

Méthodes biologique

Objekttyp: **Chapter**

Zeitschrift: **Mémoires de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**

Band (Jahr): **12 (1958-1961)**

Heft 6

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

6. On broye les fragments³ en ajoutant régulièrement la solution-tampon. On récolte quantitativement l'extrait dans des tubes à centrifuger (10 ml); les mortiers et les pistils sont lavés avec la solution-tampon.
7. Après avoir équilibré les tubes, on centrifuge⁴ pendant 10 à 15 mn (3000 à 4500 t/mn); l'extrait aqueux est récolté et l'amas de tissus (membranes cellulaires essentiellement) est abandonné au fond des tubes.
8. L'extrait est transvasé quantitativement dans des ballons jaugés (10 ml) et on complète à 10 ml en utilisant la solution-tampon de pH 6,1.
9. On peut conserver cet extrait à l'obscurité ($\pm 2^{\circ}$ C) pendant 24 h, sans que son activité enzymatique baisse notablement (PILET, 1960).

4. METHODES BIOLOGIQUE

Parmi les diverses méthodes proposées pour évaluer l'activité des auxines-oxydases, nous avons choisi trois techniques, mises au point dans notre laboratoire, et dont nous décrirons le principe et brièvement l'application. Nous examinerons successivement :

- 1° Dosage colorimétrique
- 2° Dosage manométrique
- 3° Dosage biochromatographique.

4.1. Dosage colorimétrique.

4.1.1. PRINCIPE.

Cette méthode, basée sur les expériences de GALSTON et BAKER (1951, 1953), de GALSTON et DALBERG (1954), et de PILET et GALSTON (1955) repose sur le principe suivant :

A une quantité déterminée d'extrait (x ml) additionné d'une certaine quantité d'eau (y ml) et de solution-tampon de pH = 6,1 (z ml), on ajoute au temps 0⁵, de l'ABIA (a ml à une concentration c).

On dépose ce mélange (au total 10 ml) dans un erlenmeyer qu'on agite⁶ lentement à l'obscurité ($28,0^{\circ}$ C $\pm 0,5$). Après un temps (T), on prélève quelques ml (b ml) du mélange qu'on ajoute au temps 0

³ Des essais sont en cours qui semblent indiquer qu'une homogénéisation des tissus permet d'obtenir des extraits plus actifs.

⁴ Nous sommes en train de mettre au point une technique basée sur l'emploi de la centrifugeuse à congélation; les résultats préliminaires obtenus sont concluants, car les extraits purifiés sont beaucoup plus actifs que ceux qui sont préparés par la technique habituelle.

⁵ Pour les mesures de temps, nous utilisons le chronomètre automatique « Lab-Chron » fabriqué par Labline et Co à Chicago.

⁶ Nous avons fait construire spécialement par la maison Zivy, à Bâle, un agitateur-incubateur approprié.

(donné par un autre chronomètre) à une certaine quantité (r ml) d'un réactif de l'ABIA. On suit le développement de la coloration et on relève, après un temps (t) la valeur du « coefficient colorimétrique » (C_E). Parallèlement, on fait quelques essais témoins (extrait sans ABIA; ABIA sans extrait; pas d'incubation, etc...) qui permettront de corriger les valeurs obtenues.

4. 1. 2. QUELQUES DONNÉES PRATIQUES.

Dans ces essais, nous avons pris les valeurs suivantes :

Mélange actif.

$$x = 2 \text{ ml} \quad y = 2 \text{ ml} \quad z = 4 \text{ ml}$$

$$a = 2 \text{ ml} \quad c = 10 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Durée de l'incubation et mesures colorimétriques.

$$T = 60 \text{ mn} \quad t = 30 \text{ mn}$$

Réactif.

En général, nous avons adopté les proportions suivantes :

mélange actif + ABIA : $b = 2 \text{ ml}$

réactif : $r = 7 \text{ ml} + 1 \text{ ml}$ d'éthanol ou $r = 8 \text{ ml}$.

4. 1. 3. MESURES COLORIMÉTRIQUES.

On emploie, pour ces essais, l'appareil photoélectrique de Klett-Summerson (Klett manufacturing & Co, New-York) muni d'une lampe spéciale (Lamp bulb n° 37 88 K, 100 W; Thomas & Co, Philadelphia) qu'on prend la précaution d'allumer au moins 10 mn avant les essais. On utilise un filtre spécial (filtre n° 54; $535 \text{ m}\mu \pm 35$) et des tubes appropriés (Klett-tubes : 5 et 10 ml).

4. 1. 4. RÉACTIF.

Nous avons mis au point (PILET, 1957 c) le réactif suivant⁷ :

3 ml $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ (pro anal.; PM : 270,32)

60 ml H_2SO_4 (1,84; PM : 98,08; 97 %))

100 ml H_2O (eau bidistillée et déionisée).

Le FeCl_3 est dissous dans de l'eau distillée et l'on prépare une solution 1,5 M. On verse lentement dans cette solution, en agitant, H_2SO_4 . On remplit les tubes (7 ml) à l'aide d'une burette automatique (type de Squibb montée sur un flacon de Woulf).

4. 1. 5. COURBE ÉTALON.

Pour diverses concentrations d'ABIA (0,25 à 10 $\mu\text{g/ml}$), on détermine le « coefficient colorimétrique ». A titre d'exemple, nous reporterons (fig. 2) deux courbes étalons, l'une obtenue en ajoutant à 8 ml de réactif, 2 ml d'une solution d'ABIA et l'autre (la sensibilité est accrue) en ajoutant à 7 ml de réactif, 1 ml d'éthanol et

⁷ Ce réactif est voisin de celui proposé par TANG et BONNER (1947, 1948) et GORDON et WEBER (1951); il est basé sur la réaction de SALKOWSKI (1885).

2 ml de solution d'ABIA. Cette courbe établie et le coefficient colorimétrique trouvé pour une solution inconnue, il est facile de déterminer la concentration correspondante de l'ABIA.

