Zeitschrift: Mémoires de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles

Herausgeber: Société Vaudoise des Sciences Naturelles

Band: 12 (1958-1961)

Heft: 6

Artikel: Étude du catabolisme des auxines marquées par du radiocarbone : méthodes et premiers résultats

Autor: Pilet, Paul-Emile / Lerch, Pierre

Kapitel: Comparaison des techniques

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-257915

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 17.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

ment, pout-être sous l'action des mêmes systèmes enzymatiques, il se dégrade lui aussi. Dans ce cas, rien ne nous empêche d'admettre que les produits II et III résulteraient non seulement de la décomposition de l'ABIA, mais pourraient se former aussi aux dépens du produit I.

La dégradation de l'ABIA se déroulerait ainsi en deux étapes :

1) raccourcissement de la chaîne latérale avec formation de la β-indolyl-aldéhyde (produit I);
2) dégradation du noyau (décyclisation du pyrrole) avec formation soit directement à partir d'ABIA, soit (ce qui est plus probable) aux dépens du produit I, des produits II et III.

9. COMPARAISON DES TECHNIQUES

Nous nous proposons de comparer les différentes techniques précédemment examinées avec la méthode radiochromatographique. Mais remarquons tout d'abord que l'ABIA marqué par du C^{14} (ABIA*) étant une substance coûteuse, dans bien des cas nous nous sommes bornés à travailler sur l'ABIA non marqué. Il était indispensable de s'assurer si, du point de vue réaction chimique (test de coloration au réactif de Salkowski modifié, v. p. 219) ou biologique (dosage colorimétrique de l'activité enzymatique) l'ABIA* se comportait comme l'ABIA non marqué.

9.1. ABIA* et ABIA.

Nous avons dit que nous disposions de deux types d'ABIA* :

1° l'$ABIA^*_{(1)}$: acide β-indolyl-acétique [C^{14} α]
2° l'$ABIA^*_{(2)}$: acide β-indolyl-acétique [C^{14} α']

Seule la première de ces deux substances est employée dans le dosage radiochromatographique. Nous utiliserons, pour ces essais comparatifs, simultanément les trois produits.

9.1.1. Recherche du coefficient colorimétrique.

Nous préparons des solutions aqueuses d'ABIA, et à l'aide du réactif décrit plus haut, nous déterminons au colorimètre de Klett-Summerson, le développement de la coloration (rouge) prise par la solution. Les résultats contenus dans le tableau 10 nous permettent les remarques suivantes :

1. Il n'y a pratiquement aucune différence dans les valeurs données au colorimètre, après coloration par le réactif entre de l'ABIA et de l'$ABIA^*_{(2)}$.
2. Les coefficients colorimétriques de solution d'$ABIA^*_{(1)}$ sont en général plus faibles que ceux des solutions d'ABIA et d'$ABIA^*_{(2)}$.

On peut expliquer cette observation par le fait que l'ABIA(1) est moins stable : une légère élévation de la température provoque une dégradation assez importante de ce produit. M. PICHAT, qui en a fait la synthèse, nous a d'ailleurs recommandé de le conserver à l'obscurité et à — 20°C. On sait d'autre part que le mélange de notre réactif avec de l'eau donne une réaction exothermique. En mélangeant à 8 ml du réactif, 2 ml d'une solution aqueuse d'ABIA*(2), on observe un accroissement brusque et temporaire de la température qui suffit à expliquer cette diminution de la coloration.

TABLEAU 10.

Recherche du « coefficient colorimétrique » pour des solutions d'ABIA et d 'ABIA*, colorés par le réactif usuel (v. p. 219) + CH_3CH_2OH. Emploi du colorimètre Klett-Summerson (filtre de 535 mμ).

Substances	Concentration	Lecture après	
	en μg/ml	10 mn	20 mn
ABIA	2	104 ± 6	134 ± 12
	4	196 ± 8	211 ± 15
	8	423 ± 22	417 ± 25
ABIA* (1)	2	85 ± 7	108 ± 12
	4	180 ± 8	200 ± 16
	8	400 ± 24	360 ± 27
ABIA* (2)	2	108 ± 6	130 ± 12
	4	194 ± 8	217 ± 15
	8	427 ± 21	400 ± 25

ABIA* (1) : acide β-indolyl-acétique [$C^{14}\alpha$]
ABIA* (2) : acide β-indolyl-acétique [$C^{14}\alpha'$]

9. 1. 2. SUBSTRAT ENZYMATIQUE.

