARGINASIQUES.

a)

(1965)

ORGANES végétaux	STADES	CULTURES	CLARK-LUBS	CLARK-LUBS +cystéine
Folioles	6-7 feuilles	+S	3,3	4,8
Folioles	6-7 feuilles	—S	0,6	0,9
Tiges + pétioles	6-7 feuilles	+S	4,8	6,0
Tiges + pétioles	6-7 feuilles	—S	2,0	2,7
(1966)				
Folioles	6-7 feuilles	+S	5,9	8,0
Tiges latérales + feuilles	Floraison	+S	2,7	3,0
Tiges latérales + feuilles	Floraison	—S	0,5	2,1
b)			MALÉATE	MALÉATE +cystéine
Folioles	6-7 feuilles	+S	5,1	7,1
Folioles	6-7 feuilles	—S	0,8	1,7
Tiges latérales + feuilles	Floraison	+S	1,9	2,0
Tiges latérales + feuilles	Floraison	—S	Traces	Traces
c)			GLYCINATE	GLYCINATE +cystéine
Folioles	6-7 feuilles	+S	4,6	9,2
Tiges latérales + feuilles	Floraison	+S	2,8	4,2
Tiges latérales + feuilles	Floraison	—S	0,4	1,7

## 2° Action de la cystéine

Comme le démontrent les résultats réunis dans les tableaux XXVI a, b, c, ainsi que le tableau XXVIII illustrant les résultats obtenus en 1967, la cystéine a également activé l'arginase. Le degré d'activation est généralement plus élevé lorsqu'il s'agit d'un matériel enzymatique — S en comparaison avec celui des plantes +S. Le degré d'activation varie également avec l'organe, le stade du développement et le milieu réactionnel.

Toutefois, la cystéine est généralement un activateur à un degré moindre que le  $Cl_2Mn$ . Ceci ressort nettement dans le milieu réactionnel d'acide maléique. On pourrait supposer que chacun des 2 activateurs en question active une autre région de l'enzyme. Qu'advierait-il si on les faisait agir ensemble ? Les tableaux XXVII a, b, et XXVIII répondent à cette question.

Le  $Cl_2Mn$  et la cystéine paraissent avoir une action synergique.

Cette nouvelle activation est également plus élevée avec le matériel végétal — S qu'avec celui des plantes +S.

TABLEAU XXVII  
RÉACTIVATION DE L'ARGINASE PAR  $Cl_2Mn$  + CYSTÉINE.  
a) VALEURS ARGINASIQUES. (1966)

ORGANES végétaux	STADES	CULTURES	MALÉATE + $Cl_2Mn$	MALÉATE + $Cl_2Mn$ + cystéine
Folioles	6-7 feuilles	+S	10,4	13,0
Folioles	6-7 feuilles	—S	4,6	6,4
Tiges latérales + feuilles	Floraison	+S	5,4	6,1
Tiges latérales + feuilles	Floraison	—S	2,5	2,8
b)			GLYCINATE + $Cl_2Mn$	GLYCINATE + $Cl_2Mn$ + cystéine
Folioles	6-7 feuilles	+S	6,4	10,0
Tiges latérales + feuilles	Floraison	+S	3,3	4,5
Tiges latérales + feuilles	Floraison	—S	1,2	1,7

TABLEAU XXVIII  
RÉACTIVATION DE L'ARGINASE. (1967)

Tampons	FOLIOLES AU STADE DE 6 FEUILLES		
	Activateurs	Valeurs arginasiques	
		+S	—S
Clark-Lubs	sans	2,8	0,4
Clark-Lubs	Cystéine	3,1	0,9
Maléate	Cl <sub>2</sub> Mn	3,6	1,6
Maléate	Cystéine	2,9	1,3
Maléate	Cl <sub>2</sub> Mn + cystéine	4,5	2,4

TABLEAU XXIX  
RÉACTIVATION DE L'ARGINASE — MILIEU TAMPONNÉ DE GLYCINATE.  
VALEURS ARGINASQUES. (1966)

Organes végétaux	Stades	Cultures	Glycinate	Glycinate + Cl <sub>2</sub> Mn	Glycinate + cystéine	Glycinate + Cl <sub>2</sub> Mn + cystéine
Cotylédons	2-3 feuilles	H <sub>2</sub> O	28,6	36,0	—	—
Folioles	6-7 feuilles	+S	4,6	6,4	9,2	10,0
Folioles	Floraison	+S	0,7	2,7	—	—
Folioles	Floraison	—S	Traces	0,9	—	—
Tiges latérales + feuilles	Floraison	+S	2,8	3,3	4,2	4,5
Tiges latérales + feuilles	Floraison	—S	0,4	1,2	1,7	1,7
Gynophores	Formation des gousses	+S	2,5	3,6	—	—

### 3° Importance du tampon

Le fait d'avoir constaté une forte dépréciation de l'activité arginasique dans le milieu maléique nous a incités à essayer un autre milieu tamponné. Nous avons choisi le tampon glycinate.

Le tampon glycinate (tableau XXIX) permet, dans l'ensemble, d'obtenir des valeurs arginasiques comparables au milieu Clark et Lubs et nettement supérieures au milieu réactionnel de maléate. Les ions  $Mn^{2+}$  réactivent l'arginase dans le milieu glycinate mais de façon moins intense qu'en milieu maléate. La cystéine dans le milieu glycinate est un activateur plus énergique que le mangagèse dans ce même milieu. L'action combinée des 2 activateurs ne semble pas accroître d'une manière significative les valeurs arginasiques obtenues avec la seule cystéine.

On observe donc un comportement différent de l'arginase selon le milieu (quoique celui-ci soit toujours au même pH) et selon l'activateur.

Les auteurs notent souvent une activité fortement accrue du fait de l'addition d'ions manganèse au milieu réactionnel acide maléique + NaOH. Encore faut-il tenir compte de l'inhibition provoquée par ce milieu.

### C. ÉVOLUTION, AU COURS DE LA CROISSANCE, DE L'ACTIVITÉ ARGINASIQUE MESURÉE EN PRÉSENCE DE $Cl_2Mn$ .

Nous avons, en 1965, étudié au cours de la croissance l'évolution de l'activité arginasique des poudres des plantes d'arachide déficientes ou non en soufre. L'activité arginasique a été déterminée en milieu réactionnel de Clark et Lubs sans activateur. A la lumière des études que nous avons effectuées, sur la réactivation de l'arginase, il nous a paru intéressant de vérifier les activités arginasiques en présence des ions  $Mn^{2+}$ , des plantes +S et - S au cours de la végétation.

Cette étude a été effectuée sur des cultures de 1966, les activités étant mesurées en milieu maléate additionné de  $Cl_2Mn$ .

Les résultats de cette étude sont résumés dans le tableau XXX.

D'une manière générale, on observe les mêmes tendances qu'en 1965 à la décroissance de l'activité arginasique au cours de la végétation dans tous les organes analysés.

De même, l'activité arginasique des organes des plantes déficientes en soufre est très inférieure à celle des plantes +S.

En comparant les résultats des 2 années, on observe que les organes de réserve et surtout les tissus photosynthétisants accusent des activités arginasiques très supérieures en 1966 à celles observées en 1965. De plus, on observe en présence de l'activateur moins de différence entre les activités des plantes +S et - S. Pourtant l'écart entre les plantes +S et - S prélevées en 1965, du point de vue de la croissance, a été moins important qu'en 1966, ainsi que cela a été signalé plus haut (p. 87). Ceci pourrait être considéré comme une confirmation de l'observation notée ci-dessus (p. 89) à savoir que l'activateur agit davantage, relativement, sur les plantes - S que sur les +S.

TABLEAU XXX  
VALEURS ARGINASQUES (MALÉATE + Cl<sub>2</sub>Mn). (1966)

STADE	ORGANES VÉGÉTAUX							
	Cotylédons		Folioles		Tiges principales +pétioles		Tiges latérales +feuilles	
PLANTES SUR H <sub>2</sub> O								
2-3 feuilles. ....	46,3		27,3		15,7			
PLANTES SUR SOLUTIONS NUTRITIVES +S ET -S								
	+S	-S	+S	-S	+S	-S	+S	-S
6-7 feuilles ....	19,6	18,1	10,4	4,6	3,9	1,8	9,9	3,3
Début de flo- raison .....	—		3,9	2,0	2,2	0,3	4,8	2,4
Formation des gousses .....	—		0,6	trace	1,3	0,1	0,8	0,6

#### D. ACTIVITÉ ARGANISIQUE DANS LES ORGANES REPRODUCTEURS.

Nous avons repris, sur des cultures effectuées en 1967, la recherche de l'activité arginasique des organes reproducteurs, mesurée en milieu réactionnel « maléate + Cl<sub>2</sub>Mn ».

##### Échantillonnage

Les échantillons des fleurs ont été confectionnés en récoltant une partie des fleurs fraîches formées tous les jours et pendant toute la durée de la floraison. Les fleurs ont été congelées puis lyophilisées tous les jours immédiatement après la récolte. Après la floraison, on a réuni toutes les fleurs récoltées en 2 échantillons : 1 +S, 1 -S. La suite des opérations a été celle même employée dans les autres cas.

Les gynophores et les gousses ont été récoltés au stade de la formation des gousses. Les graines, au stade de la maturité laiteuse.

##### RÉSULTATS (tableau XXXI)

On voit donc peu de différences entre les valeurs arginasiques des organes en formation des plantes +S et -S, tels que fleurs et gousses. Les gynophores étant prélevés au stade de la formation des gousses et non pas au stade de formation des gynophores, les valeurs arginasiques pour les déficients en soufre sont inférieures à celles des gynophores +S. Quant aux graines récoltées à la maturité laiteuse, c'est l'inverse. Les valeurs arginasiques des graines -S sont très supérieures à celles des graines +S. Les graines -S étant de beaucoup plus jeunes que les graines +S.