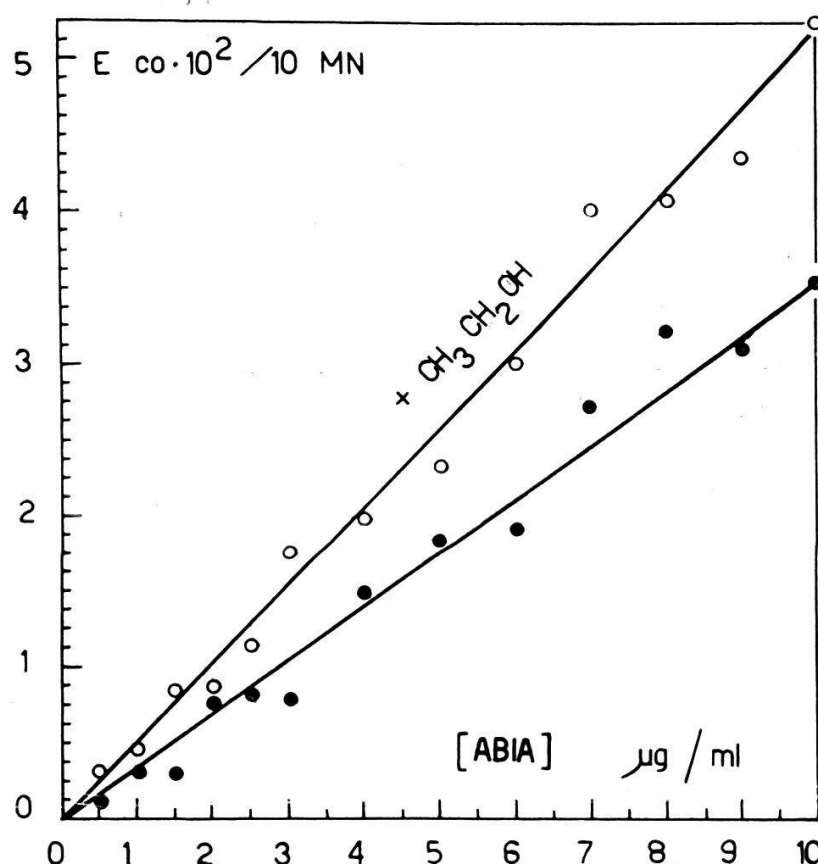


FIG. 2. — Variations du coefficient colorimétrique (donné en unités de KLETT) pour des solutions aqueuses contenant de l'ABIA (à différentes concentrations en $\mu\text{g/ml}$) auxquelles on aura ajouté le réactif spécifique (v. p. 219) et, pour une série d'analyses, de l'alcool éthylique.

4.1.6. EXPRESSION DES RÉSULTATS.

Nous avons ainsi déterminé la quantité d'ABIA détruit pendant 60 mn d'incubation enzymatique et ceci pour 2 ml d'un mélange contenant un peu d'extrait enzymatique, la correspondance entre cette valeur et le poids frais (ou la teneur en azote protéinique) est facile à établir :

Initialement, nous avons 10 ml d'*extrait* correspondant à p mg de PF, nous en prenons 2 ml pour préparer 10 ml d'un *mélange actif* ; ces 10 ml correspondront donc à $\frac{P}{5}$ mg de PF. Après 60 mn,

nous retirons 2 ml du mélange, qui correspondront donc à $\frac{P}{25}$ mg de PF, pour les placer en contact avec le réactif. L'ABIA détruit

dont on vient de calculer la valeur (A) sera, par conséquent, par unité de poids égal à :

$$\text{Activité auxines-oxydasique} = \frac{25 \cdot A}{p} / \text{mg de poids frais.}$$

4. 1. 7. RÉSULTATS.

Nous donnerons, pour des extraits enzymatiques préparés comme on l'a indiqué précédemment, les courbes traduisant la dégradation de l'ABIA en fonction de la durée d'incubation (fig. 3).

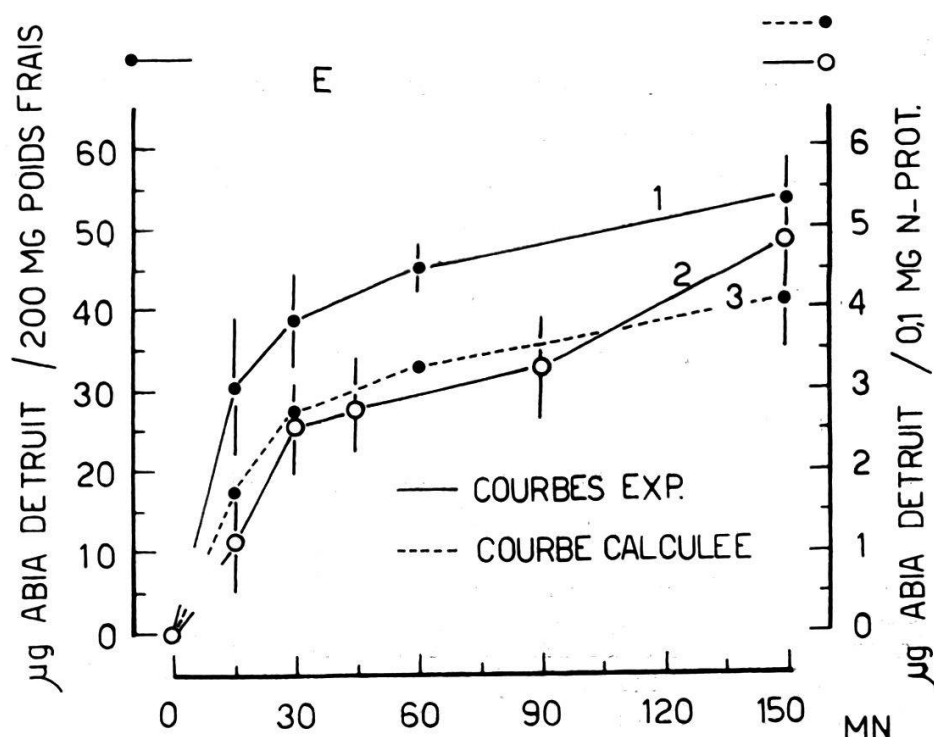


FIG. 3. — Dégradation enzymatique de l'ABIA pour des extraits radicaires et rapportée en μg d'ABIA détruit, pour une période d'incubation variable (de 0 à 150 mn), et pour 200 mg de poids frais ou 0,1 mg d'azote protéinique. Les courbes 1 et 2 sont directement tirées de mesures au photocolorimètre, la courbe 3 est construite à partir des données de la courbe 1, mais les unités employées sont celles de la courbe 2.

Nous rapporterons d'abord deux séries de résultats pour deux extraits semblables mais provenant de matériel biologique différent (deux séries de racines de 18 mm, à partir desquelles on a préparé des fragments de 6 mm). Nous exprimerons l'ABIA détruit :

- par rapport à 200 mg de poids frais (courbe 1);
- par rapport à 0,1 mg d'azote protéinique (courbe 2).

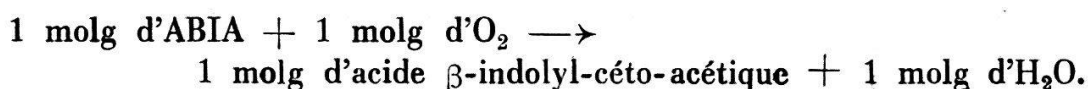
A partir de la courbe 1, nous construirons une courbe qui traduit les résultats précédents, non plus par rapport au poids frais, mais pour 0,1 mg d'azote protéinique (courbe 3).