On peut se demander si l'extrait enzymatique attaque de la même façon l'ABIA et l'ABIA*. Pour résoudre cette question, nous avons réalisé l'expérience suivante :

a) On prépare 20 ml d'extrait qu'on répartit en 3 lots.
b) A partir de cet extrait, on prépare (v. p. 220) la solution active en ajoutant, pour le 1er lot de l'ABIA, pour le 2e de l'ABIA*(1) et pour le 3e de l'ABIA*(2).
c) On détermine à l'aide du colorimètre, l'activité auxines-oxydasique.

d) Il convient de préciser que les valeurs trouvées sont calculées à partir de courbes étalons construites chacune pour l'ABIA (ou l'ABIA*) employé.

On peut remarquer (tableau 11) qu'aux variations près de l'expérience, les résultats sont parfaitement semblables, d'où la conclusion que la présence du C^{14} dans le cycle ou dans la chaîne, ne modifie en aucun cas les processus de dégradation de l'ABIA par un système auxines-oxydasique.

TABLEAU 11.

Analyse colorimétrique de solutions d'ABIA et d'ABIA* inactivés par des extraits auxines-oxydasique (pointes (6 mm) de racines du *Lens* de 18 mm)

L'activité enzymatique est donnée en μg d'ABIA (ou d'ABIA*) détruit / 200 mg de poids frais

Le même extrait a été utilisé pour les trois séries d'essais.

Substances	Incubation en mn			
	15	30	60	150
ABIA	26 ± 5	40 ± 9	48 ± 10	59 ± 12
ABIA*$_{(1)}$ (1)	22 ± 6	47 ± 9	57 ± 8	57 ± 11
ABIA*$_{(2)}$ (1)	27 ± 5	38 ± 8	51 ± 9	63 ± 10

(1) Ces valeurs sont calculées à partir de courbes étalons construites pour les mêmes substances.

9. 2. Radiochromatographie et colorimétrie.

Nous préparons 20 ml d'extrait dont 10 seront destinés à un dosage colorimétrique et 10 à une analyse radiochromatographique. Nous donnerons pour diverses périodes d'incubation (fig. 23) l'activité auxines-oxydasique en :

a) % de C^{14} disparu de la zone de l'ABIA du chromatogramme
b) μg d'ABIA détruits pour 0,1 mg d'azote protéinique.

Ainsi qu'on peut le voir, les résultats correspondent assez exactement, la marge d'erreur allant d'ailleurs en augmentant au fur et à mesure que se prolonge l'incubation.

9. 3. Radiochromatographie et manométrie.

Comme nous l'avons fait remarquer plus haut (v. p. 224) la méthode manométrique est discutable, de plus elle ne se prête guère à des mesures colorimétriques exactement comparables. Il est donc, à plus forte raison, difficile de mettre en parallèle les résultats obtenus par une analyse manométrique et par un dosage radiochromatographique. La concentration relative de l'extrait, les conditions

