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

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: 09.12.2025

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

Mémoires de la Société vaudoise des Sciences naturelles
N° 78 1960 Vol. 12, Fasc. 6

Etude du catabolisme des auxines marquées par du radiocarbone

Méthodes et premiers résultats *

JA 87.58

PAR

PAUL-EMILE PILET et PIERRE LERCH

Laboratoire de Physiologie végétale, Université de Lausanne
Institut de Radiophysique appliquée, Hôpital cantonal de Lausanne

1. AVANT-PROPOS

Depuis les expériences de TANG et BONNER (1947, 1948), de GALSTON et DALBERG (1954) et de PILET et GALSTON (1955), d'innombrables publications ont été consacrées à l'étude de la dégradation enzymatique des composés auxiniques et tout spécialement de l'acide β-indolyl-acétique (ABIA). Nous renvoyons à quelques mises au point récentes pour l'analyse de ces travaux (LARSEN, 1951; GORDON, 1954; RAY et THIMANN, 1956; PILET, 1960 f).

Avec la fabrication des premières molécules d'ABIA, marquées par du radiocarbone (C^{14}), l'analyse du catabolisme des auxines a fait l'objet d'une nouvelle série de recherches qui ont permis de préciser non seulement les propriétés des enzymes responsables de ces processus biochimiques, mais encore et surtout la nature des produits de dégradation formés au cours de ces réactions. Ces résultats faisant l'objet des premiers travaux portant sur l'emploi d'ABIA marqué par du C^{14} sont toutefois peu encourageants; en effet, ces composés sont très vite détruits et c'est surtout par la chaîne latérale que débutent les processus de dégradation (V. FANG et BUTTS, 1957; STUTZ, 1958; SHAW et HAWKINS, 1958). Mais avec l'emploi d'ABIA marqué par du C^{14} dans le cycle, et synthétisé, pour la première fois, par PICHAT, AUDINOT et MONNET (1954), les expériences parurent plus concluantes (v. en particulier, RAY et THIMANN, 1956; PILET, 1959, 1960).

* Ce travail a pu être réalisé grâce à un subside du Fonds national pour la recherche scientifique (section atomique), et à la collaboration de Mmes M. ATHANASIADÈS-MERCANTON et CL. GRANDCHAMP-CROUTAZ, et de MM. BERCIER, SIEGENTHALER, KOBR et COLLET.

Ces méthodes, basées sur l'emploi d'ABIA marqué par du C^{14} (techniques radiochromatographiques) présentent incontestablement un grand intérêt, mais il convient de les utiliser parallèlement avec d'autres techniques qui, elles aussi, ont des avantages certains. C'est pourquoi dans ce travail, nous exposerons brièvement quelques méthodes usuelles de dosage de l'activité auxines-oxydasique (que nous appellerons, faute de termes meilleurs, *méthodes biologiques*) avant de décrire les techniques portant sur l'utilisation d'ABIA marqué par du C^{14} (que nous appellerons *méthodes radiochimiques*). Nous pourrons ainsi comparer ces diverses méthodes et discuter leur valeur respective.

2. DEGRADATION ENZYMATIQUE DE L'ABIA

Sans entrer dans le détail des nombreuses publications qui ont été consacrées à l'inactivation (v. PILET, 1960 e), par voie enzymatique, de l'ABIA, rappelons toutefois quelques observations indispensables pour la suite de cet exposé.

Sous l'action d'un système d'enzymes dont la nature chimique reste encore mal définie (probablement de nature flavoprotéique), l'ABIA se décompose pour donner un certain nombre de substances dont l'activité biologique est plus faible et qui varient bien souvent d'un tissu végétal à un autre.

2.1. Propriétés du système enzymatique.

Ce système enzymatique possède les caractéristiques suivantes (du moins s'il s'agit comme c'est le cas dans ce mémoire, d'enzymes extraites des racines du *Lens*, (PILET, 1957 c).

1) *pH optimum d'action :*
   6,2 ± 0,4 (obscurité, 40° C ± 5,0).
2) *Température optimum d'action :*
   36,0° C ± 5,0 (pH 6,1; obscurité).
3) *Température critique d'inactivation :*
   65,0° C ± 3,0 (pH 6,1; obscurité).
4) *Vitesse des processus enzymatiques :*
   a) relation avec le temps :
   fonction linéaire (de 5 à 70 sec.)
   puis *dv/dt* diminue (dès 80 sec.) ;
   b) relation avec la concentration en enzymes pratiquement proportionnelle ;
   c) relation avec la concentration en ABIA :
   fonction linéaire (de 50 à 40 μg/ml)
   puis *dv/dt* diminue (au-dessus de 45 μg/ml).

