

Matériel et méthodes

Objekttyp: **Chapter**

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

Band (Jahr): **13 (1963)**

Heft 2

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.

CHAPITRE PREMIER : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. GÉNÉRALITÉS

Tous nos essais portent sur la racine, ou des segments de la racine, du *Lens culinaris* MEDIKUS. Cette plantule a été abondamment utilisée dans notre laboratoire et il nous a paru judicieux de reprendre un matériel bien connu pour mieux comprendre les caractéristiques nouvelles que nous nous proposons de mettre en évidence.

Nous nous bornerons ici à l'exposé des procédés généraux, nous réservant de détailler, au fur et à mesure des besoins, les techniques particulières à chaque problème.

L'essentiel de notre travail nécessite une technique permettant de mesurer les paramètres de la *croissance*, et une autre visant à déterminer ceux de la *respiration*.

2. PRÉPARATION DU MATÉRIEL

Les techniques de culture ont été parfois modifiées, suivant la provenance du matériel. Nous décrirons la méthode générale, en indiquant entre parenthèses les conditions se rapportant plus particulièrement au matériel utilisé pour l'étude des gradients respiratoires.

2.1. Imbibition

Les graines sont placées 4 heures (15 heures) dans de l'eau distillée, à raison d'environ 1800 graines par litre. Après imbibition, elles sont lavées à l'eau de robinet, puis rincées soigneusement à l'eau distillée.

2.2. Mise en germination

On dépose les semences dans de grosses boîtes de Petri de 16,5 cm de diamètre, à raison de 250 environ par boîte. Les graines germent pendant 48 heures (24 heures) sur un papier filtre légèrement humidifié à l'eau distillée.

2.3. Sélection et repiquage

On sélectionne alors les plantules présentant une racine de 8-12 mm ($3 \text{ mm} \pm 1$). Les germinations sont alors repiquées dans de petites boîtes de Petri de 9 cm de diamètre, contenant un papier filtre imbibé de 5 ml d'eau distillée. 30 heures (36 heures) plus tard, les racines atteignent une longueur de 25-35 mm ($18 \text{ mm} \pm 2$). Le matériel est prêt à l'emploi. D'une façon générale, toutes les cultures se font à $25^\circ\text{C} \pm 0,25$, à l'obscurité. Toutes les opérations intermédiaires de sélection, repiquage, découpage et mesure de racines et de segments, se déroulent à la lumière verte (lampe Wild, 30 W, munie d'un filtre interférentiel Varicolor). Cette précaution évite non seulement le déclenchement des processus photosynthétiques, mais aussi une altération des auxines-oxydases, et par là une modification incontrôlable de la croissance.

3. MILIEU

Le même milieu est adopté pour les cultures de segments et pour la mesure de leur respiration.

La *constance du pH* est assurée par une solution tampon de $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1/15 M. Le pH est fixé à 4,8, car, pour l'ABIA comme pour le DNP, l'activité dépend directement du nombre de molécules non dissociées ; le pK de l'ABIA en solution aqueuse est de 4,75 (PILET et ATHANASIADES-MERCANTON, 1959), tandis que STENLID, (1949 *a*) admet une valeur de 3,3 pour le DNP.

Nos essais préliminaires ont montré que la croissance des segments nécessitait la présence d'une *source de carbone*. C'est pourquoi nous ajoutons au tampon du saccharose jusqu'à la concentration de 1 %. Toutes les mesures respiratoires, sauf indication contraire, concernent donc la respiration exogène.

Toutes les solutions actives sont préparées par dissolution directe dans le tampon saccharosé à 1 %. Un agitateur magnétique sert à la solubilisation de l'ABIA.