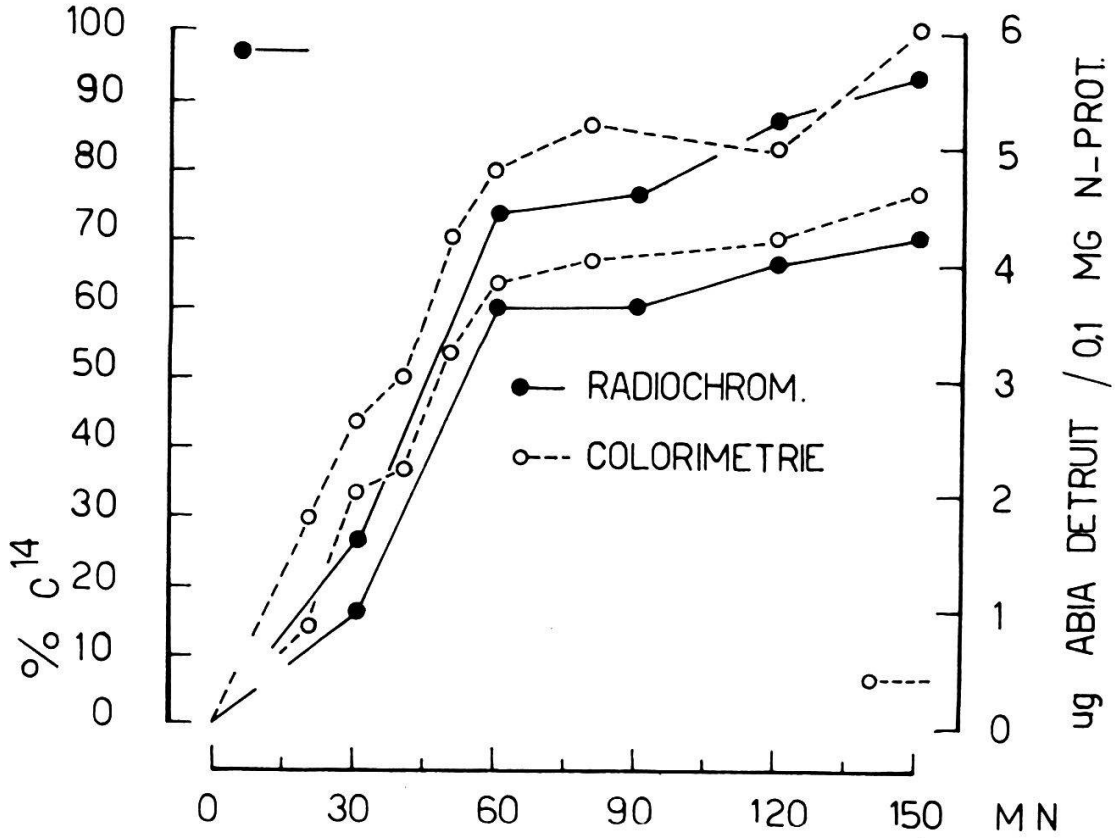

Fig. 23. — Destruction enzymatique de l'ABIA marqué par des extraits radiculaires de nature auxines-oxydasique. Comparaison des méthodes radiochromatographique et colorimétrique.
L'ABIA détruit est rapporté pour la première technique en % de C^{14} qui a disparu de la zone correspondant au Rf de l'ABIA et pour la seconde méthode en µg d'ABIA détruit pour 0,1 mg d'azote protéinique.
La durée de l'incubation enzymatique est donnée en mn.

d'incubation sont trop inégales pour qu'on puisse placer sur un même plan ces résultats évidemment très disparates. Les grandes variations observées, étant donné les comparaisons entre les dosages colorimétriques et manométriques seraient dues ainsi essentiellement aux différences relativement grandes qu'imposent les techniques d'analyse.

9. 4. Radiochromatographie et biochromatographie.

Comme précédemment nous préparons suffisamment d'extrait pour évaluer parallèlement l'activité des auxines-oxydases par la technique radiochromatographique et par l'analyse biochromatographique. Nous comparerons tout d'abord les résultats obtenus par :

1° le dosage radiochromatographique où l'on donnera l'ABIA détruit en % de C^{14} disparu des zones de Rf correspondant à l'ABIA, ceci en fonction de la durée d'incubation ;

2° le dosage biochromatographique où l'on donnera les valeurs trouvées

a) avec le test R

b) avec le test T.

L'activité auxines-oxydasique sera caractérisée par l'ABIA détruit en g pour 200 mg PF.