Ainsi qu'on peut le voir les courbes 2 et 3 coïncident à peu près, et la méthode colorimétrique peut être considérée comme une relativement bonne technique de dosage de l'activité auxines-oxydasique.

4.2. Dosage manométrique.

4.2.1. PRINCIPE.

Cette méthode qui a été utilisée pour la première fois par VAN RAALTE (1954) et STUTZ (1957) est basée sur le fait que pour qu'1 mol g d'ABIA soit inactivée, il faut qu'1 mol g d'oxygène soit absorbée :



En fait, et nous avons déjà discuté ce problème, cette équation est très schématique et ne rend pas compte des diverses étapes de transformation biochimique subies par l'ABIA.

On peut toutefois, par une mesure de l'oxygène absorbé (mesure respirométrique de WARBURG, 1926 et DIXON, 1943), évaluer stœchiométriquement la quantité d'ABIA dégradé.

4.2.2. TECHNIQUE.

Nous résumerons brièvement notre méthode (PILET et KOBR, 1959) ;

1) On dépose dans chaque auge du respiromètre de WARBURG 2 ml d'extrait enzymatique (v. p. 217).

2) Après une période d'« équilibration » de 30 mn, on détermine, pendant 75 mn, la quantité d'O₂ absorbé.

On transvase alors, du bras latéral dans le récipient principal :
pour les lots témoins : 0,5 ml d'une solution-tampon (pH = 6,1)
pour les lots traités : 0,5 ml d'une solution-tampon d'ABIA de
100 µg/ml.

Il convient de remarquer que les conditions d'incubation enzymatique ne sont pas, dans ces essais, tout à fait identiques à celles que nous avons décrites pour le dosage colorimétrique, et que nous respecterons pour les analyses biochromatographiques et radiochromatographiques.

Ces différences de techniques, qui vont compliquer une comparaison des résultats obtenus, nous ont été dictées par la méthode particulière qu'imposent les mesures d'O₂ absorbé. C'est ainsi, par exemple, que le volume total de la solution active est différent (2,5 ml pour 10 ml) et que la concentration de l'ABIA employé n'est pas la même (0,5 ml d'ABIA à 100 µg/ml au lieu de 2 ml d'ABIA à 50 µg/ml).

4.2.3. EXPRESSION DES RÉSULTATS.

En faisant la différence entre les valeurs obtenues pour des solutions auxquelles on a ajouté de l'ABIA et celles qui n'ont pas été traitées, nous obtiendrons la quantité d'oxygène correspondant à celle

qui a été nécessaire pour dégrader cet ABIA. En admettant comme on l'a vu plus haut, qu'à 1 molg d'ABIA dégradé correspond 1 molg d'O₂ absorbé, nous pourrions écrire :

175,18 g d'ABIA correspondent à 32 g d'oxygène; par conséquent :

22,4 µl d'O₂ correspondent à 175,18 µg d'ABIA et par suite :

1 µl d'O₂ correspond à $\frac{175,18}{22,4} = 7,9$ µg d'ABIA.

Après 150 mn d'incubation, nous constatons que l'extrait enzymatique a absorbé 3,6 µl d'O₂/200 mg de poids frais, l'ABIA détruit sera donc égal à 3,6 · 7,9 = 28,44 soit 28,0 µg d'ABIA détruit / 200 mg de poids frais.

4. 2. 4. RÉSULTATS.

On réalise deux séries d'essais parallèles et on mesure la quantité d'O₂ absorbé par les extraits enzymatiques pendant 60 mn. Au bout de 75 mn, on donne à un des lots de l'ABIA et on poursuit les déterminations d'O₂ absorbé. La différence entre ces deux séries de valeurs correspond à la quantité d'O₂ utilisé pour la dégradation de l'ABIA. En se souvenant qu'une molg d'O₂ est nécessaire pour

TABLEAU 1.

Dosage manométrique (absorption d'O₂) de l'activité auxines-oxydase d'extrait de fragments (9 mm) de racines de 18 mm. Ces valeurs sont données pour 200 mg de poids frais. (A noter que les conditions expérimentales ne sont pas semblables à celles de nos précédents essais).

Temps /mn	Incubation /mn	1 O ₂ absorbé			Equivalent d'ABIA détruit en µg
		TE	TR	TR-TE	
0	—	0		—	—
15	—	5,6		—	—
30	—	8,9		—	—
45	—	11,1		—	—
60	—	11,8		—	—
75	0 ⁽¹⁾	14,6		0	0
90	15	13,9	15,0	1,1	8,8
105	30	15,2	17,1	1,9	15,8
120	45	16,4	18,6	2,2	17,5
135	60	18,1	20,8	2,7	21,0
150	75	19,0	22,6	3,6	28,0

(1) C'est à ce moment qu'on ajoute de l'ABIA.

dégrader une molg d'ABIA, on pourra calculer la quantité d'ABIA qui a été détruite. Les résultats de cette série d'essais figurent dans le tableau 1.

Pour comparer cette méthode avec la technique colorimétrique, nous nous sommes servi d'un extrait absolument semblable, mais qui diffère de ceux qu'on utilise habituellement. Nous avons utilisé des racines de 18 mm et nous avons prélevé des fragments de 9 mm de longueur (au lieu de 6). D'autre part, au lieu d'ajouter à 2 ml d'extrait 2 ml de solution-tampon, 4 ml d'eau et 2 ml d'ABIA à 50 $\mu\text{g/ml}$, nous donnons à 2 ml d'extrait, 0,5 ml de solution-tampon et 0,5 ml d'une solution d'ABIA de 100 $\mu\text{g/ml}$. Ces différences de technique expliquent, partiellement du moins, pourquoi la courbe exprimant les variations d'ABIA détruit / 200 mg de poids frais, que nous donnons dans la fig. 3 et qui correspond à un dosage colorimétrique, ne correspond pas exactement à celle, traduisant le même phénomène, qui se trouve dans la fig. 4.