2. 2. Processus chimique de destruction enzymatique.

On avait tout d'abord supposé, et ceci surtout à la suite des recherches de TANG et BONNER (1947), puis de WAGENKNECHT et BURRIS (1950), que les produits qui se formaient, sous l'action des auxines-oxydases, à partir de l'ABIA, avaient le même noyau constitutif (indole), mais différaient par la nature chimique de leur chaîne latérale.

MANNING et GALSTON (1955) qui ne purent obtenir, parmi les composés résultant de la décomposition de l'ABIA, de substances indoliques, furent entraînés à imaginer que l'ABIA se dégraderait par modification instantanée de son cycle. Toutefois, et nous le verrons plus loin, le schéma que GALSTON (1956) proposa n'est pas entièrement satisfaisant, aussi conserverons-nous pour le moment l'hypothèse de deux voies également probables de dégradation, par des systèmes enzymatiques, (fig. 1).

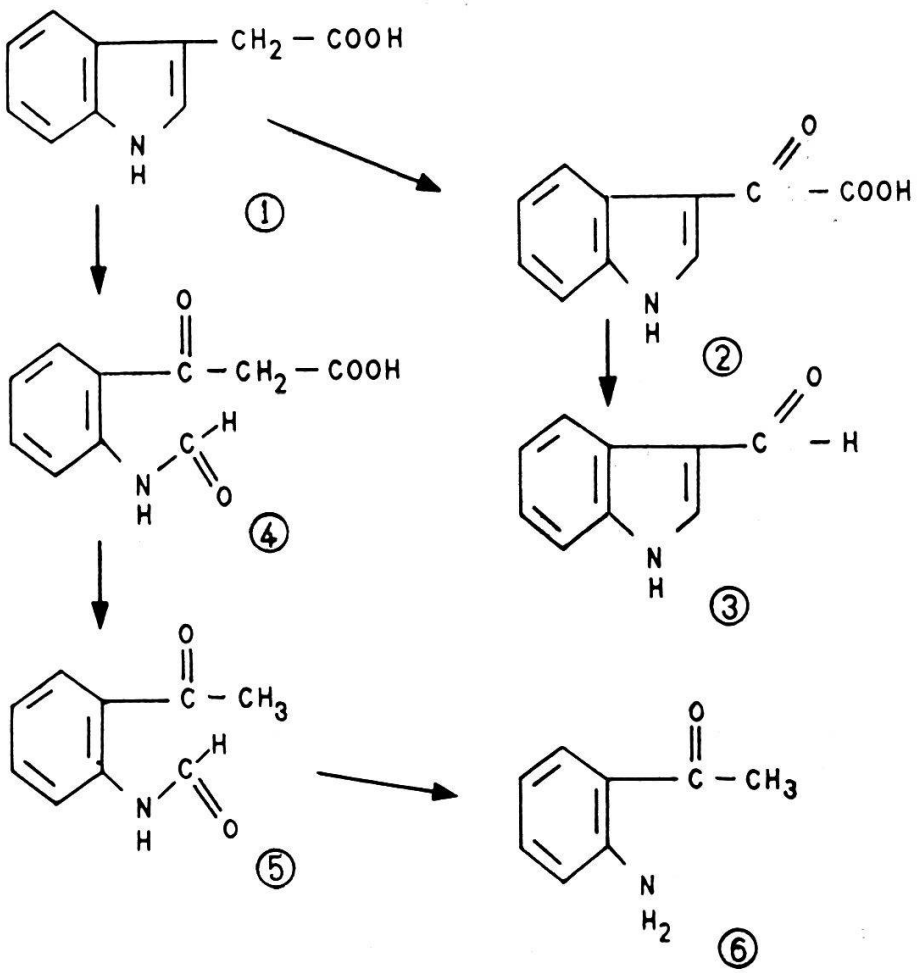

FIG. 1. — Schéma de la dégradation par voie enzymatique de l'acide β-indolyl-acétique : 1. ABIA. 2. Acide β-indolyl-céto-acétique. 3. β-indolyl-aldéhyde. 4. Acide o-formamido-benzoyl-acétique. 5. o-formamido-acétophénone. 6. o-amino-acétophénone.