De ces résultats, ainsi que des résultats des années précédentes concernant les organes reproducteurs, on peut déduire qu'ils présentent à leur apparition des valeurs arginasiques élevées. Les fleurs en particulier se montrent très actives. Au début de la

floraison et pendant toute la durée de la floraison, leur activité est nettement supérieure à celle de tous les autres organes, y compris les cotylédons au début de la floraison. De même, au moment de la formation des gynophores, des gousses ou des graines, ceux-ci se révèlent plus actifs que les organes végétatifs déjà vieillissants.

A mesure que les organes reproducteurs eux-mêmes vieillissent, leur activité arginasique diminue pour apparaître dans les nouveaux organes successifs.

Au moment de la formation des organes reproducteurs, il n'y a pas de différence d'activité arginasique entre organes provenant des plantes +S et — S.

TABLEAU XXXI  
VALEURS ARGINASQUES DES ORGANES REPRODUCTEURS. (1967)

ORGANES	STADES	+S	—S
Flours	Récoltées tout au long de la floraison	23,7	21,1
Gynophores	Formation des gousses	6,4	2,5
Gousses	Formation des gousses	4,4	3,9
Graines	Maturité laiteuse	5,6	9,3

#### E. ÉVOLUTION DE L'ACTIVITÉ ARGINASIQUE DES GRAINES D'ARACHIDE AU COURS DE LA GERMINATION.

Jusqu'à présent, nous nous sommes occupés de l'activité arginasique des plantes au cours de la végétation.

Les graines d'arachide en milieu phosphate sans activateur n'avaient pas manifesté la présence de l'arginase. Les cotylédons, au stade auquel nous avons commencé l'étude, c'est-à-dire au stade de 2 feuilles non étalées, ont déjà été très actifs.

Une étude de l'activité arginasique au cours de la germination des graines s'imposait afin de préciser les valeurs arginasiques aux stades intermédiaires, entre la graine inactive et les cotylédons déjà très actifs après quelques jours de germination.

##### *Préparation du matériel enzymatique*

On a fait germer des graines d'arachide 28-204 dans du sable humide à la température de 27° C à l'obscurité. Des lots de matériel végétal ont été prélevés après 0, 6, 24, 46, 72 et 96 heures.

L'activité arginasique a été déterminée par la méthode habituelle, sur les plantules entières, dans des tampons glycinate et maléate additionnés des ions Mn<sup>++</sup>.

D'autres lots de matériel végétal ont été introduits dans l'enceinte froide à la température de — 20° C et fractionnés en cotylédons d'une part et axes embryonnaires ou jeunes pousses d'autre part, puis traités de la même manière que les lots précédents.

Pour avoir un point de comparaison on a également fait germer des graines dans du sable humide à la serre à la lumière du jour et à température ambiante.

Les déterminations de l'activité arginasique dans le matériel végétal fractionné ont été effectuées uniquement dans le milieu réactionnel au maléate additionné de  $\text{Cl}_2\text{Mn}$ .

### RÉSULTATS

Le tableau XXXII montre qu'il est déjà possible de déceler, selon les conditions utilisées, un début d'activité enzymatique dans les graines non germées. Cette présence d'arginase est parfaitement évaluable en milieu maléate additionné des ions  $\text{Mn}^{++}$ . Les valeurs arginasiques augmentent de plus en plus vite à mesure que la germination se poursuit.

TABLEAU XXXII  
VALEURS ARGINASIQUES DES GRAINES D'ARACHIDE EN GERMINATION

Temps de germination en heures		0	6	24	46	72	96
Tampons	Glycinate + $\text{Cl}_2\text{Mn}$	Traces +	Traces ++	Traces +++	0,5	1,8	
	Maléate + $\text{Cl}_2\text{Mn}$	0,1			1,1	2,1	9,5

Le tableau XXXIII illustre les résultats obtenus pour les deux fractions des graines en germination prises séparément : cotylédons et axes embryonnaires.

On constate ainsi que lors de la mobilisation des réserves de la graine, au début de la germination, les valeurs arginasiques augmentent très rapidement dans les deux fractions. Elles augmentent toutefois beaucoup plus rapidement dans les cotylédons que dans l'axe embryonnaire. Au début, l'activité arginasique de ce dernier est beaucoup plus importante que celle des cotylédons. Puis la différence s'atténue et enfin s'inverse au profit des cotylédons. La mobilisation des réserves commence par l'axe embryonnaire dans lequel il y a toujours de l'arginine libre. Puis seulement vient la mobilisation des protéines cotylédonaire. On observe donc dans les cotylédons un lent réveil de l'activité arginasique, laquelle s'intensifie très rapidement ; par la suite, elle continue à croître quoique plus lentement. Si l'on se rapporte au tableau relatif à l'évolution des valeurs arginasiques au cours de la végétation des plantes (Tableau XXIV, p. 85), on voit que la croissance de l'activité enzymatique dans les cotylédons se poursuit jusqu'au stade de 2-3 feuilles, puis décroît.

Quant aux jeunes pousses, les valeurs arginasiques considérablement augmentées au début, commencent à décroître déjà après le 4<sup>m</sup>e jour de la germination. Si l'on se rapporte aux colonnes relatives à l'urée formée par l'enzyme à partir du substrat, on s'aperçoit que l'arginase est encore très active, et que dans l'ensemble, son activité continue à augmenter. Il y a là un phénomène de dilution de l'enzyme dans les tissus en croissance active. Il y a aussi en même temps différenciation des organes qui n'ont pas les mêmes valeurs arginasiques. En déterminant les valeurs arginasiques des jeunes pousses on a obtenu des valeurs moyennes. Il serait probablement intéressant d'étudier le comportement de l'arginase à ces très jeunes stades séparément dans les organes différenciés de la jeune pousse.

TABLEAU XXXIII  
GERMINATION DE L'ARACHIDE A L'OBSCURITÉ

Organes	Temps de germination	Longueur de la racine + hypocotyle en cm	Poids en mg de m.s. par organe	Poids en mg de m.s. d'une plantule	% m.s. de chaque fraction	Valeurs arginasiques	Urée formée en mg % de la plantule	Urée formée en mg par organe	Urée en mg dans la plantule entière
Pousses.....	2 jours	Léger poin- tage sur la graine	15,14		3,51	4,8		0,26	
Cotylédons.....	2 jours		416,98	432,12	96,49	1,0	0,41	1,52	1,78
Pousses.....	4 jours	3,0	29,57	400,54	7,39	30,8	7,89	3,28	31,60
Cotylédons.....	4 jours		370,97		92,61	21,2		28,32	
Pousses.....	6 jours	4,7	43,53	397,03	10,96	28,8	12,85	4,51	51,02
Cotylédons.....	6 jours		353,50		89,04	36,5		46,50	
Pousses.....	7 jours	8,4	89,61	405,30	22,11	26,2	13,49	8,44	54,66
Cotylédons.....	7 jours		315,69		77,89	40,7		46,23	
GERMINATION DE L'ARACHIDE A LA LUMIÈRE									
Pousses.....	5 jours	1,9	20,94	373,66	5,61	32,8	8,53	2,47	31,86
Cotylédons.....	5 jours		352,72		94,39	23,1		29,39	
Pousses.....	6 jours	5,2	46,77	390,16	11,98	32,2	12,38	5,42	48,30
Cotylédons.....	6 jours		343,39		88,02	34,7		42,88	

Les graphiques 25 et 26 illustrent d'une autre façon les phénomènes observés. On y suit la valeur arginasique et l'urée formées dans les deux fractions des graines en germination, en fonction du poids de la pousse.

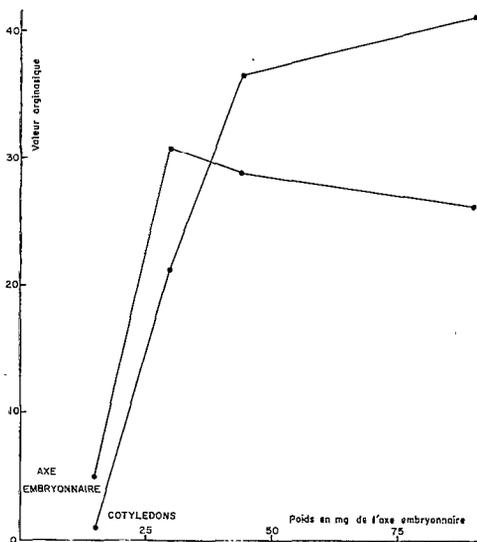


Fig. 25. — Valeur arginasique au cours de la germination.

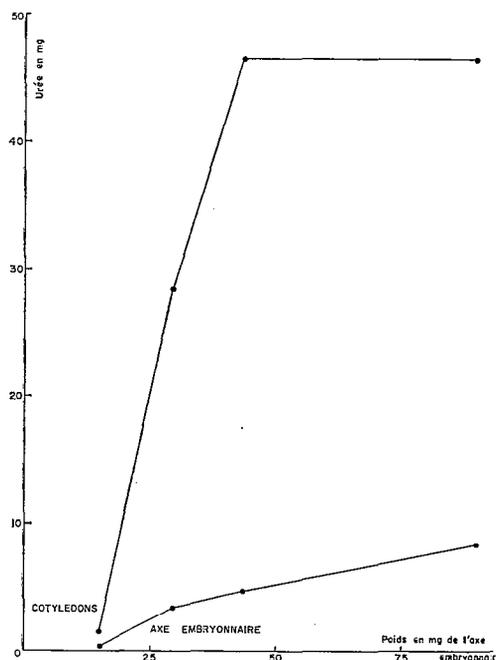


Fig. 26. — Activité arginasique au cours de la germination exprimée en mg d'urée par organe.