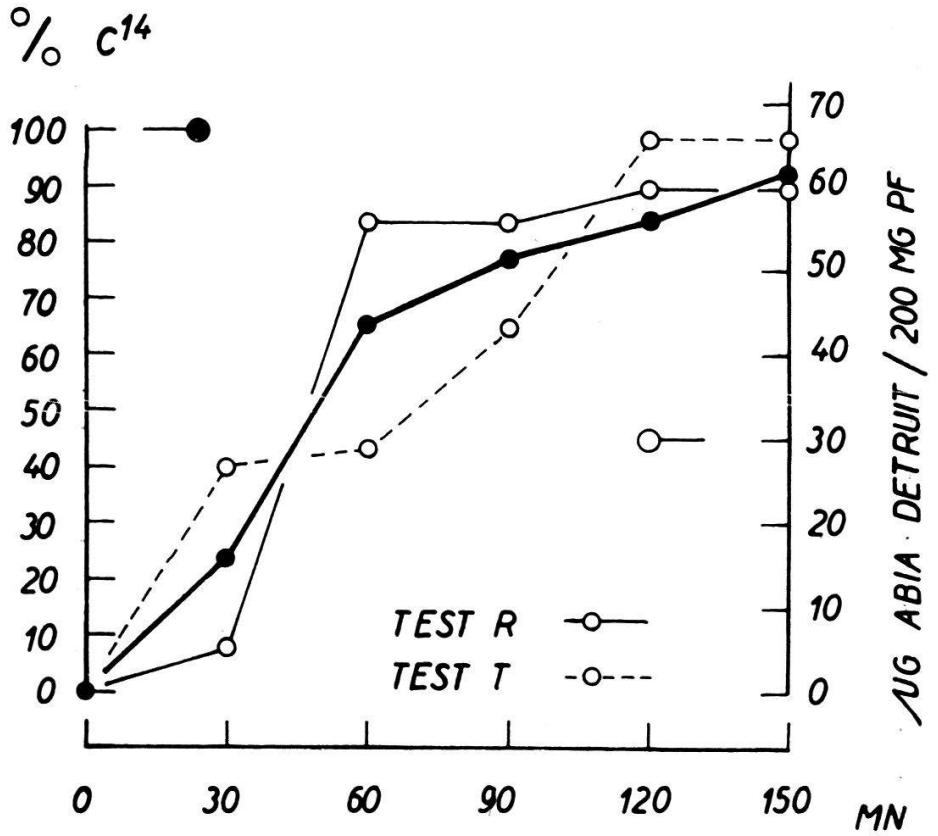

FIG. 24. — Destruction enzymatique de l'ABIA marqué par des extraits radiculaires de nature auxines-oxydasique. Comparaison des méthodes radiochromatographique et biochromatographique.
L'ABIA détruit est rapporté, pour la première méthode, en % de C^{14} qui a disparu de la zone correspondant au Rf de l'ABIA et pour la seconde technique (emploi de deux tests biologiques: les tests R et T) en µg d'ABIA détruit pour 200 mg de poids frais.
La durée de l'incubation enzymatique est donnée en mn.

Ainsi qu'on peut le voir dans la fig. 24, les résultats sont très proches les uns des autres et, du moins pour un temps d'incubation peu élevé, les valeurs données par le dosage radiochromatographique

restent comprises entre les valeurs extrêmes fournies par l'analyse biochromatographique (tests R et T).

Nous avons vu que la méthode radiochromatographique permettait de caractériser les produits qui se formaient par dégradation enzymatique de l'ABIA*. Mais nous avons montré aussi que la technique biochromatographique permettait de déceler, par une mesure de l'allongement des tests appropriés, les propriétés biologiques (activation, inhibition, sans action) des composés isolés pour les diverses zones du chromatogramme (Rf différents). Pour comparer les résultats donnés par ces deux méthodes, nous pouvons mettre en parallèle les valeurs fournies :

1° par le dosage radiochromatographique; dans ce cas on rapportera le % de C^{14} trouvé tout le long du chromatogramme,
2° par le dosage biochromatographique; on donnera un histogramme (% d'action sur le test en fonction du Rf). Pour la comparaison, nous choisirons les valeurs obtenues à l'aide du test R.

Nous reporterons les résultats pour des extraits incubés pendant 150 min.

La fig. 25 nous permet de tirer les conclusions suivantes :

1° dans la zone de Rf de l'ABIA, on observe parallèlement une forte inhibition du test R (beaucoup moins prononcée cependant que pour un temps d'incubation nul ou faible et une certaine quantité de C^{14} ;
2° le dosage radiochromatographique révèle la présence de produits également marqués par du C^{14}, mais distincts de l'ABIA puisque leur Rf est différent. Or une analyse biochromatographique ne donne pas pour ces produits, mis en évidence par la présence de C^{14}, des modifications appréciables dans l'allongement des tests employés.

Comment interpréter ces résultats ?

Tout d'abord, et c'est une première hypothèse, nous pouvons supposer que les produits formés ne sont pas doués d'activité biologique particulière. Ceci serait conforme avec l'idée qu'on se fait de la dégradation de l'ABIA où l'on a envisagé l'apparition de substances inactives. Toutefois, il semble vraisemblable que les produits intermédiaires (produit I par exemple) soient doués d'une certaine activité biologique, plus faible que celle de l'ABIA. Or ces observations nous montrent que le produit I, loin d'activer l'allongement du test, paraît même inhiber sa croissance (ces valeurs pourtant ne sont guère significatives).

Il reste alors une seconde possibilité. Les substances formées à la suite de la décomposition de l'ABIA, sous l'action de systèmes enzymatiques, sont évidemment très peu concentrées par rapport à

l'ABIA qui n'a pas encore été dégradé. En admettant qu'elles possèdent une certaine activité biologique, mais beaucoup plus faible que celle de l'ABIA, on comprend qu'un test biologique ne puisse permettre de les caractériser. Ainsi la méthode de dosage radiochromatographique est-elle beaucoup plus sensible que la technique d'analyses biochromatographiques.