4. LA CROISSANCE DES SEGMENTS

4.1. Remarques préliminaires

Nous préférons travailler sur des segments, plutôt que sur des plantules entières, pour les raisons suivantes :

- 1° La mesure du taux respiratoire avec l'appareil de Warburg est liée à la diffusion des gaz à travers les tissus. Celle-ci est d'autant meilleure que le rapport entre la surface du fragment et son volume est plus grand. Ces conditions nous engagent à éliminer les plantules ou les racines entières pour les mesures de respiration.
- 2° Nos mesures préliminaires montrent que la zone radiculaire présentant la croissance la plus rapide est située dans les trois premiers millimètres à partir de l'extrémité.
- 3° Les segments doivent être cependant suffisamment courts pour que l'on puisse négliger les effets sur la croissance des réserves parenchymateuses.

C'est sur la base de ces considérations que nous coupons des segments d'une longueur initiale de 3,12 mm.

Nous avons décrit ailleurs et en détail la méthode d'obtention et de culture des segments radiculaires (PILET, KOBR et SIEGENTHALER, 1960) ; nous nous contenterons d'en discuter quelques caractéristiques.

4.2. Méthodes

La *figure 1* permet de comparer l'efficacité des deux méthodes de *découpage des segments*. Si la technique de l'excision individuelle est plus longue, elle est en revanche plus précise que celle du découpage à la « guillotine » décrite par PILET (1959 *a*). Cette première méthode paraît seule répondre à l'exigence d'une haute précision : comme le segment est découpé dans une zone où le gradient de croissance est encore appréciable, toute erreur dans la position du point de section va se traduire par une forte modification de la vitesse de croissance.