#### F. ACTIVITÉ ARGINASIQUE A pH 7,0.

Les travaux sur l'activité arginasique sont généralement effectués en milieu à pH aux environs de 9,5. Nos études ont été également effectuées à pH = 9,5. Nous avons pu constater lors des essais préliminaires que ce pH était le plus favorable pour l'hydrolyse en une heure du substrat. A pH = 7 on n'a pas observé de dégradation de l'arginine. Comment la dégradation enzymatique s'opère-t-elle donc dans la cellule intacte ? On pouvait supposer qu'*in vivo* le processus d'hydrolyse enzymatique s'opère beaucoup plus lentement.

Pour vérifier cette hypothèse et répondre à la question on a effectué l'expérience suivante : plusieurs échantillons ont été mis en incubation avec de l'arginine dans un tampon maléate additionné des ions  $Mn^{++}$ . Température = 43° C, pH final = 7,0. La dégradation enzymatique a été suivie chez les cotylédons par chromatographie unidimensionnelle sur couche mince de cellulose. De temps en temps on déposait une goutte sur la ligne de départ.

#### RÉSULTATS ET DISCUSSION

Après 7 heures d'incubation, on ne voit pas encore sur les chromatogrammes (Fig. 27) apparaître la tache d'ornithine provenant de la dégradation de l'arginine.

Parallèlement, l'activité arginasique a été déterminée dans cette expérience par la méthode habituelle. On a pu constater une fois de plus, qu'après 1 heure d'incubation

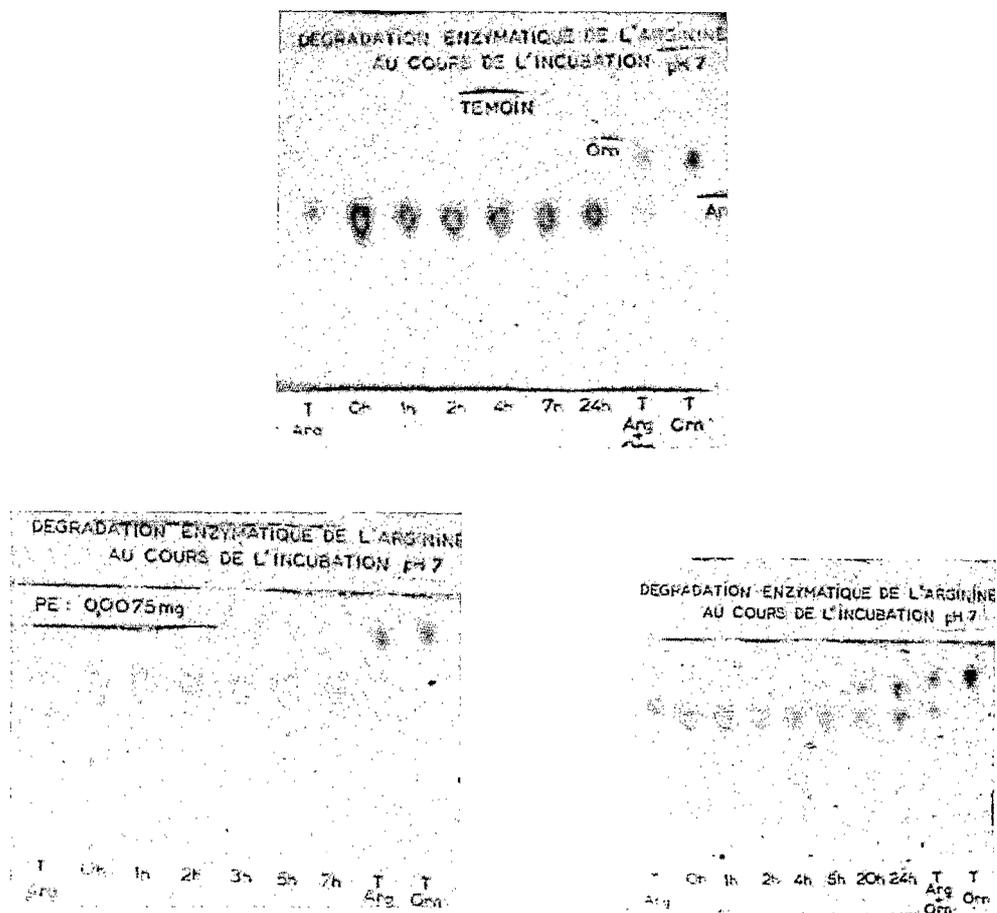


Fig. 27. — Cotylédons de l'arachide après 4 jours de germination. Chromatographie en couche mince.

à pH 7,0 on ne pouvait pas déceler d'activité enzymatique. Par contre, après 24 heures d'incubation à pH 7,0 on a enregistré une activité arginase (tableau XXXIV). Ce qui, nous semble-t-il, répond à la question posée plus haut.

TABLEAU XXXIV  
ACTIVITÉ ARGINASE A pH 7,0 — 24 H. D'INCUBATION

ORGANES	STADES	RÉGIME NUTRITIONNEL DES PLANTES		
		H <sub>2</sub> O	+S	-S
Cotylédons	2 feuilles	49,16		
Cotylédons	6 feuilles		6,46	9,62
Folioles	6 feuilles		0,78	—
Tiges principales + pétioles	6 feuilles		traces	traces

L'activité des cotylédons au stade de 2 feuilles est pratiquement identique après 1 heure à pH 9,5 à celle obtenue après 24 heures d'incubation à pH 7,0 ; elle est comparable chez les cotylédons au stade de 6 feuilles ; elle est très différente chez les autres organes analysés.

Il est évident que les conditions d'incubation élaborées pour la détermination de l'activité arginasique (température, concentration du substrat et de l'enzyme) ne peuvent pas être valablement extrapolées à une autre réaction du milieu. La dégradation de l'arginine ne suit l'équation théorique caractéristique d'un processus enzymatique monomoléculaire qu'au début de l'incubation. Après cette étape initiale on observe une inhibition. Cette inhibition est habituellement expliquée par l'action compétitive de l'un des produits de la réaction, à savoir l'ornithine.

Dans ce contexte il est intéressant de souligner la différence de comportement des organes de réserves en comparaison avec les tissus chlorophylliens. Elle ne peut pas être expliquée uniquement par l'action inhibitrice de l'ornithine.

REIFER et coll. [157] [156] [137] ont mis en évidence, dans les graines de tournesol, un inhibiteur très actif de l'arginase. Ils l'ont isolé, purifié et étudié quelques unes de ses propriétés. Ainsi, ils ont constaté que l'activité de cet inhibiteur consiste en sa liaison avec l'enzyme. La L-cystéine, le mercaptoéthanol et le glutathion réactivent l'arginase inactivée par l'inhibiteur. C'est un composé à poids moléculaire peu élevé qui est stable en milieu acide, moins stable en milieu neutre et qui est détruit en milieu alcalin.

S'il était prouvé que cet inhibiteur est présent chez d'autres végétaux dont l'arachide ceci pourrait être une explication de l'activité de l'arginase se manifestant *in vitro* surtout à pH alcalin, de son action lente en milieu neutre. Mais il ne nous paraît pas possible d'expliquer la différence de comportement entre les cotylédons et les feuilles et les tiges par l'absence de l'inhibiteur.

Cette différence de comportement nous paraît suggérer que l'on a peut-être affaire à des arginases diverses présentant des différences moléculaires.

BARET et MOURGUE [8], lors d'une étude sur *Canavalia ensiformis*, et constatant des différences de comportement des arginases d'origines diverses, se demandent si les protéines enzymatiques en question sont identiques. CAMPBELL [30], à la suite d'une étude comparative entre mollusques et mammifères arrive à distinguer deux protéines. La proarginase inactive passant sous l'action du  $Mn^{++}$  à l'arginase. MORA et coll. [134] [135] constatent que les arginases présentes dans le foie d'animaux uréotiles et uricotéliques sont des protéines différentes. De même, l'arginase de *Neurospora crassa*, hydrolysant de préférence l'arginine exogène, s'avère incapable d'hydrolyser l'arginine endogène. D'après RAGHUPATHI RAMI REDDY et CAMPBELL [151], le poids moléculaire des arginases d'origines diverses peuvent varier entre de très larges limites s'échelonnant de 244.000 à 27.000. MIDDELHOVEN [131], travaillant sur *Sacharomyces cerevisiae*, écrit que la dégradation de l'arginine nécessite deux enzymes : l'arginase et l'ornithine-transaminase. Les deux étant induits par l'arginine.

A la lumière de ce qui précède il serait intéressant d'effectuer des recherches sur la nature exacte de l'arginase dans les organes d'arachide (cotylédons et axes embryonnaires), son rapport avec l'inhibiteur naturel et les conditions optima de son action à pH 7,0.

### G. ACTIVITÉ URÉASIQUE.

Les études que nous avons effectuées sur l'arginase nous ont naturellement amenés à rechercher l'uréase. Depuis que MUSCULUS a découvert [142] en 1876 l'uréase dans les cellules bactériennes, elle a été signalée dans nombre de végétaux.

