Preparation du materiel biologique

Objekttyp: **Chapter**

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

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

Heft 6

PDF erstellt am: **31.05.2024**

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.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Nous admettrons donc la coexistence de deux processus distincts :

1° *Destruction de la chaîne latérale.*

Par oxydation, l'ABIA (1) donnerait naissance d'abord à de l'acide β-indolyl-céto-acétique (2) avec formation d'une molécule d'eau. Puis, ce composé formerait, par décarboxylation, de la β-indolyl-aldéhyde (3).

2° *Destruction du noyau.*

Par oxydation également, l'ABIA (1) donnerait un composé problématique, l'acide o-formamido-benzoyl-acétique (4) qui par décarboxylation se transformerait en o-formamido-acétophénone (5). Une déformylation de cette substance aboutirait à l'apparition d'o-amino-acétophénone (6).

3. PREPARATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE

Avant de donner la description des diverses techniques que nous utiliserons dans l'étude qui va suivre, nous dirons brièvement quelques mots des méthodes utilisées pour préparer :

1° le matériel végétal employé;

2° les extraits enzymatiques dont on veut évaluer l'activité auxines-oxydasique.

3. 1. Matériel végétal.

Nous utilisons des semences du *Lens culinaris* MED. et suivons, à peu de chose près, la technique proposée par PILET et WENT (1956) qui permet d'obtenir une croissance maximum des plantules.

1. Les graines sont imbibées 4 h [1] dans de l'eau déionisée (obscurité; 22° C ± 1,5) puis rapidement lavées à l'eau distillée.
2. On les dépose sur du papier-filtre humide (Schleicher et Schuel, n° 595) dans des boîtes de Petri qu'on place à l'étuve (obscurité; 20,5° C ± 0,5).
3. Au bout de 24 h, on sélectionne les plantules pour ne conserver que celles dont les racines mesurent 2 mm ± 0,5.
4. On les dépose dans de petites boîtes de Petri contenant un papier-filtre (v. plus haut) imbibé d'une solution aqueuse de saccharose (0,1 %) et de pH voisin de 7,0. La culture se déroule dans les mêmes conditions que précédemment (v. 2).
5. On procède alors à une seconde sélection et l'on trie (contrôle à la loupe avec échelle micrométrique) les plantules dont les racines mesurent 18,0 mm ± 0,5 [2].

[1] Suivant les lots de semences utilisées, ce temps d'imbibition qui correspond à une germination maximum, peut osciller entre 2 h. et 24 h.

[2] Dans ces conditions, c'est à cette longueur que la vitesse d'élongation des racines est maximum (PILET, 1960, e).

3. 2. Extrait enzymatique.

Nous décrirons ici les techniques de préparation d'extraits bruts (PILET, 1958 d), extraits que nous avons utilisés dans ces essais. Pourtant, et dans certains cas, on a avantage à tenter une purification de telles préparations; des essais préliminaires sont en cours qui portent sur l'emploi de tissus préalablement lyophilisés et d'extraits électro-dialysés.

1. Les racines sont détachées (au niveau du collet) de la plante et déposées sur une plaque de verre avec quelques gouttes de solution physiologique (formule de Ringer). On les coupe de façon à obtenir des fragments de 6,0 mm $\pm$ 0,5 de longueur (comptés à partir du sommet, donc coiffe comprise).
2. Avant la préparation des extraits, ces fragments (tous semblables) sont déposés dans des béchers (obscurité, $+$ 2° C) dans une solution-tampon de pH égal à 6,1; la composition de cette solution est la suivantes :

   40 ml KH_2PO_4 (1.10^{-1} M)
   10 ml Na_2HPO_4 (1.10^{-1} M)

3. Toutes les opérations qui vont suivre se font en lumière verte (approximativement 530 mμ).
4. On prélève un certain nombre de fragments qu'on pèse (poids frais) et qui serviront à la préparation de l'extrait.
   L'activité enzymatique sera presque toujours rapportée à une unité de poids frais (PILET et GALSTON, 1955; GALSTON et DALBERG, 1954). Pourtant, dans certaines expériences, (PILET, 1957 c; 1959 b; 1960 e) il est préférable d'exprimer l'activité auxines-oxydasique par unité de protéines; le critère de référence ayant une grande importance dans l'expression des résultats (PILET et SIEGENTHALER, 1959). Dans ce cas, un lot équivalent de fragments de racines sera utilisé pour le dosage de l'azote total et protéinique, et nous utiliserons à ce propos soit la méthode de KJELDAHL-KIRK (PILET et GALSTON, 1955; PILET, 1957 a) soit celle de KJELDAHL-BRUNEL (PILET et SIEGENTHALER, 1959). Connaissant alors la teneur en azote protéinique de ces fragments, on pourra trouver celle de ceux qui seront employés pour le dosage auxines-oxidasique.
   Par exemple :
   33,4 mg (pointes de racines) correspondent (méthode de KJELDAHL-BRUNEL) à 92,7 μg d'azote protéinique; nous sommes partis de 12,6 mg de tissus, la teneur en azote protéinique sera par conséquent de :

$$\frac{92,7 \times 12,6}{33,4} = 34,9 \ \mu g$$

5. Ces fragments sont déposés dans des mortiers qu'on sort du congélateur ($-$ 23° C) avec une petite prise de SiO_2 (également conservé au froid) et quelques gouttes de solution-tampon (pH 6,1).

6. On broye les fragments[3] 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 centrifuge[4] 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 (± 2° 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 0[5], de l'ABIA (a ml à une concentration c).

On dépose ce mélange (au total 10 ml) dans un erlenmeyer qu'on agite[6] lentement à l'obscurité (28,0° C ± 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.