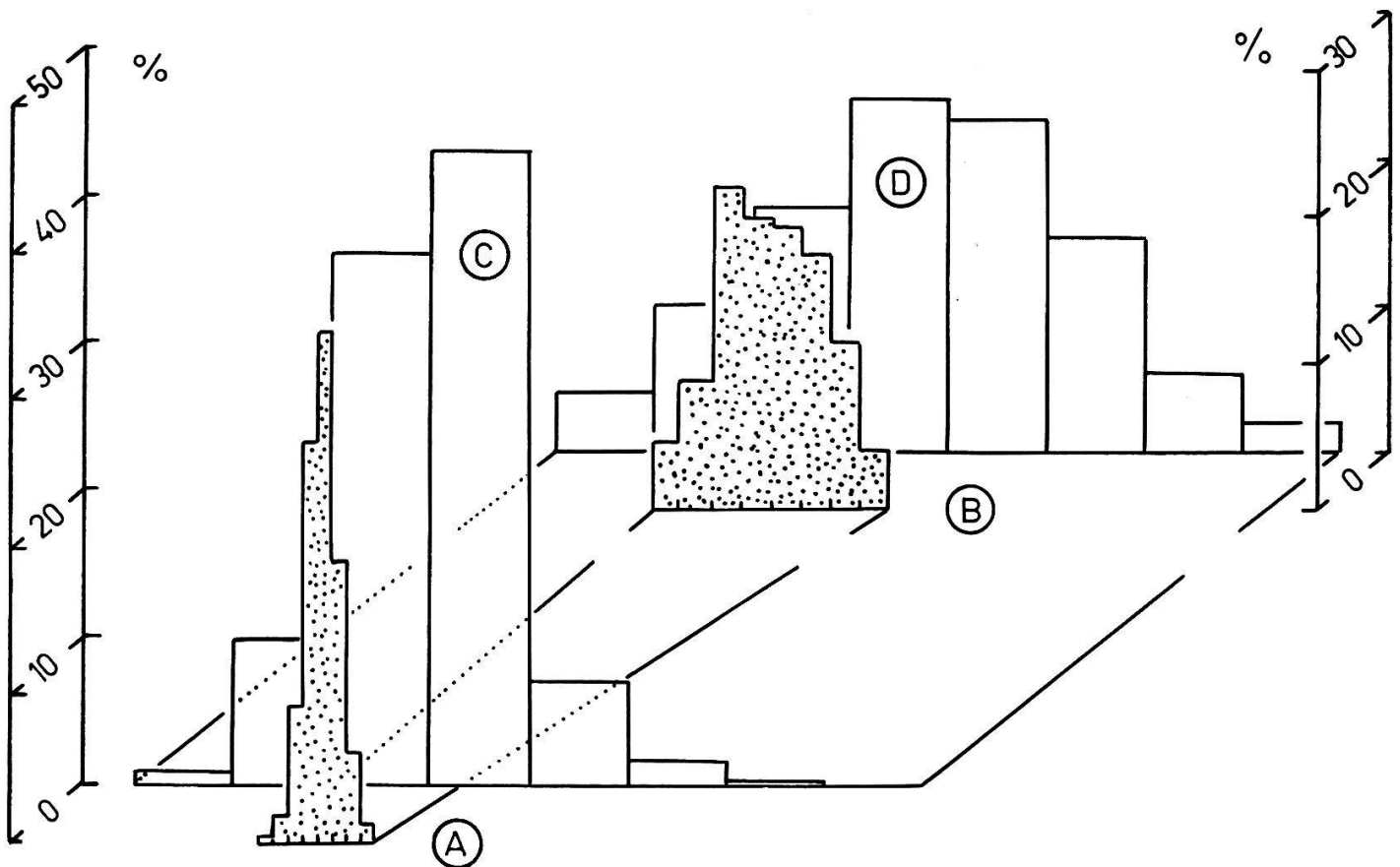


FIGURE 1

Comparaison de l'efficacité des deux méthodes de découpage des sections apicales. Répartition en huit classes des fréquences (%) des longueurs moyennes, pour 0 et pour 12 heures.

A, B : Excision individuelle.
C, D : Découpage à la « guillotine ».

La *technique de culture* est reprise de AUDUS et SHIPTON (1952) ; elle n'en diffère que par le pH choisi et par la concentration de saccharose. La *figure 2 A* permet de comparer la technique que nous employons avec celle précédemment utilisée par PILET (1958). Elle montre aussi l'influence favorable d'une détermination rigoureuse de la longueur initiale du segment, par rapport à la section plus approximative obtenue par la méthode de découpage à la « guillotine ».

Le choix de la *durée de culture* avant la mesure finale est imposé par l'examen de la *figure 2 B*. On remarque que la croissance se maintient constante pendant les 12 heures qui suivent la mise en culture. La vitesse baisse sensiblement après 20 heures de culture, trahissant probablement une altération du matériel.

Nous décidons de faire la mesure finale 12 heures exactement après la mise en culture ; le matériel est ainsi intact et la variation de longueur suffisante pour assurer des différences très significatives.