Selon certains auteurs [187] l'uréase est très répandue dans le règne végétal. DAMODARAN et SIVARAMAKRISHNAN [47] ont montré la présence de l'uréase chez beaucoup de légumineuses. WILLIAMS et SHARMA [196] démontrent que son activité chez *Citrullus vulgaris* se maintient dans les plantules vertes jusqu'au 9<sup>me</sup> jour de germination et dans les plantules étiolées jusqu'au 13<sup>me</sup> jour. Ils supposent que l'activité uréasique dans les jeunes plantules se maintient le plus longtemps dans les tissus lesquels ne sont pas le siège d'une activité métabolique intense. Dans les tissus en croissance active, l'activité tombe rapidement. La présence d'une uréase active jusqu'au 13<sup>e</sup> jour dans les plantules étiolées est expliquée par un retard dans le développement de ces plantules par rapport aux plantules vertes.

Plus récemment GUITTON a constaté la présence de cet enzyme dans les graines imbibées de *Pinus pinea* [82] et GOAS dans les plantules de pois [78].

Les auteurs distinguent des plantes à uréase de plantes sans uréase. Il importait donc de savoir si notre arachide appartient aux plantes à uréase ou non. En effet, si activité uréasique il y avait, elle pourrait être la cause d'une activité arginasique apparente réduite. L'activité arginasique déterminée ne serait que la résultante d'un travail de deux enzymes, arginase et uréase. Bien que les maxima d'activité de ces deux enzymes ne se situent pas dans les mêmes conditions, l'activité de l'uréase pourrait masquer l'activité arginasique réelle. Elle pourrait également être, dans une certaine mesure, responsable de la réduction de l'activité arginasique avec l'âge de la plante ou lors de l'induction de la déficience en soufre.

La présence de l'uréase pourrait aussi expliquer le mécanisme argininolytique dans la cellule vivante (l'absence d'urée, activité arginasique non décelable par dosage de l'urée à pH acide).

Pour ces raisons nous avons recherché l'activité uréasique dans les graines germées d'arachide, dans les cotylédons au stade de 2 feuilles, dans les racines et les parties aériennes de l'arachide +S et — S au stade de la floraison.

Dans cette étude nous avons commencé par employer le tampon CLARK et LUBS pour nous trouver dans des conditions du milieu comparables à celui de la recherche de l'arginase. N'ayant pas décelé d'activité uréasique nous avons, par la suite, employé le tampon Tris. En effet, selon certains auteurs, les ions Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> inactivent l'uréase [189].

Pour chaque prise de matériel végétal on a effectué une détermination parallèle en ajoutant à la poudre végétale de l'urée.

### RÉSULTATS

Les résultats réunis dans le tableau XXXV montrent que la poudre végétale ne manifeste pas d'activité uréasique. Dans tous les cas on a retrouvé l'urée ajoutée.

TABLEAU XXXV  
ACTIVITÉ URÉASIQUE

ORGANE végétal	STADE du développement	CULTURE	MILIEUX RÉACTIONNELS			URÉE trouvée en mg de la solution primitive
			Tampons	Matériel végétal	Solution d'urée en mg	
Graines germées	72 h de germination	sur eau	Clark et Lubs	150 mg	0	0
			Clark et Lubs	150 mg	5	5
			Tris	150 mg	0	0
			Tris	150 mg	5	4,98
Témoins			Clark et Lubs	0	5	4,99
			Tris	0	5	4,96
Coty-lédons	2 feuilles	sur eau	Tris	150 mg	0	0
			Tris	150 mg	5	4,87
Témoin			Tris	0	5	4,90
Racines	Début de la floraison	+S	Tris	150 mg	0	0
		+S	Tris	150 mg	5	5,03
		-S	Tris	150 mg	0	0
		-S	Tris	150 mg	5	4,92
Tiges latérales + feuilles		-S	Tris	150 mg	0	0
		-S	Tris	150 mg	5	4,90
		+S	Tris	150 mg	0	0
		+S	Tris	150 mg	5	4,93
Témoin			Tris	0	5	4,84

## CONCLUSIONS

1) *Graines*

— On décèle dans les graines mêmes d'arachide, à condition de choisir un milieu réactionnel convenable et en présence d'un activateur, une très faible activité arginasique.

— Au cours de la germination, l'activité arginasique augmente très rapidement. Elle est particulièrement rapide entre 72 et 96 heures de germination.

— L'activité arginasique des cotylédons augmente, bien que plus lentement, jusqu'au stade de 2-3 feuilles, puis diminue. Le palier est atteint le 6<sup>me</sup> jour de germination, si on évalue l'arginase par rapport à l'organe ; ce 6<sup>e</sup> jour correspond normalement à l'apparition à la surface du sol, de la partie verte. On peut donc dire que l'arginase augmente dans l'organe de réserve au cours de la vie autotrophe et commence à diminuer avec la vie hétérotrophe de la plante.

On dirait qu'il y a là une activité enzymatique induite par le substrat et, en tout cas, allant de pair avec la mobilisation des réserves protéiques indispensables à la croissance et à la multiplication cellulaire de la jeune pousse réclamant des matériaux simples pour son édification.

— Dans la jeune pousse l'activité arginasique augmente également très vite au début de la germination, bien que moins vite que chez les organes de réserves. Mais déjà après le 4<sup>e</sup> jour de germination elle commence à baisser. Toutefois ici aussi, par rapport à l'unité de la pousse, l'activité de l'enzyme continue à augmenter.

On a envie de dire qu'il y a là un autre genre d'activité arginasique, celle qui est liée directement au caractère juvénile des tissus en pleine croissance, à la vitesse de divisions cellulaires, à la grande activité métabolique.

— Si les graines en formation sont très actives, les graines mûres présentent une très faible activité arginasique. Il est possible que les sites actifs de l'enzyme se trouvent bloqués, peut-être par un mécanisme de type allostérique.

Le cycle recommence avec le départ de la germination.

— Il serait intéressant d'étudier l'activité arginasique d'une part, de différentes fractions de la jeune pousse au cours de la germination et d'autre part, des graines au cours de la maturation, ainsi que l(es) inhibiteur(s) de l'arginase au cours de la germination et de la maturation des graines.

2) *Évolution de l'arginase au cours de la végétation*

— Les valeurs arginasiques sont les plus élevées dans les organes de la plante au jeune stade de la croissance. Les plus riches sont alors les folioles et les cotylédons.

— Au cours de la croissance de la plante, l'activité arginasique diminue dans tous les organes.

— Dans les organes reproducteurs pendant leur formation, l'activité arginasique est la plus élevée de tous les organes.

— Chez les organes des plantes — S, l'activité arginasique se trouve réduite d'une manière très significative par rapport aux organes des plantes +S, sauf dans les cotylédons — S où les réserves protéiques sont moins épuisées.

— Il n'y a pas de différence marquante entre l'activité arginasique des organes reproducteurs au moment de leur formation chez les plantes +S et — S.

### 3) Réactivation de l'arginase

— Un apport d'activateurs, dans les milieux réactionnels, augmente l'activité arginasique des poudres végétales. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une partie de l'arginase se trouve dans la plante sous une forme moins active.

— Il semble que les folioles contiennent proportionnellement plus d'arginase inhibée et donc réactivable par les activateurs que les autres organes de la plante. Mais ceci demande à être confirmé.

— Les organes des plantes — S contiennent relativement plus d'arginase inhibée que ceux des plantes +S.

— Étant donné la différence entre la réactivation du matériel végétal provenant des plantes +S et — S, il semble que l'activité arginasique réduite chez les plantes — S est liée, au moins en partie, à une inhibition de l'enzyme.

### 4) Importance du tampon

L'influence du milieu (tampon) fait penser à une action inhibitrice (maléate) ou activatrice (CLARK et LUBS) de certains composants du tampon.

Ceci expliquerait les réactivations très importantes rapportées par les auteurs travaillant dans le milieu maléate.

Avec le milieu CLARK et LUBS nous n'avons jamais enregistré des réactivations aussi importantes.

### 5) Activité arginasique à pH 7,0

— A ce pH on a enregistré une activité arginasique mais qui ne se manifeste qu'après un temps d'incubation très long.

— Si dans les cotylédons après 24 heures d'incubation à pH 7 on arrive à obtenir les mêmes valeurs arginasiques qu'à pH 9,5 après 1 heure d'incubation, il n'en est pas de même pour les folioles. Ceci fait penser à la possibilité de l'existence d'arginases de caractères différents dans ces deux organes.

### 6) Activité uréasique

— On n'a pas décelé d'activité uréasique chez l'arachide.

## *DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES*

La déficience en soufre conduit chez l'arachide, tout comme chez d'autres espèces, à un profond remaniement de la fraction azotée.

Une importante augmentation de l'azote soluble s'observe dans tous les organes — S et plus particulièrement dans les organes de transport.

En ce qui concerne les composés azotés organiques, la réponse des végétaux à la déficience en soufre varie selon l'espèce. Dans le cas de l'arachide on constate une accumulation de l'arginine et une baisse de l'azote protéique.

Il est évident que le manque de soufre se traduit par un manque d'acides aminés soufrés nécessaire pour la protéosynthèse.

Il est certain que l'azote soluble augmente à la suite du blocage de la protéosynthèse. Toutefois, ainsi que nous avons pu le constater, l'augmentation de la teneur en composés azotés solubles dépasse de beaucoup la réduction des taux des protéines. De plus, ce seul phénomène ne permet pas d'expliquer l'accumulation particulièrement importante de l'arginine libre. Le blocage de la protéosynthèse devrait laisser à l'état libre toute la gamme d'acides aminés constitutifs des protéines. C'est effectivement ce que nous avons pu constater lors de notre étude de la composition de la fraction des acides aminés libres par la méthode de la chromatographie sur colonnes. On a trouvé chez les feuilles — S toute une série d'acides aminés en quantité plus élevée que chez les feuilles +S. Cependant la quantité d'arginine présente dans la réserve d'acides aminés solubles dépasse de très loin celle des autres ; ceci malgré son incorporation dans les protéines en proportion plus importante.