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.

(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.

$x = 2$ ml $y = 2$ ml $z = 4$ ml
$a = 2$ ml $c = 10$ µg/ml

Durée de l'incubation et mesures colorimétriques.

T = 60 mn $t = 30$ mn

Réactif.

En général, nous avons adopté les proportions suivantes :
mélange actif + ABIA : b = 2 ml
réactif : $r = 7$ ml + 1 ml d'éthanol ou $r = 8$ 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 mµ ± 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 suivant [7] :

3 ml $FeCl_3 . 6 H_2O$ (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 µg/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.

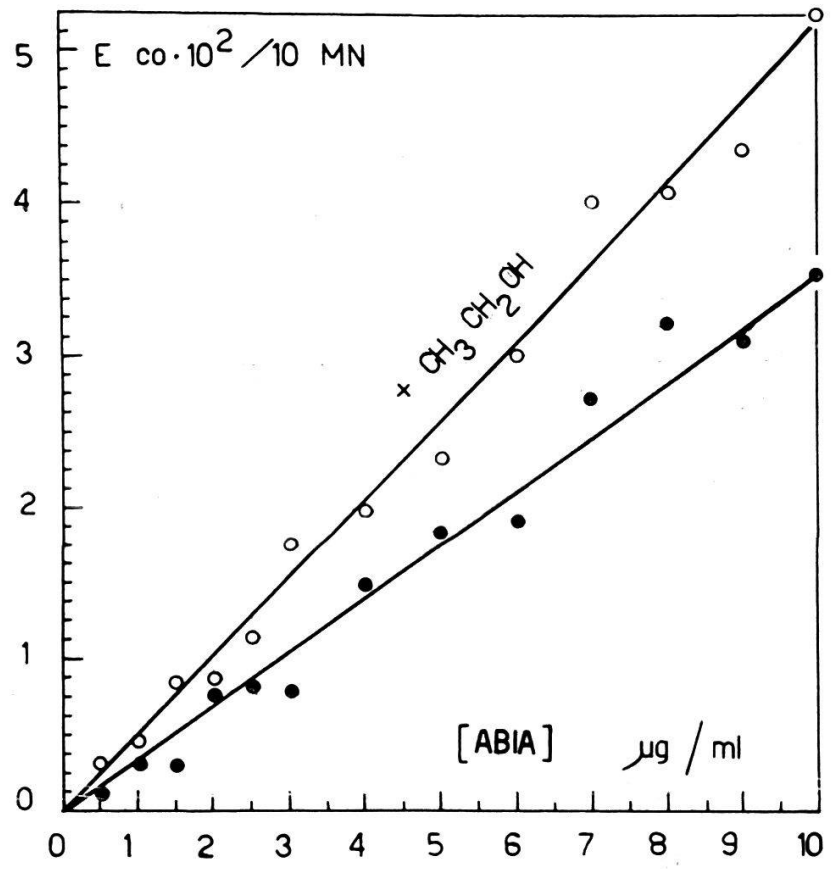

FIG. 2. — Variations du coefficient colorimétrique (donné en unités de KLETT) pour des solutions aqueuses contenant de l'ABIA (à différentes concentrations en µg/ml) auxquelles on aura ajouté le réactif spécifique (v. p. 219) et, pour une série d'analyses, de l'alcool éthylique.

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 :

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

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).