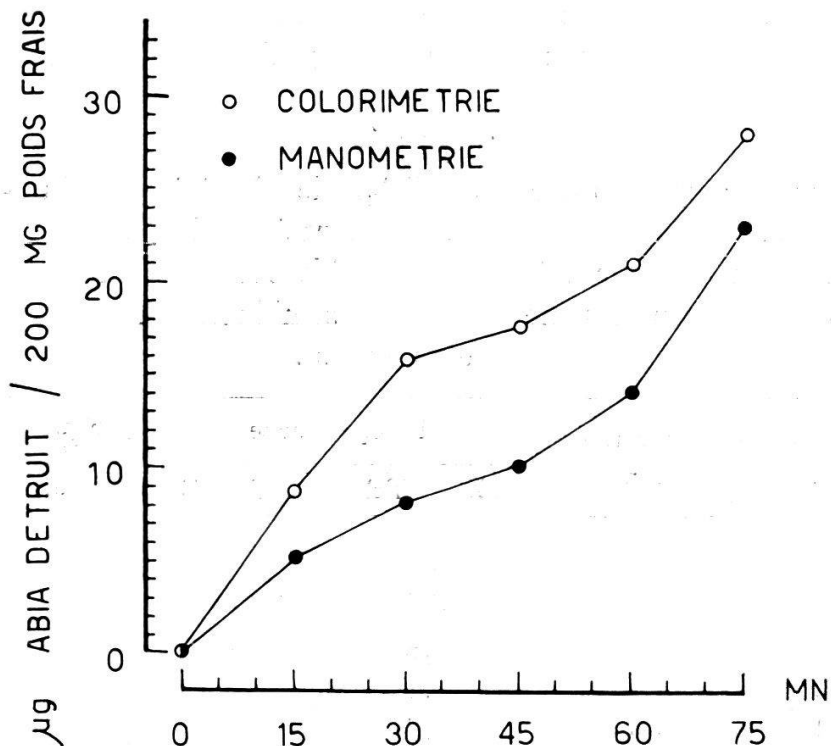


FIG. 4. — Destruction de l'ABIA en fonction de la durée d'incubation enzymatique (de 0 à 75 mn) et rapportée à 200 mg de poids frais. Comparaison des techniques colorimétrique et manométrique. L'extrait employé ici est préparé autrement que ceux qui furent utilisés plus haut (v. p. 217).

Si l'on compare (fig. 4) la courbe donnant l'ABIA détruit et obtenu à partir des résultats manométriques et celle qu'on a construite directement par des déterminations colorimétriques, on constate qu'elles ne coïncident pas. Les valeurs trouvées par la méthode manométrique sont toujours plus fortes que celles que donne la

technique colorimétrique. On peut expliquer ces différences par le fait que l'extrait enzymatique n'a pas été purifié: il contient donc vraisemblablement, ce qui n'était pas gênant pour un dosage colorimétrique, d'autres systèmes oxydasiques, activés par un traitement auxinique, mais incapables d'assurer la dégradation de l'ABIA.

4. 3. Dosage biochromatographique.

4. 3. 1. PRINCIPE.

Après une période déterminée d'incubation enzymatique, la solution active contenant l'ABIA dégradé est « reprise » par de l'éther en vue d'une application sur le papier où l'on procédera à la séparation chromatographique. Après cette opération, le papier est découpé et les divers constituants sont récupérés dans une solution où l'on mettra les fragments d'organes (racines ou tiges) pour le dosage biologique. Cette méthode dont le principe a déjà été exposé ailleurs (PILET, 1958 d), nous permet de connaître :

- 1° la valeur de l'ABIA détruit par voie enzymatique;
- 2° la nature biologique (activateur et inhibiteur de croissance) des produits qui résultent de cette dégradation.

4. 3. 2. SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE.

Qu'il s'agisse d'une analyse biochromatographique ou d'une étude radiochromatographique, la première étape des opérations à réaliser est de mettre en évidence, par chromatographie, les divers composés auxiniques contenus dans l'extrait (v. p. 217). A ce sujet, nous avons mis au point une technique dont nous rappellerons brièvement l'essentiel (v. PILET, 1958, b et d).

- a) Nous pratiquons la *chromatographie descendante* sur papier Whatmann n° 1 (46,5 cm / 56,5 cm), en utilisant le chromatobox de Pleuger.
- b) A l'aide d'une seringue (micropipette Agla) la solution à examiner est déposée (tache initiale) sur le papier; ce dernier est placé sur un erlenmeyer où l'on fait le vide et la solution étherée s'évapore immédiatement.
- c) On suspend le papier dans le chromatobox de Pleuger dont l'atmosphère est en quelque sorte saturée par l'ammoniaque. C'est ce que nous appellerons l'*équilibration*. A cet effet des godets contenant le solvant sont déposés au fond du chromatobox. L'équilibration dure une douzaine d'heures environ: elle se fait à l'obscurité et à 20° C.
- d) Après de nombreux essais préliminaires, nous avons adopté le *solvant* proposé par SEN et LÉOPOLD (1954) et amélioré par STOWE et THIMANN (1954), dont voici la composition :
isopropanol (80) — ammoniaque à 28 % (10)
eau bidistillée et déionisée (10).

- e) On place le solvant dans l'auge de diffusion et il faut attendre 18 h en moyenne pour que la distance parcourue par le solvant (mesurée entre la tache initiale et le front du solvant) soit de 45 cm environ. Dans ces conditions le R_f ⁸ de l'ABIA est compris entre 0,40 et 0,55.
- f) Le papier est alors séché dans un incubateur approprié (thermostaté; ventilation régulière; obscurité) et il y reste quelques heures.

4.3.3. RÉCUPÉRATION DES COMPOSÉS AUXINIQUES.

L'action des systèmes enzymatiques sur l'ABIA est étudiée dans des solutions aqueuses. Or pour l'analyse chromatographique, l'emploi de tels mélanges est incommode. Il convient de récupérer l'ABIA et les divers composés auxiniques formés qui restent dans la solution. Nous utilisons de l'éther sans peroxydes préparé selon le procédé de GARBARINI (1909), modifié par KULESCHA (1952). Au cours de cette « récupération » de produits actifs, nous perdons toujours une certaine quantité de composés dont il faut évidemment tenir compte. Une correction est par conséquent nécessaire; voici comment nous proposons de l'établir (PILET, 1960 c).

Facteur de correction α : En général, à 8 ml d'extrait aqueux (2 ml d'extrait concentré + 2 ml d'H₂O + 4 ml sol.-tampon de pH 6,1), nous ajoutons 2 ml de solution d'ABIA à 50 μ g/ml, ce qui fait donc qu'initialement notre solution de 10 ml contiendra 10 μ g/ml d'ABIA. L'incubation étant achevée, nous prélevons 4 ml du mélange qui, s'il n'y avait pas eu d'inactivation enzymatique, devraient contenir au total 40 μ g.

A ces 4 ml (et nous répétons deux fois l'opération, ce qui est possible puisque nous avons au total 10 ml), nous ajouterons :

- a) quelques gouttes d'acide tartrique (solution aqueuse de 0,1 M). on amène ainsi le pH du mélange à 4,5. On contrôle au pH-mètre. Pratiquement on utilise 1 ml de cette solution. On sait en effet (v. PILET, 1960 d) que c'est à un pH compris entre 6 et 4 que la « récupération », par l'éther, de l'ABIA contenu dans une solution aqueuse est la meilleure.
- b) on complète alors (ballon jaugé) à 10 ml en ajoutant de l'éther sans peroxydes, préparé comme on vient de le voir plus haut. En général, on utilise très exactement 5 ml d'éther.