Qu'elle est donc la raison de l'accumulation préférentielle de l'arginine ? C'est ainsi que le problème de la fonction et de la place de ce composé dans le métabolisme de l'arachide se trouve être posé.

Il est généralement admis que les deux amides (glutamine et asparagine) jouent le rôle de capteurs d'ammoniac chez les végétaux et désintoxiquent ainsi les plantes d'un excès de cette substance. On peut donc admettre que le rôle des amides chez les espèces qui les accumulent sous l'influence de la déficience en soufre est d'emmagasiner l'excès d'ammoniac. Dans le même ordre d'idées, il paraît plausible d'étendre ce rôle des amides, dans le cas d'autres plantes, à l'arginine-composé riche en azote — qui emmagasinerait l'excès d'azote ammoniacal chez l'arachide.

En ce qui concerne la fonction de l'arginine dans le métabolisme cellulaire, c'est un fait bien établi que cet acide aminé, outre qu'il est un élément structural essentiel des protéines, sert comme transporteur de phosphate hautement énergétique chez certains invertébrés [130].

Jusqu'ici la phospho-arginine n'a pas été, à notre connaissance, isolée du matériel végétal ; toutefois BONNER [12] [13] a apporté une preuve indirecte certaine du rôle de l'arginine en tant que facteur de renouvellement (turn-over) de l'énergie chez les végétaux supérieurs. Cette idée a été par la suite confirmée par le fait que l'arginine peut servir d'accepteur final du phosphate dans un système où l' $\alpha$ -cétoglutarate représente le substrat, les mitochondries des hypocotyles de haricot fournissent l'enzyme et l'adénosine -5- phosphate fonctionne comme accepteur initial de phosphate [176]. D'un autre côté, les chercheurs qui ont étudié l'occurrence du phosphore organique chez les végétaux supérieurs, n'ont pas, à notre connaissance, signalé la présence d'autres composés que les phospholipides, les nucléotides et la phytine [2] [3] [193].

FRIES [72], dans une étude sur les facteurs chimiques qui contrôlent la croissance des pois privés de leurs cotylédons, trouve que les pois nourris d'arginine contiennent plus de phosphate acide soluble que les plantes témoins sans apport d'arginine. L'auteur se demande si ce fait ne pourrait pas être considéré comme une preuve évidente de la présence de phosphoarginine dans le premier cas.

Or, nous avons cherché à déterminer l'influence de la déficience en soufre sur les teneurs en phosphore de l'arachide.

Dans le tableau XXXVI nous avons réuni à titre d'exemple quelques résultats caractéristiques de ces dosages.

TABLEAU XXXVI  
INFLUENCE DE LA DÉFICIENCE EN SOUFRE SUR LA TENEUR EN PHOSPHORE TOTAL  
(EN % M.S.)

STADE DU DÉVELOPPEMENT	ORGANES VÉGÉTAUX	
	FOLIOLES	
PLANTES SUR H <sub>2</sub> O		
3 feuilles.....	0,526	
PLANTES SUR SOLUTIONS NUTRITIVES +S ET -S		
	+S	-S
6 feuilles.....	0,519	0,569
Floraison.....	0,522	0,631
Formation des gous- ses.....	0,307	0,713

On constate que dans les folioles -S il y a accumulation du phosphore au cours de la croissance contrairement à ce qui se passe chez les folioles +S. Si bien qu'au stade de formation des gousses les folioles -S ont une teneur en phosphore 2,2 fois plus élevée que les folioles +S à ce stade.

Ainsi donc, les tendances à l'accumulation de l'arginine est suivie par une même tendance à l'accumulation du phosphore.

Ceci pourrait témoigner en faveur de la présence de la phosphoarginine laquelle s'accumule dans les folioles —S.

Notons à ce propos qu'au VII<sup>e</sup> Congrès International de Biochimie qui s'est tenu à Tokyo fin août 1967 un Colloque a été consacré aux acides aminés phosphorés dont il s'avère qu'ils représentent des constituants constants de nombreux microorganismes et de certains tissus d'animaux supérieurs.

Quant à la place possible de l'arginine libre dans la physiologie de l'arachide il ne semble pas que le cycle de KREBS-HENSELEIT se manifeste chez cette espèce surtout au stade avancé de la croissance. Nous avons hasardé une hypothèse suivant laquelle, dans la mesure où il est correct de parler de produit final, ce serait l'arginine qui en serait un.

Cette hypothèse était basée d'une part sur les résultats de nos expériences sur le devenir de l'arginine -<sup>14</sup>C-5 et d'autre part sur un certain nombre de faits bibliographiques.

A l'appui de cette hypothèse, il nous paraît indiqué de rappeler ici nos études sur l'évolution de l'arginine au cours de la croissance de l'arachide (p. 51 « L'arginine »).

En effet, on observe l'apparition massive de cet acide aminé à un très jeune stade lors de la germination des graines et de l'hydrolyse des protéines de réserve. Ensuite, s'il diminue chez les plantes +S en pourcentage de la matière sèche, il augmente toutefois régulièrement et d'une façon très importante en quantité par plante, en constituant une réserve azotée très appréciable. Ce composé joue un rôle très important lors de la formation des organes reproducteurs — gynophores et graines. Il est donc possible et vraisemblable que cet acide aminé exerce une fonction dans le développement de la plante d'arachide et dans l'organogénèse.

Ceci pourrait expliquer son accumulation considérable dans l'arachide déficiente en soufre, accumulation tant par rapport à la matière sèche qu'en quantité par organes. Il semblerait qu'à la déficience de l'arachide en soufre un autre phénomène se superpose, à savoir sa forte teneur en arginine laquelle, en fin de compte intoxiquerait la plante. Ce pourrait être son action régulatrice de la croissance et du développement qui s'exerce ici. Encore faudrait-il prouver qu'une alimentation de la plante par de fortes quantités d'arginine exogène provoque des symptômes comparables à ceux notés dans le cas de la déficience en soufre.

A ce propos on peut citer un travail de RATNER et coll. [152]. Dans les expériences sur l'assimilation des acides aminés par les racines isolées de luzerne, ces auteurs démontrent que 7 sur 13 acides aminés inhibent leur croissance.

La L-asparagine, la L-glutamine, l'acide L-aspartique, la L-arginine, la DL-ornithine et la DL-citrulline agissent positivement tant sur la croissance des racines que sur la synthèse des protéines.

Ceux des acides aminés qui inhibent la croissance des racines et la synthèse des protéines s'accumulent dans les racines sous forme inchangée.

Par conséquent, les acides aminés du cycle de l'ornithine, dont l'arginine, sont un facteur de croissance des racines et de la synthèse des protéines.

D'autre part, la déficience en soufre et l'accumulation de l'arginine libre qui en résulte se traduisent également par une inhibition de la croissance et de la protéosynthèse.

Ne pourrait-on pas comparer l'arginine s'accumulant dans les plantes —S aux

acides aminés qui inhibent la croissance des racines et la synthèse des protéines dans les expériences de RATNER et coll. ?

Dans une étude sur l'arginine comme facteur de croissance chez les chlorelles, ARNOW et coll. [6] ont déjà supposé qu'il en serait de même dans le cas des végétaux supérieurs.

Il est possible qu'au stade jeune et dans les jeunes organes de l'arachide, l'arginine soit inductrice d'arginase et qu'à partir d'une certaine concentration elle s'oppose à l'activité arginasique et que la concentration en arginine contrôle tout le complexe enzymatique impliqué à différents niveaux des transformations.

MAAS [123], étudiant la formation des enzymes participant à la biosynthèse de l'arginine chez *Escherichia coli*, constate que cet acide aminé est capable d'inhiber la formation de ces enzymes.

Citons également un travail de PRINGSHEIM [150] constatant que l'absence de systèmes de transport enzymatiques peut être la cause d'un empoisonnement des plantes par les mêmes substances organiques qui assurent la croissance d'autres organismes.

Comparons à présent les variations observées de l'activité arginasique avec celles de l'arginine libre chez les mêmes cultures d'arachide. On constate que l'évolution de l'activité arginasique au cours de la croissance des plantes non déficientes en soufre montre la même tendance que celle de l'arginine libre. Les organes jeunes sont les plus riches en arginine et présentent les valeurs arginasiques les plus élevées. Par la suite, à mesure que les organes vieillissent, leurs teneurs en arginine diminuent et leur activité devient de plus en plus faible.

Il n'en est pas de même pour les plantes —S. Alors que l'activité arginasique, déjà réduite par la carence, baisse rapidement au cours de la croissance et finit par disparaître complètement, les teneurs en arginine libre augmentent considérablement. Il y a tout lieu de penser que cette chute de l'activité de l'enzyme est, du moins en partie, responsable de l'accumulation marquée de l'arginine libre dans les organes des plantes carencées en soufre.

A la lumière de ce qui précède il se dégage une image d'ensemble qui nous paraît assez cohérente.

L'accumulation de l'arginine libre dans les plantes déficientes en soufre est la résultante de toute une série de facteurs dont nous avons étudié quelques-uns.

Dans un premier temps la déficience en soufre entraîne un manque d'acides aminés soufrés. Ceci a pour conséquence de freiner la protéogénèse en général et l'arginase en particulier. De ce fait trois facteurs contribuent à l'accumulation de l'arginine libre : 1) une activité arginasique réduite ; 2) un freinage de la protéosynthèse laissant à l'état libre toute une série d'acides aminés dont l'arginine ; 3) formation de l'arginine libre aux dépens d'autres acides aminés et de l'ammoniac. L'arginine joue ici le rôle que les amides jouent pour d'autres espèces, à savoir celui de magasin de réserve d'azote.