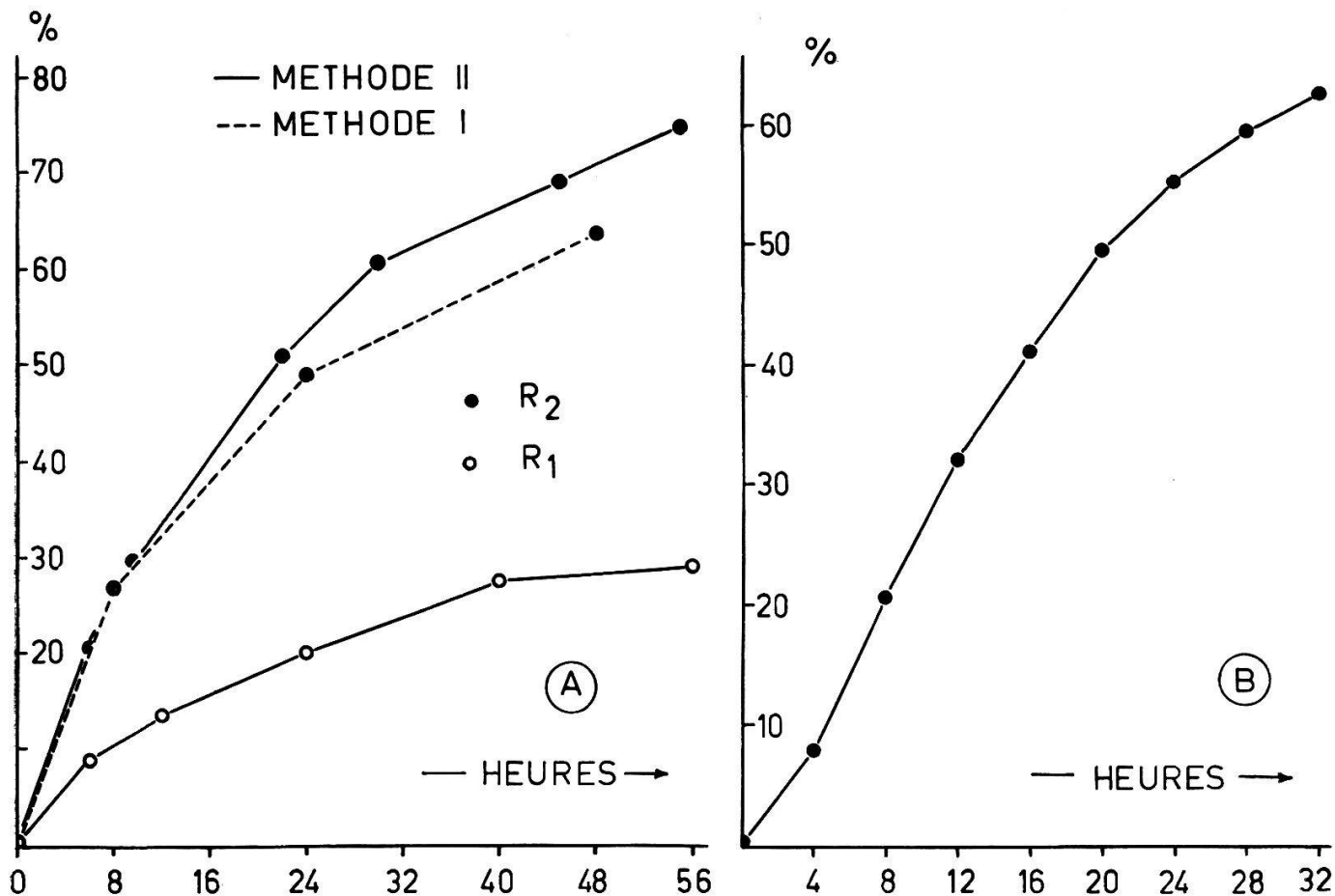


FIGURE 2

Croissance des segments radiculaires ; allongement relatif (%)
en fonction du temps (heures).

A. Croissance à long terme.

Les valeurs concernent le test de PILET (1958) : R_1 ,
et celui de PILET, KOBR et SIEGENTHALER (1960) : R_2 .

Méthode I : Découpage à la « guillotine ».

Méthode II : Excision individuelle.

B. Croissance à court terme.

Méthode de PILET, KOBR et SIEGENTHALER (1960) ; excision individuelle.

5. MESURE DE LA RESPIRATION

5.1. Généralités

Toutes les déterminations de la respiration se font par la « méthode directe » de Warburg, telle qu'elle est décrite dans les ouvrages de DIXON (1934), LEVY (1944) et UMBREIT, BURRIS et STAUFFER (1945). Nous nous bornons à indiquer nos conditions expérimentales.

5.2. Conditions expérimentales

- 1° Fréquence de balancement : 100 oscillations/mn.
- 2° Amplitude du balancement : 5 cm.

- 3° Capacité moyenne des fioles : 15 ml.
- 4° Liquide manométrique : solution de Brodie à densité périodiquement contrôlée.
- 5° Volume de la phase liquide : 2,7 ml répartis en :
 - a) 2,0 ml dans le récipient général ;
 - b) 0,5 ml dans le bras latéral ;
 - c) 0,2 ml dans le cylindre central (KOH 20 % ou H₂O) avec un papier plissé de 2×2 cm.
- 6° Nombre de segments introduits : 10 (30 pour les mesures de gradient respiratoire).
- 7° Durée de la phase d'équilibration : 30 mn.
- 8° Température de travail : 25°C.