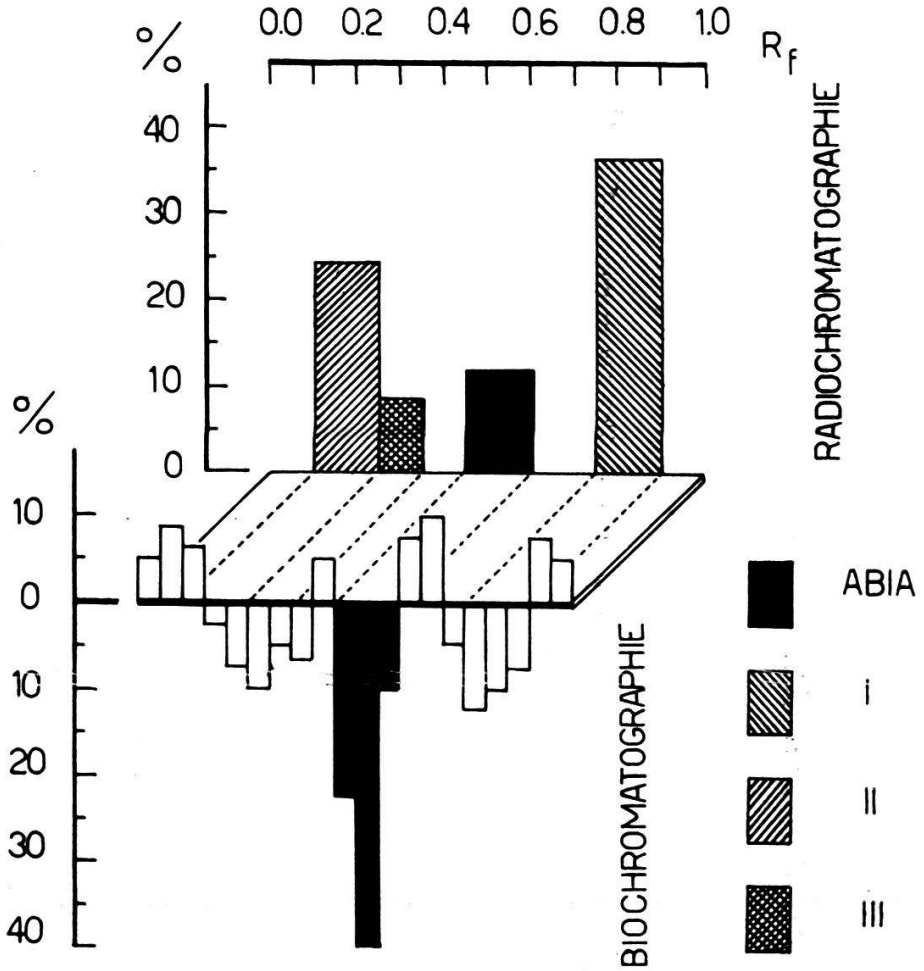

Fig. 25 — Comparaison des résultats obtenus par les méthodes radiochromatographique et biochromatographique. L'ABIA marqué par du radiocarbone est placé 150 mn en contact avec un extrait auxines-oxydasique préparé à partir de pointes de racines du *Lens*. On note la présence, outre de l'ABIA, de trois catégories de produits (I, II et III) formés à partir de l'ABIA.
Dans la technique radiochromatographique, les résultats sont donnés en % (+ : stimulation : — ; inhibition) des composés isolés sur le test R.
Dans la technique biochromatographique, les résultats sont donnés en % d'action de C^{14} détecté dans les diverses zones du chromatogramme.

9. 5. Discussion.

Nous allons comparer les avantages et les inconvénients des diverses méthodes proposées pour l'analyse de l'activité des systèmes auxines-oxydasiques. Dans cette discussion générale, nous laisserons de côté la *technique manométrique* qui, comme on l'a vu, n'est pas

à l'abri de critiques graves. Nous ne retiendrons que la *méthode colorimétrique*, la *technique biochromatographique* et le *dosage radiochromatographique*, et nous ferons, à ce propos, les remarques suivantes :