Dans un deuxième temps, l'accumulation de l'arginine atteignant des proportions de plus en plus importantes, un autre phénomène se grefferait sur les précédents : au stade plus avancé de la croissance, l'activité arginasique diminue dans les organes végétatifs pour apparaître dans les organes reproducteurs. L'arginine libre dans les organes végétatifs sert plutôt à la biosynthèse des protéines. Elle semble également jouer un rôle régulateur dans le développement de la plante et en particulier dans l'organogénèse.

La quantité d'arginine libre accumulée par les plantes —S est telle que l'on se demande si ces dernières n'en sont pas en fin de compte intoxiquées.

A ce moment-là on observe une incorporation anormale de l'arginine dans les protéines des plantes déficientes en soufre. Le mécanisme du phénomène est inconnu. S'agit-il d'une incorporation de l'arginine à la place des acides aminés soufrés faisant défaut ? Peut-être se trouve-t-on devant une production anormale d'histone — protéine riche en arginine — sous l'influence de la déficience en soufre et de l'arginine libre accumulée ?

Les considérations ci-dessus nous permettent de dégager un certain nombre de questions qui demandent à être étudiées et à l'élucidation desquelles nous aimerions pouvoir apporter une contribution dans l'avenir. Ce sont :

- 1) Le rôle régulateur de l'arginine chez l'arachide ;
- 2) Le cycle de KREBS-HENSELEIT est-il spécifique de l'âge juvénile de la plante ;
- 3) Voies et mécanisme d'incorporation de l'arginine dans les protéines des plantes —S.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] ADLER E., DAS N. B., EULER H. V., HEYMAN U. — Compt. Rend. Trav. lab., Carlsberg 22, 15 (1938).
- [2] ALBAUM H. G., OGUR M. — Arch. Biochem. 15, 158 (1947).
- [3] ALBAUM H. G., OGUR M., HIRSCHELD A. — *Ibid.* 27, 130 (1950).
- [4] ALLAWAY W. H., THOMPSON J. F. — Soil Sci. 101, 4, 240 (1966).
- [5] ANDERSON A. B. — BIOCHEM. J. 39, 139 (1945).
- [6] ARNOW P., OLESON J. J., WILLIAMS J. H. — Amer. Journ. Bot. 40, 100 (1953).
- [7] BALDY P., GUITTON Y. — C. R. Acad. Sci. 254, 911 (1962).
- [8] BARET R., MOURGUE M. — C. R. Soc. Biol. T. CLIV, 4, 742 (1960).
- [9] BARNES R. L. — Forest Sci. 8, 284 (1962).
- [10] BARNES R. L., NAYLOR A. W. — Forest Sci. 7, 2, 130 (1961).
- [11] BENDETSKY K. M. — Bull. Jard. Bot. princip. Acad. Sci. U.R.S.S., 56, 65 (1964).
- [12] BONNER J. — Amer. Journ. Bot. 36, 323 (1949).
- [13] BONNER J. — Amer. Journ. Bot. 36, 429 (1949).
- [14] BOULTER D., BARBER J. T. — New phytol. 62, 3, 301 (1963).
- [15] BRADBEER C. Ph. D. — Thèse Université de Durham Angleterre (1957).
- [16] BRADBEER C., STUMPF P. K. — J. Biol. Chem. 234, 3, 498 (1959).
- [17] BRUNEL A. — Traité pratique de chimie végétale t. II. p. 441. Éd. Georges Frères, Tourcoing (1948).
- [18] BRUNEL A. — Traité pratique de chimie végétale t. I, p. 321 (1948).
- [19] BRUNEL A. — Traité pratique de chimie végétale t. I, p. 315 (1948).
- [20] BRUNEL A. — C. R. Acad. Sci. 234, 1470 (1952).
- [21] BRUNEL A., BRUNEL-CAPELLE G. — C. R. Acad. Sci. 261, 4213 (1965).
- [22] BRUNEL-CAPELLE G., BARTHE J. P. — C. R. Acad. Sci. D, 264, 314 (1967).
- [23] BRUNEL-CAPELLE G., BRUNEL A. — C. R. Acad. Sci. 261, 2720 (1965).
- [24] BRUNEL-CAPELLE G., DE SERRES M. — C. R. Acad. Sci. 264, 54 (1967).
- [25] BRUNEL-CAPELLE G., DE SERRES M., BARTHE J. P. — C. R. Acad. Sci. D, 264, 454 (1967).
- [26] BRZOWSKA J. — Thèse Sci. nat. Paris (1969).
- [27] BRZOWSKA J., HANOWER P. — C. R. Acad. Sci. D, 264, 2288 (1967).
- [28] BUJARD E. — J. Pharm. 9-10, 413 (1965).
- [29] BUSSON F., CARBIENER R., LANZA J. — Méthodes chromatographiques de dosages des acides aminés. Éd. C.N.R.S. (1960).
- [30] CAMPBELL J. W. — Comp. Biochem. Physiol. G. B. 18, I, 179 (1966).
- [31] CHARLOT G. — Dosages colorimétriques des éléments minéraux — Principe et Méthodes — p. 291, Éd. Masson et C<sup>ie</sup> (1961).

- [32] CHIBNALL A. C. — Protein metabolism in the plant. New Haven, Conn. : Yale University Press (1939).
- [33] CHIBNALL A. C. — *New Phytologist*, 53, 31 (1954).
- [34] CIAMCIAN G., RAVENNA C. — *Rend. Real. Acad. Lincei*, 20, 614 (1911).
- [35] CLOSE J., ANDRIANES E. L., MOORE S., BIGWOOD E. J. — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 35, 935 (1953).
- [36] COÏC Y., FAUCONNEAU G., PION R., LESAINC C., GODEFROY S. — *Ann. Physiol. Vég.* 4, 4, 295 (1962).
- [37] COLEMAN R. G. — Ph. D. Thesis, University London (1953).
- [38] COLEMAN R. G. — *Austr. Jour. Biol. Sci.* 10, 50 (1957).
- [39] COLEMAN R. G. — *Nature* 181, 776 (1958).
- [40] COLEMAN R. G., HEGARTY M. P. — *Nature* 179, 376 (1957).
- [41] COURTOIS J. E. — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 42, 1451 (1960).
- [42] CRANE F. A., STEWARD F. C. — *Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Mem.* 379, 91 (1962).
- [43] CRICK F. H. — *Biochim. Soc. Symp.* 14, 25 (1957).
- [44] CRICK F. H. — *Symp. Soc. Exp. Biol.* 12, 138 (1958).
- [45] CRICK F. H., BARNETT F. R. S., BRENNER S., WATTS-TOBIN R. J. — *Nature* 192, 1227 (1961).
- [46] CROMWELL B. T. — *Biochem. J.* 37, 717 et 722 (1944).
- [47] DAMODARAN M., SIVARAMAKRISHNAN P. M. — *Biochem. J.* 31, 1041 (1937).
- [48] DAMODARAN M., VENKATESAN T. R. — *Proc. Indian Acad. Sci.* 276, 26 (1948).
- [49] DAVISON D. C., ELLIOT W. H. — *Nature* 169, 313 (1952).
- [50] DEDONDER R. — *C. R. Acad. Sci.* 230, 997 (1950).
- [51] DEMETRIADES S. D., CONSTANTINOPOULOS P. Th. — *C. R. Acad. Sci.* 242, 2384 (1956).
- [52] DEVEY H. M. R., KIDDER G. W. — *J. Am. Chem. Soc.* 76, 3102 (1954).
- [53] DEVEY L. J., BYERRUM R. U., BALL C. D. — *Bioch. Bioph. Acta* 18, 141 (1955).
- [54] DONE J., FOWDEN L. — *Biochem. J.* 51, 451 (1952).
- [55] DRAPER O. J., POLLARD A. L. — *Science*, 109, 448 (1949).
- [56] DUMAZET C., VOVAN L., FAYOLLE J. — *C. R. Soc. Fr. Biol.* 157, 7, 1463 (1963).
- [57] DUPERON R. — *Rev. Gén. Bot.* 61, 261 (1954).
- [58] DURANTON H. — *Thèse Sci. nat. Paris* (1959).
- [59] DURZAN D. J. — *Canad. J. Bot.* 46, 7, 909 (1968).
- [60] EATON S. V. — *Bot. Gaz.* 97, 68 (1935).
- [61] EATON S. V. — *Bot. Gaz.* 102, 536 (1941).
- [62] EATON S. V. — *Bot. Gaz.* 104, 306 (1942).
- [63] EATON S. V. — *Bot. Gaz.* 112, 300 (1951).
- [64] ENGELAND R., KUTSCHER F. — *Zbl. f. Physiol.* 24, 479 (1910).
- [65] ERGLE D. R. — *Bot. Gaz.* 114, 417 (1953).
- [66] ERGLE D. R., EATON F. M. — *Plant Physiol.* 26, 4, 639 (1951).
- [67] EULER H., ADLER E., GÜNTHER G., DAS N. — *Z. Physiol. Chem.* 254, 61 (1938).
- [68] FOLKES B. F., YEMM E. W. — *New Phytol.* 57 (1958).
- [69] FOSSE R. — *L'urée*. P. U. Paris, p. 27 (1928).
- [70] FOWDEN L. — *Ann. Bot. N. S.* — XVIII, 72, 417 (1954).
- [71] FREIBERG S. R., STEWARD F. C. — *Ann. Bot.* 24, 93, 147 (1960).
- [72] FRIES N. — *SYMB. Bot. Upsal.* 13, I, 4 (1954).
- [73] FUJIWARA A., TORII K. — *Tohoku J. Agri. Res.* 12, 3, 277 (1961).
- [74] GALE E. F. — *Biochem. J.* 34, 853 (1940).