5.3. Choix de la constante de solubilité

La constante de solubilité est choisie en fonction du constituant le plus concentré, soit le saccharose (0,29 M environ). C'est pourquoi nous adoptons :

$$\alpha_{O_2} = 0,030 \text{ ml/ml et } \alpha_{CO_2} = 0,698 \text{ ml/ml}$$

valeurs tirées des International Critical Tables (1928).

Aucune correction n'est rendue nécessaire du fait d'une éventuelle rétention de CO₂ car le pH est nettement inférieur à 6,1.

5.4. Expression des résultats

Nous n'exprimons généralement la respiration que sous forme d'*intensité respiratoire*, soit : la quantité d'oxygène absorbée par heure. Nous la désignons par Q_{O_2} .

Cette intensité, suivant les cas, peut être exprimée en fonction de divers critères de référence : nombre de segments, poids frais ou sec, azote protéinique, etc.

Nous calculons l'intensité en faisant la moyenne de toutes les mesures d'une expérience (les mesures sont habituellement espacées de 30 mn. et se font en général pendant 6 heures).

Pour rendre compte de l'effet d'une substance administrée en déplaçant le contenu du bras latéral dans le récipient général (« tipping »), nous reprenons la méthode de calcul de FRENCH et BEEVERS (1953).

Connaissant le taux de variation respiratoire, il est possible de connaître la quantité d'oxygène absorbée après un certain temps par un lot donné, dont on connaît l'intensité respiratoire initiale. En comparant la valeur théorique avec celle réellement atteinte, on déduit la variation due à l'effecteur. Un lot qui ne subit pas de traitement sert de témoin de la variation du taux respiratoire.

6. ERREURS

Dans la plupart des cas, la rigueur de la sélection et des conditions de culture des segments permet des résultats suffisamment reproductibles pour

nous dispenser d'en calculer l'erreur statistique. Nous admettons une erreur de 3 % environ sur les valeurs de la croissance, de 5 % en moyenne sur celles de la respiration. Les cas limites seront signalés.

CHAPITRE II : GRADIENTS BIOCHIMIQUES ET RESPIRATOIRES

1. GÉNÉRALITÉS

Chaque partie de la racine présente des propriétés caractéristiques. Il en résulte une grande variété dans les grandeurs biochimiques et biophysiques qui reflètent son métabolisme.

Dans un organe aussi hétérogène, il n'y a guère d'intérêt à comparer les taux locaux des divers facteurs mesurés ; seul, l'examen des *variations* de ces facteurs le long d'un même axe, sera instructif. Si l'on choisit d'exprimer la valeur d'une grandeur en fonction de la position du point de mesure, on établit un gradient.

La connaissance de la répartition d'un seul facteur n'est que de peu d'utilité ; elle devra être confrontée avec d'autres propriétés connues des régions où il a été mesuré : histologiques (zones de division, d'élongation, de différenciation), histochimiques (teneurs en sucres, en protéines, en auxines), ou encore histophysiques (absorption d'eau, polarité électrique, échanges gazeux, activités enzymatiques).

L'étude des gradients présente de nombreux avantages. Avant tout, évidemment, le fait que les facteurs sont déterminés sur un organe physiologiquement intact. De plus, ce fait que les résultats de leur comparaison sont indépendants du critère de référence choisi, à condition qu'il soit toujours le même ; les gradients sont ainsi ramenés à un dénominateur commun et peuvent être comparés.

La confrontation des gradients peut nous mettre sur la piste de corrélations entre divers facteurs. Une symétrie de répartition suggère un antagonisme entre les facteurs. Une identité de répartition indique peut-être une relation mutuelle ; ou la dépendance commune à l'égard d'un autre facteur.

Malheureusement, la comparaison des gradients ne fournit jamais que des indications, pas de preuve décisive, des corrélations soupçonnées. Seule la variation provoquée d'un facteur pourra montrer quelles sont les autres grandeurs qui en dépendent.

2. QUELQUES GRADIENTS

2.1. Etude histologique et cytologique

Une étude histologique et cytologique sommaire de la racine du *Lens* a été entreprise pour mieux connaître les caractéristiques des tissus qui la composent. Il importe de déterminer :