1) La méthode colorimétrique est rapide. Elle permet de connaître avec précision la quantité d'ABIA détruit (donc l'activité auxines-oxydasique). Mais cette technique ne fournit aucune indication sur la nature chimique, les propriétés biologiques et la concentration relative des composés résultant de la dégradation de l'ABIA.
2) La méthode biochromatographique permet d'évaluer approximativement le degré d'inactivation auxinique. Cette technique offre la possibilité de caractériser (en donnant leur Rf) les produits qui se forment par dégradation enzymatique de l'*ABIA*. De plus, elle fournit d'utiles renseignements quant aux propriétés biologiques (activateur ou inhibiteur de croissance) de ces composés. Mais cette technique est longue et délicate. Elle fait appel à des tests biologiques dont la variabilité est évidemment très grande.
3) La méthode radiochromatographique donne des indications précises (dosage quantitatif) sur la destruction de l'ABIA. Elle permet de distinguer les composés qui résultent de la décomposition, sous l'action des auxines-oxydases, de cette substance. Mais on ne peut utiliser, dans ce genre d'analyse, que des substances marquées, en général très coûteuses (surtout s'il s'agit de produits contenant des isotopes dans leur noyau). Enfin, cette technique ne fournit des renseignements que lorsqu'il s'agit de produits marqués, or il est évident par exemple que l'acide β-indolyl-acétique [C^{14} α], par dégradation enzymatique, peut donner d'autres corps qui ne contiennent pas nécessairement de C^{14}. Cette méthode est extrêmement sensible, elle permet de déceler de petites quantités de produits marqués par du C^{14} qui se forment à partir de l'ABIA et qu'un dosage biochromatographique ne pouvait pas mettre en évidence.
4) En conclusion, si la méthode colorimétrique offre la possibilité d'évaluer plus rapidement l'activité auxines-oxydasique que les techniques biochromatographiques et radiochromatographiques, elle ne permet pas de connaître la nature et l'importance relative des nouveaux composés formés. Les méthodes biochromatographique et radiochromatographique sont plus longues, elles exigent toutes deux une analyse chromatographique qui n'est pas sans inconvénient pour un dosage enzymatique (l'extrait peut perdre partiellement son activité). Par contre, ces

techniques donnent des indications sur les produits qui résultent de la dégradation de l'ABIA. La méthode biochromatographique permet de caractériser biologiquement ces substances, mais l'emploi de tests biologiques rend difficile et discutable l'interprétation des résultats obtenus. La technique radiochromatographique, plus sensible, est en outre plus rapide que la précédente, mais si elle permet de définir aussi les produits formés, elle ne donne pas d'indications sur leurs propriétés physiologiques.

Il est par conséquent indispensable d'utiliser parallèlement ces trois méthodes : l'analyse colorimétrique pourra être avantageusement conservée pour des mesures préliminaires, l'analyse biochromatographique sera nécessaire pour évaluer l'activité biologique des produits formés et l'analyse radiochromatographique devra être utilisée pour des dosages quantitatifs.

CONCLUSIONS GENERALES

Nous avons désormais, grâce à l'emploi de phytohormones marquées par du radiocarbone, la possibilité de doser quasi exactement et de suivre, avec une relative facilité, ces divers composés engagés dans les cycles métaboliques responsables des processus de croissance. Ni les analyses chimiques les plus précises, ni les méthodes biologiques les plus minutieuses et les mieux adaptées à ces problèmes, ni les techniques actuellement très au point que les laboratoires de physiologie et de biochimie emploient avec succès n'ont donné les résultats que fournissent les mesures radiochimiques. Aucune de ces méthodes n'avait encore permis, en ce qui concerne l'étude du catabolisme auxinique du moins, de déceler avec une précision et une sensibilité suffisantes, certains composés naturels, tant la concentration, à laquelle ces produits agissent encore efficacement, est faible.

Aujourd'hui, grâce à l'utilisation du radiocarbone fixé dans la molécule même du corps actif, on peut suivre, étape après étape, les transformations que subissent, *in vivo* et *in vitro*, les hormones de croissance dégradées par voie enzymatique. Les renseignements sur la nature chimique de ces substances, que fournissent les techniques radiochromatographiques et qui permettront de préciser le cycle de dégradation (catabolisme), comme aussi le cycle de biosynthèse (anabolisme), doivent être accompagnées d'analyses biologiques, qui compléteront heureusement ces données en fournissant des informations sur les propriétés physiologiques de ces corps.

Mais les difficultés techniques, posées par l'utilisation des produits marqués qui exigent pour leur dosage des appareils compliqués au réglage délicat et dont les caractéristiques doivent être constamment