- [75] GAMBORG O. L. — *Can. J. Biochem.* 43, 723 (1965).
- [76] GLASZIOU K. T. — *Austral. J. Biol. Sci.* 9, 117 (1956).
- [77] GLEITER M. E., PARKER H. E. — *Arch. Biochem. Biophys.* 71, 430 (1957).
- [78] GOAS G. — *Bull. Soc. fr. Physiol. Vég.* 6, 2, 92 (1960).
- [79] GOAS G. — *C. R. Acad. Sci.* 261, 4217 (1965).
- [80] GREENBERG D. M. — Arginase p. 368 in : *Methods in Enzymology*, II, Ed. Colowick et Kaplan Acad. Press, Inc. N. Y. (1955).
- [81] GUITTON Y. — *C. R. Acad. Sci.* 245, 1157 (1957).
- [82] GUITTON Y. — *Thèse Sci. Nat. Toulouse* (1964).
- [83] GUNSAIUS I. C., GIBBS M. — *J. Biol. Chem.* 194, 871 (1952).
- [84] HANOWER P., BRZOWSKA J. — *Agrochimica* VIII, 3 (1964).
- [85] HANOWER P., BRZOWSKA J. — *C. R. Acad. Sci. Série D*, 263, 1969 (1966).
- [86] HATTORI A. — *J. Biochem. Tokyo* 45, 57 (1958).
- [87] HERBST E. J., SNELL E. E. — *J. Biol. Chem.* 176, 989 (1948).
- [88] HERBST E. J., SNELL E. E. — *J. Bacter.* 58, 379 (1949).
- [89] HERBST E. J., SNELL E. E. — *J. Biol. Chem.* 181, 47 (1949).
- [90] HEWITT E. J. (Long Ashton). — Sand and water culture methode used in study of plant nutrition, *Comm. Agr. Bur.* p. 189 et 194 (1952).
- [91] HEWITT E. J., JONES E. W., WILLIAMS A. H. — *Nature*, 163, 681 (1949).
- [92] HIWATARI Y., HAYAT J. — *Biochem.* 7, 169 (1927).
- [93] HOLLEY R. W., CAIN J. C. — *Science*, 121, 172 (1955).
- [94] HOUGH L., JONES J. K. N., WADMAN W. H. — *J. Chem. Soc.* 1702 (1950).
- [95] IRREVENNE F., EVANS R. L., HAYDEN A. R., SILBER R. — *Nature*, 180, 704 (1957).
- [96] JAMES W. O. — *New Phytol.* 48, 172 (1949).
- [97] JORDAN H. V. — *U. S. Dep. Agr. Techn.* 1297 (1964).
- [98] KASTING R., DELWICHE C. C. — *Plant Physiol.* 30, suppl. XXVIII (1955).
- [99] KASTING R., DELWICHE C. C. — *Plant Physiol.* 32, 5, 471 (1957).
- [100] KASTING R., DELWICHE C. C. — *Plant Physiol.* 33, 5, 350 (1958).
- [101] KIESEL A. — *Z. Physiol. Chem.* 60, 460 (1909).
- [102] KISBAN C., HORVATH M., DEZSI L., UDVARDY J., FARKAS G. L. — *Acta Bot. Hung.* 10, 275 (1964).
- [103] KITAGAWA M., TOMITA T. — *Proc. Imp. Ac. Tokyo* 5, 380 (1929).
- [104] KLECKOWSKI K., KRETOVICH V. L. — *Biokhimija*, 25, 164 (1960).
- [105] KLECZOWSKI K., REIFER I. — *Bull. Acad. Polon. Sci. ser. Biol.* 7, 53 (1959).
- [106] KLEIN G., TAUBÖCK K. — *Biochem. Z.* 10, 251 (1932).
- [107] KLEIN G., TAUBÖCK K. — *Biochem. Z.* 278, 255 (1932).
- [108] KLEIN G., TAUBÖCK K., LINSER J. — *Jahrb. wiss. Botan.* 73, 193 (1930).
- [109] KOLLER D., MAYER A. M., POLJAKOFF-MAYBER A., KLEIN S. — *Ann. Rev. Plant Physiol.* 13, 437 (1962).
- [110] KONDO K., OGASAWARA Y. — *Bull. Res. Inst. Food Sci. Tokyo* 10, 46 (1952).
- [111] KORNBERG H. L., BREEVERS H. — *Biochem. Biophys. Acta* 26, 531 (1957).
- [112] KREBS H. A., HENSELEIT K. — *Z. Physiol. Chem.* 210, 33 (1932).
- [113] KRETOVICH W. L. — *Biokhimija* 7, 232 (1942).
- [114] KRETOVICH W. L., GALAS E. — *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 124, 217 (1959).
- [115] KRETOVICH W. L., GALAS E. — *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 130, 1144 (1960).
- [116] KRETOVICH W. L., GALAS E. — *Biokhimija* 26, 99 (1961).

- [117] LAWRENCE J. M., DAY K. M., STEPHENSON J. J. — *Plant Physiol.* 33, suppl. XI (1958).
- [118] LAWRENCE J. M., GRANT D. R. — *Plant Physiol.* 38, 5, 561 (1963).
- [119] LEETE E., MARION L., SPENCER J. D. — *Nature* 174, 650 (1954).
- [120] LE GOFF L., ROUSSAUX J., BELJANSKI M., MANIGAULT P. — *Bull. Soc. Franç. Physiol. végét.* 13, 251 (1967).
- [121] LINKO P., HOLM-HANSEN O., BASSHAM J. A., CALVIN M. — *J. Exp. Bot.* 8, 147 (1957).
- [122] LIORET C. — Thèse Sci. nat. Paris (1958).
- [123] MAAS W. K. — Studies on Repression of Arginine Biosynthesis in *Escherichia coli* in : Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology. vol. XXVI — Cellular Regulation Mechanisms. p. 183 (1961).
- [124] MARCUS A., FREELEY J. — *J. Biol. Chem.* 240, 4, 1675 (1965).
- [125] MARTIN W. H., PELCZAR M. J., HANSEN P. A. — *Science*, 116, 483 (1952).
- [126] McKEE H. S. — Nitrogen metabolism of seedlings in : *Encyclopedia of Plant Physiology*, Springer Verlag, Berlin. VIII, 477 (1958).
- [127] MÉNAGÉ A., MOREL G. — *C. R. Acad. Sci.* 255, 2641 (1962).
- [128] MÉNAGÉ A., MOREL G. — *Physiol. Vég.* 2, 1 (1964).
- [129] MERTZ E. T., MATSUMOTO H. — *Arch. Biochem. Biophys.* 63, 50 (1956).
- [130] MEYERHOF O., LOHMANN K. — *Biochem. Zeitschr.* 196, 22 (1928).
- [131] MIDDELHOVEN W. J. — *Biochem. Biophys. Acta* 93, 3, 650 (1964).
- [132] MIETTINEN J. K., VIRTANEN A. I. — *Physiol. Plant* 5, 540 (1952).
- [133] MILLER E. C. — *Ann. Bot.* 24, 693 (1910).
- [134] MORA J., TARRAB R., BOJALIL L. F. — *Biochim. Biophys. Acta*, 118, 206 (1966).
- [135] MORA J., TARRAB R., MARTUSCELLI J., SOBERON G. — *Biochem. J.* 96, 588 (1965).
- [136] MORAWSKA G., KLECZKOWSKI K., REIFER I. — *Acta Soc. Bot. Polon.* I, 191 (1963).
- [137] MORAWSKA-MUSZYNSKA G., REIFER I. — *Acta Biochim. Polon.* 12, 2, 187 (1965).
- [138] MOSOLOV I. V., ALEKSANDROVSKAYA V. A. — *Agrokhimia* 11, 29 (1966).
- [139] MOURGUE M., BARET R., DOKHAN R. — *C. R. Soc. Biol.* 147, 1449 (1953).
- [140] MOURGUE M., DOKHAN R. — *C. R. Soc. Biol.* 148, 1434 (1954).
- [141] MOYSE A. — *Respiration et métabolisme azoté (Étude de physiologie foliaire)* éd. Hermann, Paris (1950).
- [142] MUSCULUS F. — *Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris)* 82, 333 (1876).
- [143] NIGHTINGALE G. T., SCHERMERHORN L. G., ROBBINS W. R. — *Plant Physiol.* 7, 565 (1932).
- [144] NIREMBERG M. W., MATTHAEI J. H., JONES O. W. — *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 48, 104 (1962).
- [145] PANDEY R. M., RANJAN S. — *Acta Bot. Acad. Sci. Hungar.* 10, 3-4, 343 (1964).
- [146] PANALAKS T., SMITH M., WALKER E. I. — *Biochim. Biophys. Acta*, 78, 1, 101 (1963).
- [147] PARTRIDGE S. M. — *Nature* 164, 443 (1949).
- [148] PLESHKOV B. P., IVANKOV S. H., ANTONOVA G. V. — *Dokl. Acad. Nauk SSSR* 117, 1070 (1957).
- [149] PRIANISHNIKOV D. N. — « L'azote dans la vie des plantes et dans l'agriculture de l'U.R.S.S. ». M. (1945).
- [150] PRINGSHEIM E. G. — *Z. Pflanzenphysiol.* 58, 4, 347 (1968).
- [151] RAGHUPATHI RAMI REDDY S., CAMPBELL J. W. — *Biochim. Biophys. Acta*, 159, 557 (1968).