Après agitation (obscurité), on conserve le mélange environ 120 mn au frigidaire (+ 2° C), on récolte l'éther (3 ml environ) en utilisant des pipettes à un trait. On le condense, sous pression réduite, et on ramène son volume à 0,5 ml.

⁸ Rappelons que le R_f est le rapport entre la distance (e) qui sépare la tache initiale de la substance isolée et la distance (H) parcourue par le solvant : $R_f = e/H$.

En principe, si tout l'ABIA a passé dans l'éther et si la dégradation de l'ABIA est négligeable, on peut évaluer la quantité d'ABIA qu'on devrait trouver théoriquement :

Nous étions partis de 10 ml de solution contenant deux fois 50 μg , c'est-à-dire 100 μg . Par conséquent les 4 ml prélevés devaient contenir 40 μg . Il s'ensuit que les 10 ml du mélange (solution aqueuse + acide tartrique + éther) contiendraient 40 μg . Comme nous avons utilisé 5 ml d'éther, dont nous supposons que la récupération a été totale, nous pouvons alors admettre que ces 5 ml d'éther contiennent les 40 μg d'ABIA. Les 3 ml d'éther récoltés (séparés de la phase aqueuse) correspondent pratiquement à tout l'éther récupéré, le reste ayant été évaporé. Ramené à 0,5 ml, cet éther contient donc théoriquement 40 μg d'ABIA. En fait, nous sommes obligés de constater :

- 1° que de l'éther est resté en contact avec la phase aqueuse;
- 2° que de l'ABIA est demeuré dans cette phase aqueuse.

Il est bien clair que ce chiffre n'est jamais atteint. Pour trouver la correction à apporter, nous réaliserons un essai à blanc où les 8 ml d'extrait aqueux sont remplacés par une solution-tampon de pH 6,1. En opérant comme précédemment, et en travaillant sur de l'ABIA marqué par du C^{14} (v. radiochromatographie, p. 235), on peut trouver, avec une bonne précision, le titre des 2 ml d'éther. On compare ce titre avec celui que théoriquement il devrait avoir et on répète l'opération avec diverses concentrations (sol. d'ABIA de 10 à 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

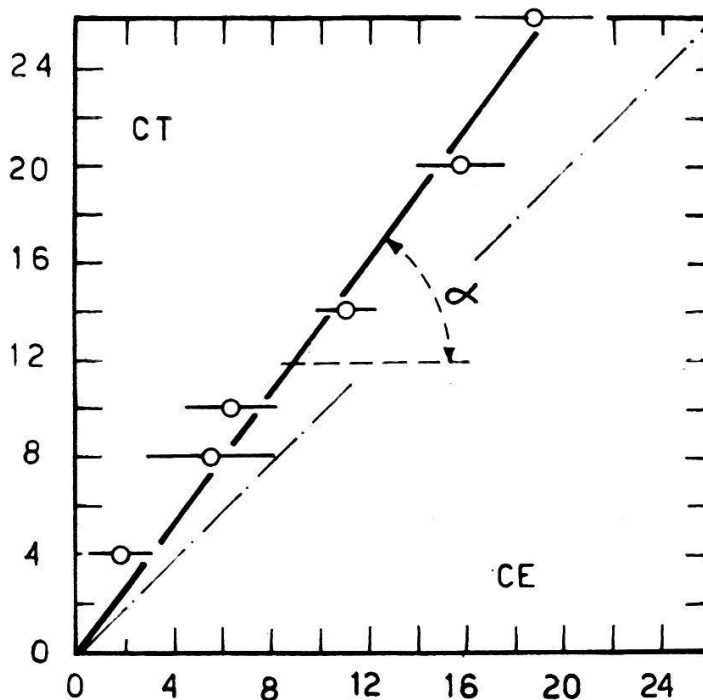


Fig. 5. — Recherche du coefficient de correction α .
 CT: concentration théorique; CE: concentration expérimentale.
 La concentration d'ABIA (CT et CE) est donné en $\mu\text{g}/\text{ml}$

On peut construire un graphique (fig. 5) dans lequel on rapportera le titre théorique calculé et celui qu'on a obtenu expérimentalement avec un extrait inactif. Le coefficient angulaire de la droite théorique ainsi construite correspond au facteur de correction (α) qu'on utilisera par la suite. Il suffira tout simplement de multiplier le résultat obtenu par α . Une telle méthode est absolument comparable à celle que nous utilisons pour établir (analyse chromatographique) le coefficient de régression β (v. p. 231).

4.3.4. TESTS BIOLOGIQUES.

Le dosage de l'ABIA et des divers composés auxiniques séparés chromatographiquement est réalisé grâce à l'emploi de deux types de tests différents, mais provenant de la même plante (*Lens culinaris*) qui a servi, du moins dans les essais dont il est fait mention ici, à la préparation des extraits enzymatiques. Il s'agit :

a) de tests « Racines » (R) b) de tests « Tiges » (T)

Primitivement, nous avons proposé (PILET, 1958 b) un *test R* et un *test T* basés respectivement sur l'emploi de pointes de racines et de fragments d'épicotyle; plus récemment, nous avons modifié légèrement la technique de préparation de ces tests (PILET et COLLET, 1959 a), puis proposé (PILET, KOBR et SIEGENTHALER, 1960) une variante du test R que nous appellerons, dans cette étude, *test R'* et qui, avec le matériel actuellement utilisé, est plus sensible. Les caractéristiques essentielles de ces trois tests figurent dans le tableau 2.

A chacun de ces tests, correspond une *courbe étalon* (fig. 6) dont nous vérifions, à chaque série d'essais, quelques points. Cette courbe donne les variations d'allongement en % d'inhibition ou de stimulation d'un test donné en fonction de la concentration d'ABIA employée. Elle nous permet, compte tenu des facteurs α et β , de traduire en équivalents d'ABIA les concentrations des composés isolés chromatographiquement et qui présentent une action sur l'allongement du test utilisé.

4.3.5. ELUTION.

Les papiers chromatographiques, une fois la séparation réalisée, sont découpés en bandes transversales correspondant chacune à une fraction de Rf déterminé (par ex. Rf : 0,10 à 0,15 — 0,15 à 0,20, etc...). Ces papiers sont plongés dans des solutions dont la nature diffère suivant le test utilisé :

Test R : solution aqueuse de glucose ($5 \cdot 10^{-6}$ M) ; pH : 5,7.