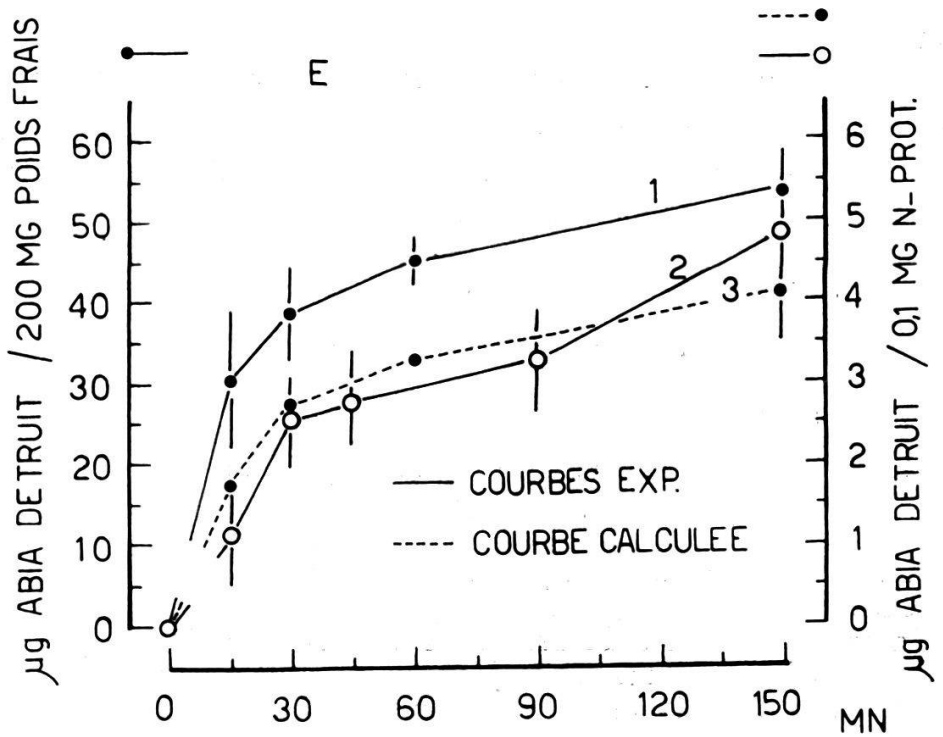

Fig. 3. — Dégradation enzymatique de l'ABIA pour des extraits radiculaires et rapportée en µg d'ABIA détruit, pour une période d'incubatiou variable (de 0 á 150 mn), et pour 200 mg de poids frais ou 0,1 mg d'azote protéinique. Les courbes 1 et 2 sont directement tirées de mesures au photocolorimètre, 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 :

a) par rapport à 200 mg de poids frais (courbe 1) ;

b) 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 :

1 molg d'ABIA + 1 molg d'O_2 ⟶
1 molg d'acide β-indolyl-céto-acétique + 1 molg d'H_2O.

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'O_2 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 μ g/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'O_2 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'O_2 absorbé, nous pourrons écrire :

175,18 g d'ABIA correspondent à 32 g d'oxygène; par conséquent : 22,4 µl d'O_2 correspondent à 175,18 µg d'ABIA et par suite :

1 µl d'O_2 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'O_2/200 mg de poids frais, l'ABIA détruit sera donc égal à 3,6 . 7,9 = 28,44 soit 28,0 µ g 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'O_2 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'O_2 absorbé. La différence entre ces deux séries de valeurs correspond à la quantité d'O_2 utilisé pour la dégradation de l'ABIA. En se souvenant qu'une molg d'O_2 est nécessaire pour

Tableau 1.

Dosage manométrique (absorption d'O_2) de l'activité auxines-oxydasique 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 µg/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 µg/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.