- [152] RATNER E. I., SMIRNOV A. M., HUAN HUN-CHOU, UKHINA S. F., KUZOVKINA I. N. — *Fiziol. Rasten*, 10 (6), 673 (1963).
- [153] RATNER E. I., UKHINA S. F. — *Izv. Acad. Nauk sér. Biol.* 6, 865 (1961).
- [154] RATNER E. I., UKHINA S. F. — *Fiziol. Rasten*. 10, (4), 393 (1963).
- [155] RATNER S., ROCHOVANSKY O. — *Arch. Bioch. Bioph.* 63, 296 (1956).
- [156] REIFER I., AUGUSTYNIAK H. — *Bull. Acad. Sci., sér. Biol.* 16, 3, 139 (1968).
- [157] REIFER I., MORAWSKA G. — *Acta Biochim. Polon.* 10, 4, 413 (1963).
- [158] RENDIG V. V., MCCOMBE A. — *Plant and Soil* 14, 176 (1961).
- [159] REUTER C. — *Z. Physiol. Chem.* 78, 167 (1912).
- [160] REUTER G. — *Phytochem. I*, 63 (1962).
- [161] RICHARDS F. J., BERNER E. — *Ann. Bot.* 18, 15 (1954).
- [162] RICHARDS F. J., COLEMAN R. G. — *Nature* 170, 460 (1952).
- [163] SAKAGUCHI. — *J. Biochim. (Japon)* 5, 133 (1925) et 37, 231 (1950).
- [164] SCHIMKE R. T. — *Nat. Cancer Inst. Monogr.* 13, 197 (1964).
- [165] SHIGA K. — *Hoppe-Seyhers Z.* 42, 505 (1904).
- [166] SIRCAR S. M., DASTIDAR A. G. — *Physiol. Plant.* 15, 206 (1962).
- [167] SMITH T. A. — *Phytochem.* 2, 3, 241 (1963).
- [168] SMITH T. A., RICHARDS F. J. — *Biochem. J.* 84, 292 (1962).
- [169] SOMOGYI M. — *J. Biol. Chem.* 61, 160 (1945).
- [170] SPACKMAN D. H., STEIN W. H., MOORE S. — *Anal. Chem.* 30, 1190 (1958).
- [171] SRB A. M., HOROWITZ N. H. — *J. Biol. Chem.* 154, 129 (1944).
- [172] STARON T., ALLARD C., CHAMBRE M. M., NGUYEN DAT XUONG. — *C. R. Acad. Sci.* 257, 2552 (1963).
- [173] STEWARD F. C., CRANE F., MILLAR K., ZACHARIUS R. M., RALSON R., MARGOLIS P. — *Symp. Soc. Exp. Biol.* 13, 148 (1959).
- [174] STEWARD F. C., MARGOLIS D. — *Contribs. Boyce Thompson Inst.* 21, 393 (1962).
- [175] STEWARD F. C., POLLARD J. K. — in : *Amino acid pools* p. 25 éd. J. T. Holder, Elsevier, Amsterdam (1963).
- [176] STUMPF P. K. — *Phosphorus metabolism*, 2, 29 (1952).
- [177] TAKEO IWABUCHI — *J. Biochem.* 3, 447 (1936).
- [178] TOA I-HSUN, HUANG TSO-YUEH — *Scientia Sinica*, 14, 3, 417 (1965).
- [179] THOMAS M. D., HENDRICKS R. H., HILL G. R. — *Soil Sci.* 70, 19 (1950).
- [180] THOMAS W. H., KRAUS R. W. — *Plant Physiol.* 30, 113 (1955).
- [181] THOMPSON J. F., MORRIS C. J., GERING R. K. — *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabilis* 6, 3-4, 261 (1960).
- [182] THOMPSON J. F., STEWARD F. C. — *Plant Physiol.* 26, 421 (1951).
- [183] THOMPSON J. F., ZACHARIUS R. M., STEWARD F. C. — *Plant Physiol.* 26, 375 (1951).
- [184] TOKUNAGA Y. — *J. Sci. Soil Tokyo* 30, 171 (1959).
- [185] TOKUNAGA Y., TOKUOKA M. — *J. Sci. Soil Tokyo* 28, 397 (1957).
- [186] TOUZÉ A. — *Thèse Sci. nat. Toulouse* (1964) p. 115 et 105.
- [187] TRACEY M. V. — *Urea and ureides*, in : *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, t. 4, 125, éd. Peach K. et Tracey M. V. Springer Verlag Berlin (1955).
- [188] VAIDYNATHAN C. S., GIRI K. V. — *Enzymologia*, 16, 167 (1953).
- [189] VARNER J. E. — *Uréase* in : *The enzymes*, vol. 4, p. 247 (1960) P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback éd. Acad. Presse. New York-Londres.
- [190] WALKER J. B. — *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.* 38, 561 (1952).
- [191] WEISBLUM B., BENZER S., HOLLEY R. W. — *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 48, 1449 (1962).

- [192] WELCHER F. J. — Standard methods of chemical analyses, 6 éd. vol. 2A p. 922  
Ed. Van Nostrand Co, N. Y. (1963).
- [193] WILDMAN S. G., CAMPBELL J. M., BONNER J. — Arch. Biochem. 24, 9 (1949).
- [194] WILLEMOT J., PARRY G. — Ann. Pharm. 24, 209 (1966).
- [195] WILLENBRINK J. — Z. Pflanzenphysiol. 56, 5, 427 (1967).
- [196] WILLIAMS W. T., SHARMA P. Ch. — Nature, 168, 659 (1951).
- [197] YEMM E. W. — Biochem. J. 49, 26 (1951).
- [198] YONEZU SUZUKI KAGAKU — Science 22, 264 (1952).
- [199] YOSHIDA D. — Soil. Sci. Plant Nutrit. 13, 4, 107 (1967).
- [200] YOSHIDA D., MITAKE T. — Plant Cell Physiol. 7, 301 (1966).

Les Editions de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer tendent à constituer une documentation scientifique de base sur les zones intertropicales et méditerranéennes et les problèmes que pose le développement des pays qui s'y trouvent.

## CAHIERS ORSTOM.

### — Séries périodiques :

- **entomologie médicale et parasitologie** : articles relatifs à l'épidémiologie des grandes endémies tropicales transmises par des invertébrés, à la biologie de leurs vecteurs et des parasites, et aux méthodes de lutte.
- **géologie** : études sur les trois thèmes suivants : altération des roches, géologie marine des marges continentales, tectonique de la région andine.
- **hydrobiologie** : études biologiques des eaux à l'intérieur des terres, principalement dans les zones intertropicales.
- **hydrologie** : études, méthodes d'observation et d'exploitation des données concernant les cours d'eau intertropicaux et leurs régimes en Afrique, Madagascar, Amérique du Sud, Nouvelle-Calédonie...
- **océanographie** : études d'océanographie physique et biologique dans la zone intertropicale, dont une importante partie résulte des campagnes des navires océanographiques de l'ORSTOM ou utilisés par lui.
- **pédologie** : articles relatifs aux problèmes soulevés par l'étude des sols des régions intertropicales et méditerranéennes (morphologie, caractérisation physico-chimique et minéralogique, classification, relations entre sols et géomorphologie, problèmes liés aux sels, à l'eau, à l'érosion, à la fertilité des sols) ; résumés de thèses et notes techniques.
- **sciences humaines** : études géographiques, sociologiques, économiques, démographiques et ethnologiques concernant les milieux et les problèmes humains principalement dans les zones intertropicales.

### — Séries non périodiques :

- **biologie** : études consacrées à diverses branches de la biologie végétale et animale.
- **géophysique** : données et études concernant la gravimétrie, le magnétisme et la sismologie.

**MÉMOIRES ORSTOM** : consacrés aux études approfondies (synthèses régionales, thèses...) dans les diverses disciplines scientifiques (44 titres parus).

**ANNALES HYDROLOGIQUES D'OUTRE-MER** : depuis 1959, deux séries sont consacrées : l'une, aux Etats africains d'expression française et à Madagascar, l'autre aux Territoires et Départements français d'Outre-Mer.

**FAUNE TROPICALE** : ouvrages concernant l'Afrique du Nord, l'Afrique tropicale, Madagascar, la Réunion et la partie orientale de l'Atlantique tropical (18 titres parus).

**INITIATIONS/DOCUMENTATIONS TECHNIQUES** : mises au point et synthèses au niveau, soit de l'enseignement supérieur, soit d'une vulgarisation scientifiquement sûre (15 titres parus).

**TRAVAUX ET DOCUMENTS DE L'ORSTOM** : cette collection, très souple dans ses aspects et ses possibilités de diffusion, a été conçue pour s'adapter à des textes scientifiques ou techniques très divers par l'origine, la nature, la portée dans le temps ou l'espace, ou par leur degré de spécialisation (6 titres parus).

**L'HOMME D'OUTRE-MER** : exclusivement consacrée aux sciences de l'homme, cette collection est maintenant réservée à des auteurs n'appartenant pas aux structures de l'ORSTOM (13 ouvrages parus).

De nombreuses **CARTES THÉMATIQUES**, accompagnées de **NOTICES**, sont éditées chaque année, intéressant des domaines scientifiques ou des régions géographiques très variées.

**BULLETINS ET INDEX BIBLIOGRAPHIQUES** : Bulletin analytique d'entomologie médicale et vétérinaire (mensuel) et Index bibliographique de botanique tropicale (trimestriel).

**O.R.S.T.O.M.**

**Direction Générale :**  
24, rue Bayard, PARIS-8<sup>e</sup>

**Service Central de Documentation :**  
70 - 74, route d'Aulnay, 93 - BONDY