Test R' : solution de saccharose 1 % dans la solution-tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$; pH 5,1.

Test T : solution aqueuse de saccharose ($6 \cdot 10^{-2}$ M) ; pH 6,1.

Après 12 h, les papiers sont retirés des godets contenant respectivement 10 ou 4 ml de la solution d'« élution ».

TABLEAU 2.

Caractéristiques techniques des trois tests biologiques employés :

Test R : sections de racines du *Lens*

Test R' : *idem*

Test T : sections de tiges du *Lens*

Caractéristiques	Test R	Test R'	Test T
<i>Sections:</i>			
nature	Pointe de racine	Pointe de racine	Entre-nœud d'épicotyle
longueur	5 mm	3,3 mm	5 mm
nb. sections/essai	100	60	60
<i>Solutions actives:</i>	eau déionisée	sol. tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$	eau déionisée
volume	10 ml	10 ml	4 ml
concentration en:			
glucose	$5 \cdot 10^{-6}$ M	—	—
saccharose	—	1 ‰	$6 \cdot 10^{-2}$ M
pH	5,7	5,1	6,1
<i>Culture (obscurité)</i>			
température	20,5°C	25°C	25°C
nature	sur filtre	sur filtre	immersion, agitation
mesure de l'allongement après :	48 h	12 h.	9 h

4. 3. 6. CORRECTION DES RÉSULTATS.

Les valeurs correspondant à la quantité de composés auxiniques isolés seront évidemment trop faibles, car des pertes de tout ordre sont à craindre (inactivation au cours de la séparation chromatographique, adsorption des substances actives, etc...). Comme précédemment, on peut introduire un facteur de correction que nous avons appelé (PILET, 1958 d) à la suite d'AUDUS et TRESH (1953) *facteur*

de régression et que nous désignerons ici par β pour le distinguer du facteur α précédemment défini.

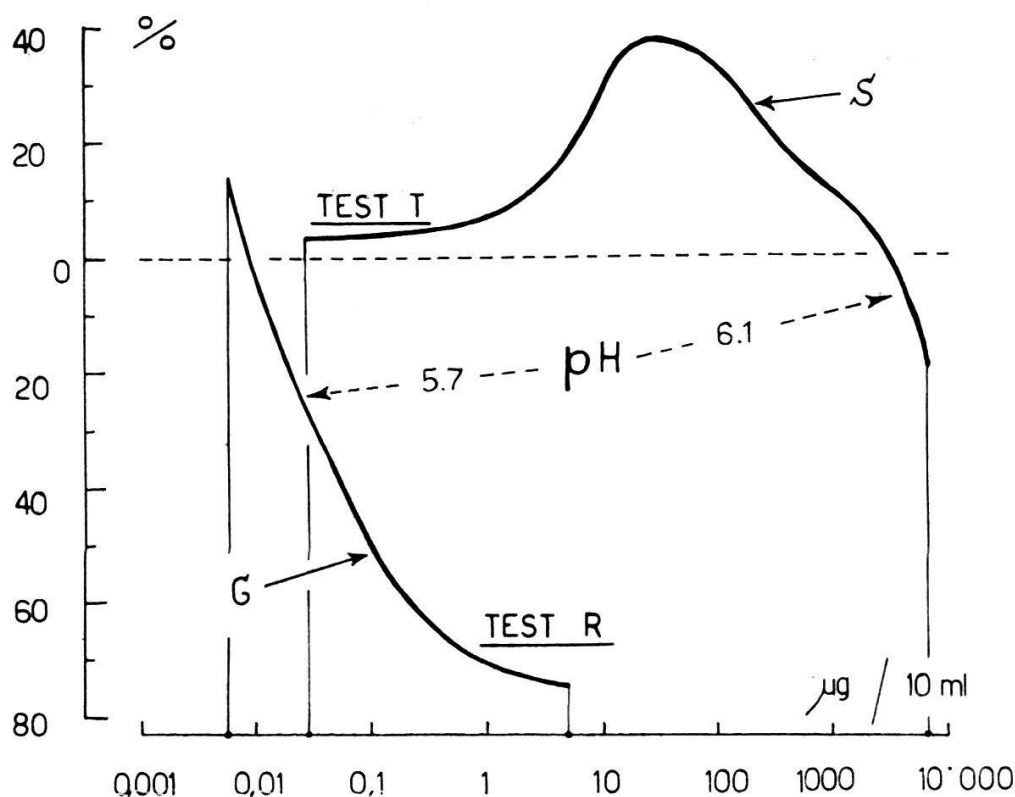


FIG. 6 — Courbe étalon. On a reporté le % d'action de l'ABIA (stimulation (+) ou inhibition (—)) sur la croissance (élongation) des tests T (fragments de tiges du *Lens*) et R (pointes de racines du *Lens*), en fonction de la concentration (en $\mu\text{g}/10\text{ ml}$) d'ABIA employé (solution aqueuse tamponnée contenant du saccharose (S) ou du glucose (G)).

Des quantités connues d'ABIA (solution témoin sans extrait enzymatique) sont chromatographiées. L'analyse biologique est ensuite entreprise et le % de croissance du test est traduit en termes d'ABIA à l'aide de courbes étalons. Par conséquent (fig. 7) à une concentration donnée CD correspond une concentration évaluée expérimentalement CE. Supposons que rien n'a été perdu, alors $CD = CE$ et nous obtenons une droite dont le coefficient angulaire = 1; supposons que la perte qu'on veut évaluer corresponde à P, on a :

$$CD = CE + P$$

la droite de correspondance aura une pente que nous appellerons β et la perte P en % vaudra :

$$\beta = \frac{CD}{CE} > 1 \quad P \% = \frac{|\beta - 1|}{\beta} \cdot 100$$

Il suffira de multiplier par β les valeurs d'ABIA trouvées.

4. 3. 7. EXPRESSION DES RÉSULTATS.