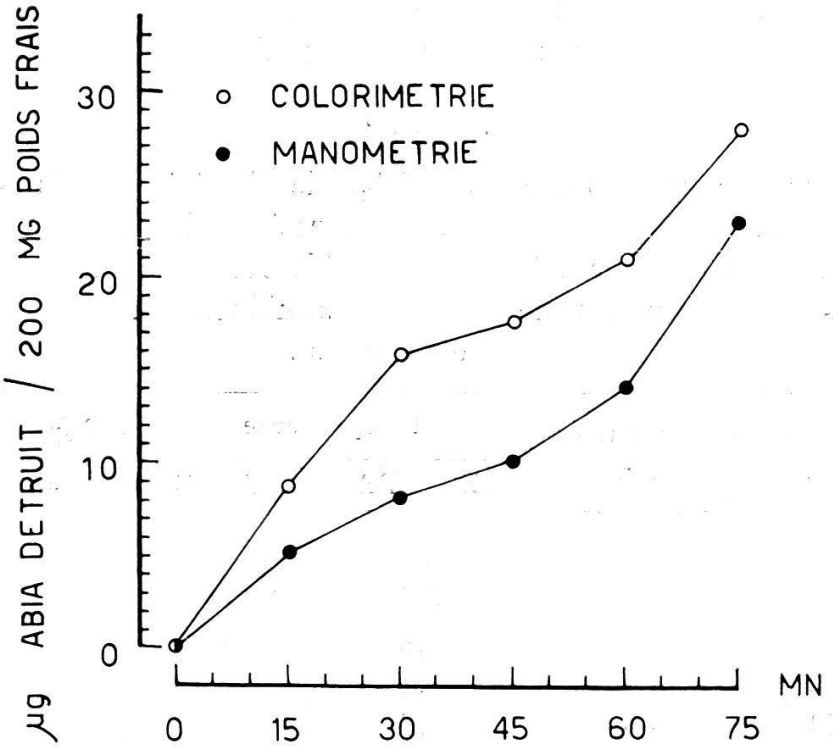

Fig. 4. — Destruction de l'ABIA en fonction de la durée d'incubation enzymatique (de 0 à 75 mn) et rapportée à 200 mg de poids frais. Comparaison des techniques colorimétrique et manométrique. L'extrait employé ici est préparé autrement que ceux qui furent utilisés plus haut (v. p. 217).

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 éthérée 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 Rf [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'H_2O + 4 ml sol.-tampon de pH 6,1), nous ajoutons 2 ml de solution d'ABIA à 50 µg/ml, ce qui fait donc qu'initialement notre solution de 10 ml contiendra 10 µg/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 µg.

A ces 4 ml (et nous répétons deux fois l'opération, ce qui est possible puisque nous avions 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 Rf est le rapport entre la distance (e) qui sépare la tache initiale de la substance isolée et la distance (H) parcourue par le solvant : Rf = 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 µg/ml).

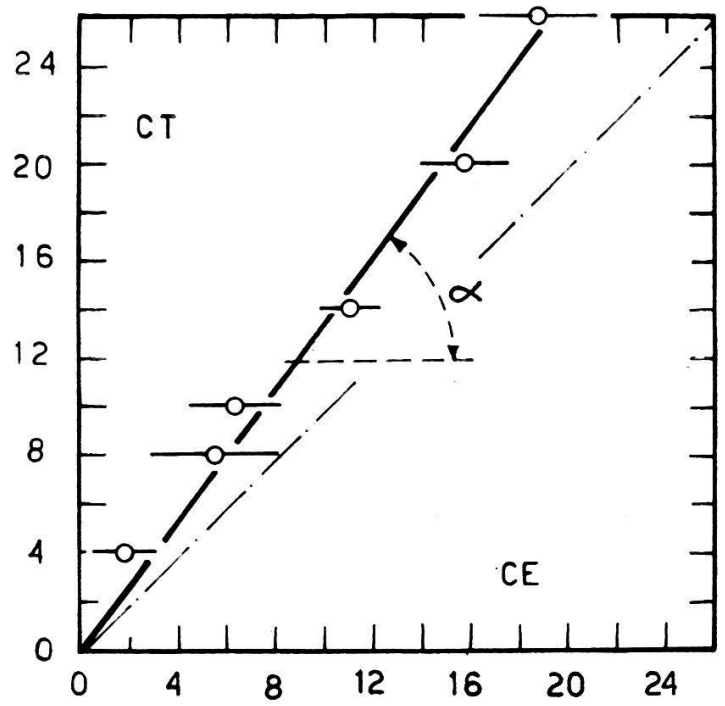

FIG. 5. — Recherche du coefficient de correction α.
CT : concentration théorique ; CE : concentration expérimentale.
La concentration d'ABIA (CT et CE) est donné en µg/ml

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 avions 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 (5.10^{-6} M) ; pH : 5,7.

Test R' : solution de saccharose 1 % dans la solution-tampon Na_2HPO_4 / KH_2PO_4 ; pH 5,1.

Test T : solution aqueuse de saccharose (6.10^{-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
Sections:			
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
Solutions actives:	eau déionisée	sol. tampon Na_2HPO_4-KH_2PO_4	eau déionisée
volume	10 ml	10 ml	4 ml
concentration en:			
glucose	5.10^{-6} M	—	—
saccharose	—	1 %	6.10^{-2} M
pH	5,7	5,1	6,1
Culture (obscurité)			
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.

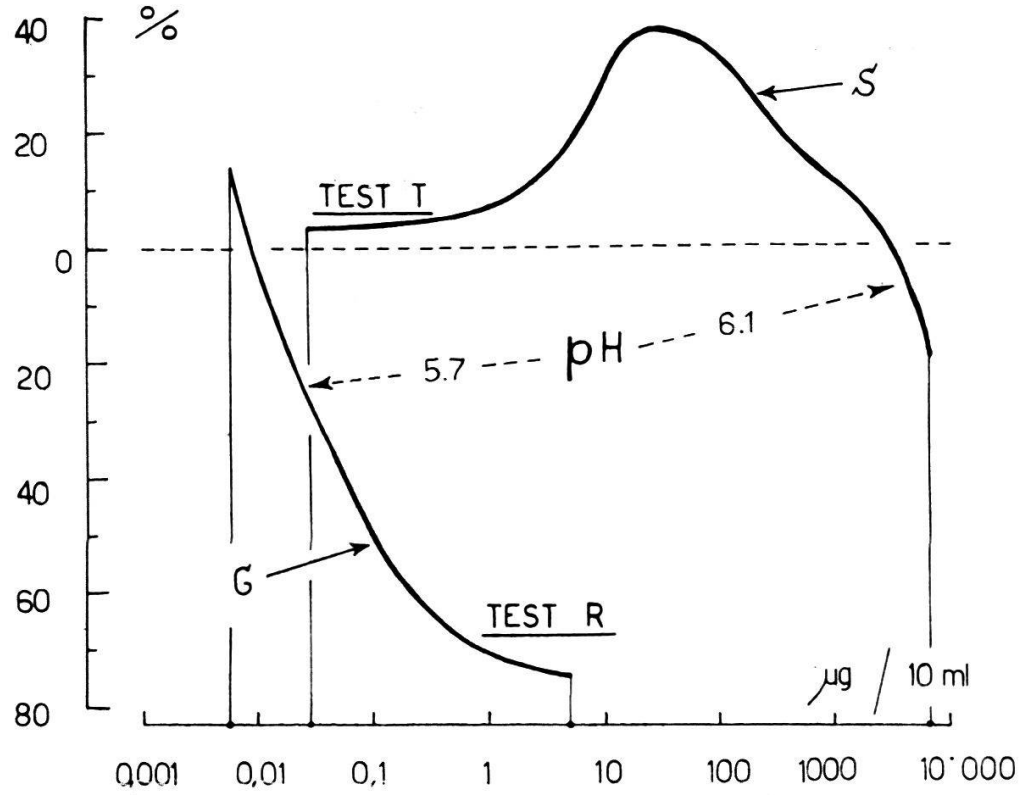

FIG. 6 — Courbe étalon. On a reporté le % d'action de l'ABIA (stimulation (+) ou inhibition (—)) sur la croissance (élongation) des tests T (fragments de tiges du *Lens*) et R (pointes de racines du *Lens*), en fonction de la concentration (en µg/10 ml) d'ABIA employé (solution aqueuse tamponnée contenant 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 :

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

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

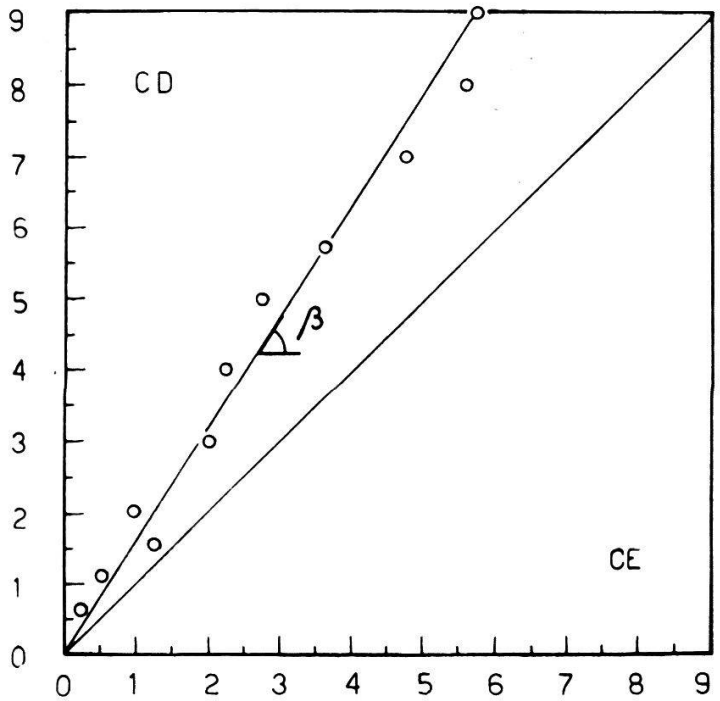

Fig. 7. — Recherche du coefficient de correction β (facteur de régression) CD : concentration donnée — CE : concentration expérimentale. La concentration d'ABIA (CD et CE) est donnée en μg/ml.