Depuis les recherches de BENTLEY (1950) et de LEXANDER (1953) surtout, on a pris l'habitude de représenter les % d'allongement du test utilisé (inhibition (—) ou stimulation (+)) en fonction du Rf obtenu; les graphiques ainsi construits ont été appelés, improprement d'ailleurs, histogrammes. La comparaison des divers histogrammes n'est

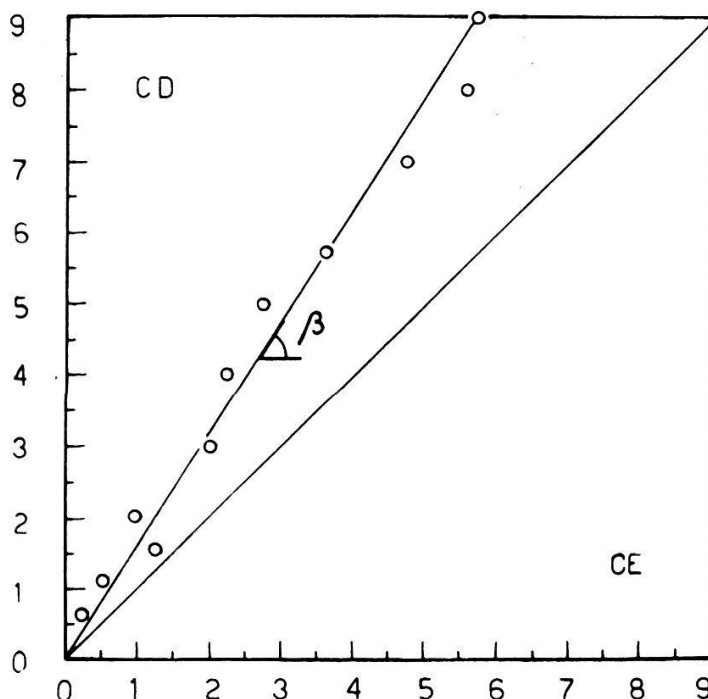


FIG. 7. — Recherche du coefficient de correction β (facteur de régression) CD : concentration donnée — CE : concentration expérimentale. La concentration d'ABIA (CD et CE) est donnée en $\mu\text{g/ml}$.

pas toujours commode; en effet chaque graphique est construit pour un poids frais déterminé. D'autre part, les valeurs données ne sont pas encore ou pas complètement corrigées. C'est pourquoi, à l'histogramme doit s'ajouter un tableau qui, toutes corrections faites, donne les résultats définitifs.

4. 3. 8. RÉSULTATS.

Histogrammes : nous donnerons en premier lieu quelques résultats obtenus avec les tests R, R' et T pour des extraits enzymatiques mis en contact durant 150 mn avec de l'ABIA. Nous comparerons les valeurs trouvées avec celles qui concernent l'emploi de l'ABIA non dégradé initialement (c'est-à-dire pour un temps d'incubation de 0 mn).

Examinons tout d'abord (fig. 8) quelques résultats fournis par l'emploi des tests R et R' qui, comme on l'a montré, ont vis-à-vis

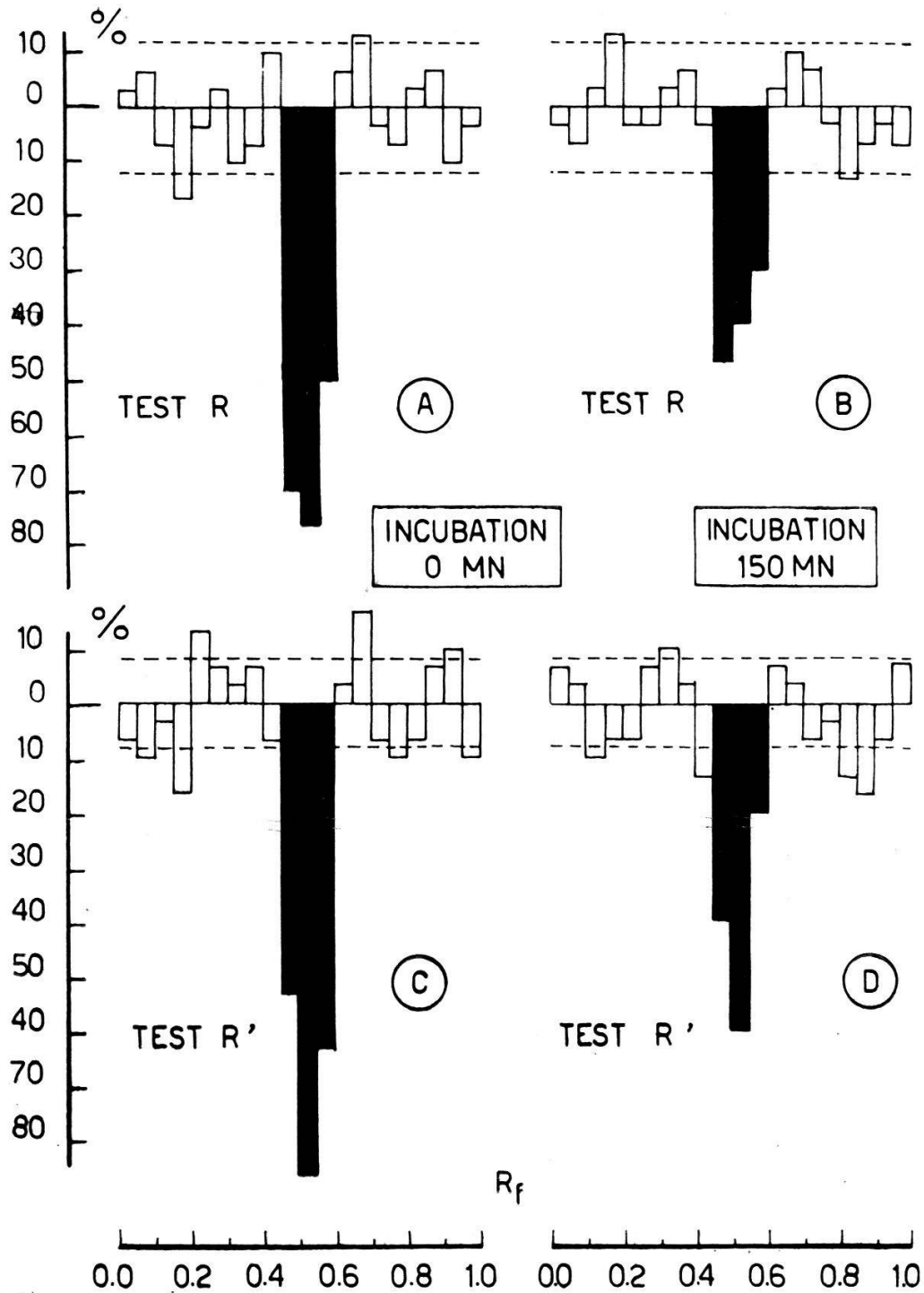


FIG. 8. — Bio-histogrammes.

Le dosage biologique des produits formés à partir de l'ABIA, dont la présence est rappelée par les zones noires, est fait en employant les deux tests «points de racines du *Lens*» (tests R (A et B) et R' (C et D)). Les solutions d'ABIA chromatographiées ont été utilisées soit immédiatement après leur préparation (A et C), soit après un contact (incubation enzymatique) de 150 mn (B et D) avec des extraits radicaux de nature auxines-oxydasique. On a reporté, en fonction du R_f , le % d'action des composés isolés sur l'allongement des tests employés.

de l'ABIA des sensibilités de croissance différentes. On peut constater ceci :

1. Les histogrammes des tests R sont pratiquement semblables à ceux des tests R'. L'ABIA qui se fixe dans les zones de Rf compris entre 0,45 et 0,60 est mis en évidence par une forte inhibition du test biologique utilisé.

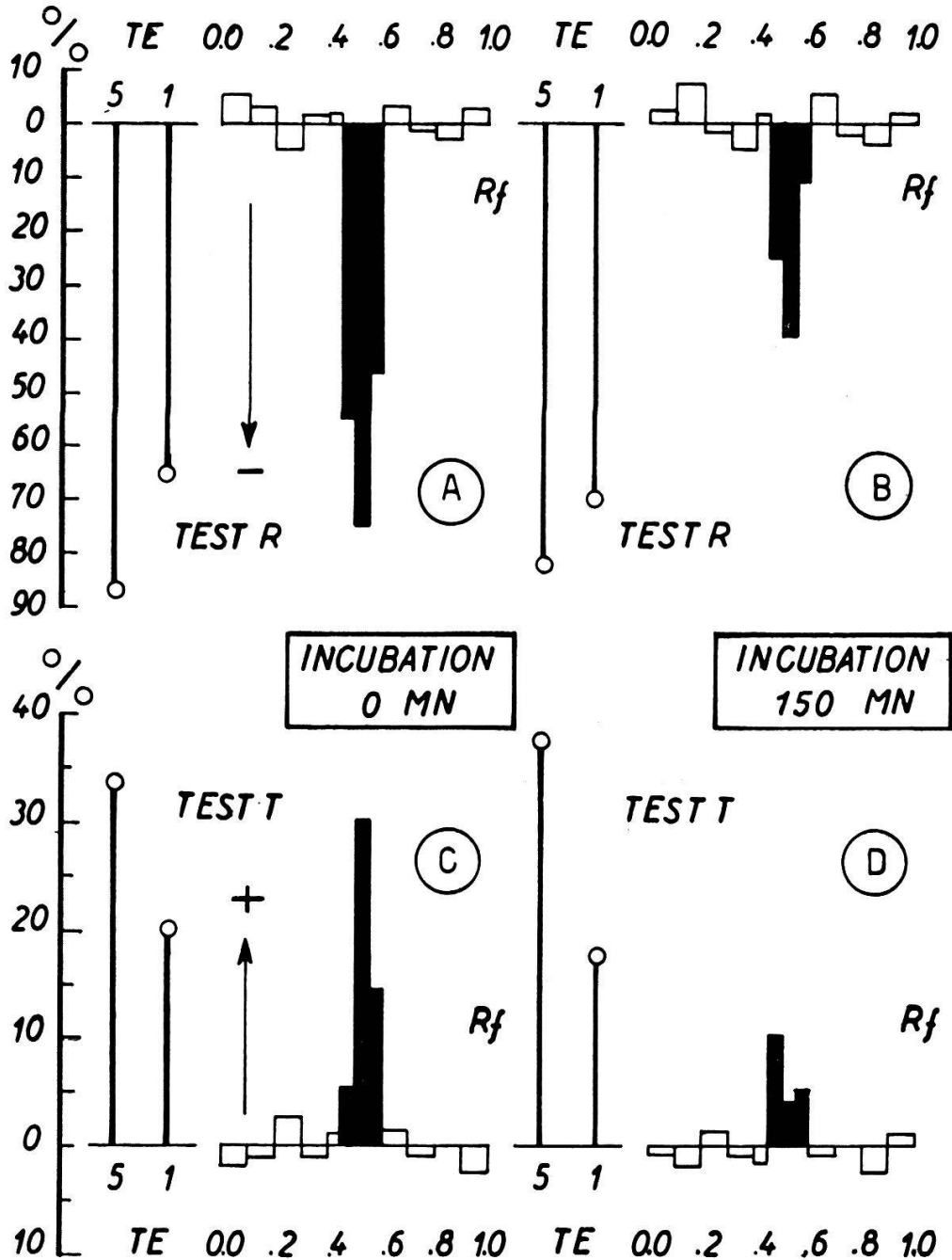


FIG. 9. — Bio-histogrammes.

Mêmes expériences que celles exposées dans la fig. 8.

Emploi de deux tests comparatifs : Test R (pointes de racines du *Lens* ; A et B).

Test T (fragments de tiges du *Lens* ; C et D).

Les solutions d'ABIA chromatographiées ont été utilisées soit immédiatement (A et C) soit après avoir été en contact 150 mn avec un extrait auxines-oxydasique (B et D). Des essais témoins (test biologique) ont été réalisés avec des solutions d'ABIA à 5 et 1 µg/ml de substance active.

2. Après une incubation enzymatique de 150 mn, la concentration de l'ABIA diminue nettement; ceci se traduit par une sensible réduction de l'allongement du test (aussi bien pour le test R que pour le test R').

Si nous comparons (fig. 9) les histogrammes obtenus pour les tests R et T, les conclusions sont identiques :

1. la présence d'ABIA se traduit par une forte inhibition du test R et par une nette stimulation du test T.
2. après une incubation enzymatique de 150 mn, la concentration de l'ABIA est fortement réduite et ceci se traduit par une diminution de l'inhibition d'allongement du test R et par l'accélération de croissance du test T.

Dosages quantitatifs : comme nous le disions plus haut, les valeurs données dans un histogramme sont essentiellement qualitatives. En reprenant les résultats obtenus par des mesures d'allongement des tests R et T, en effectuant les calculs de correction indispensables, on peut tirer de ces essais des valeurs quantitatives. Nous nous bornerons ici à analyser les chiffres correspondant à une zone de Rf comprise entre 0,45 et 0,60 (ABIA).

TABLEAU 3.

Destruction enzymatique de l'ABIA (extrait obtenu à partir de pointes (6 mm) de racines du *Lens* de 18 mm de long). Résultats donnés par l'analyse biochromatographique
Temps d'incubation (T) en mn.
(utilisation des tests R et T).

T	μg ABIA détruits/200 mg poids frais	
	Test R	Test T
30	5,7	28,6
60	56,5	29,4
90	57,1	43,0
120	60,2	66,5
150	60,0	67,3

L'examen du tableau 3 montre des différences appréciables, du moins pour un temps d'incubation peu élevé, entre les valeurs données par le test R et celles du test T. Toutefois la grandeur des chiffres obtenus est approximativement du même ordre et on peut considérer, aux erreurs près de la méthode et en tenant compte des variations biologiques des tests, que des valeurs comme celles qu'on a trouvées pour une incubation de 50 mn sont équivalentes.