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

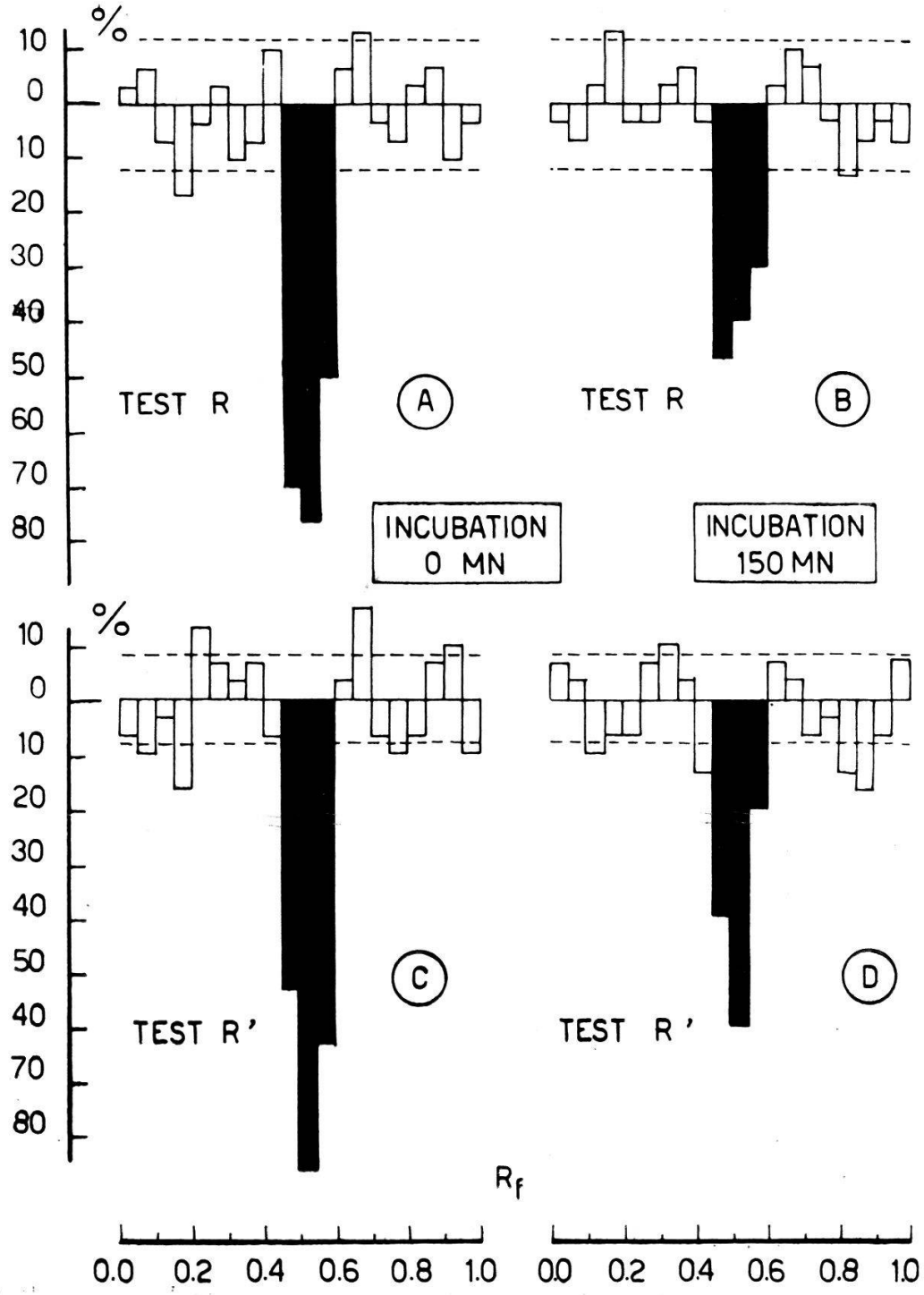

Fig. 8. — Bio-histogrammes.
Le dosage biologique des produits formés à partir de l'ABIA, dont la présence est rappelée par les zones noires, est fait en employant les deux tests «pointes de racines du *Lens*» (tests R (A et B) et R' (C et D)). Les solutions d'ABIA chromatographiées ont été utilisées soit immédiatement après leur préparation (A et C), soit après un contact (incubation enzymatique) de 150 mn (B et D) avec des extraits radiculaires de nature auxines-oxydasique. On a reporté, en fonction du Rf, 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.

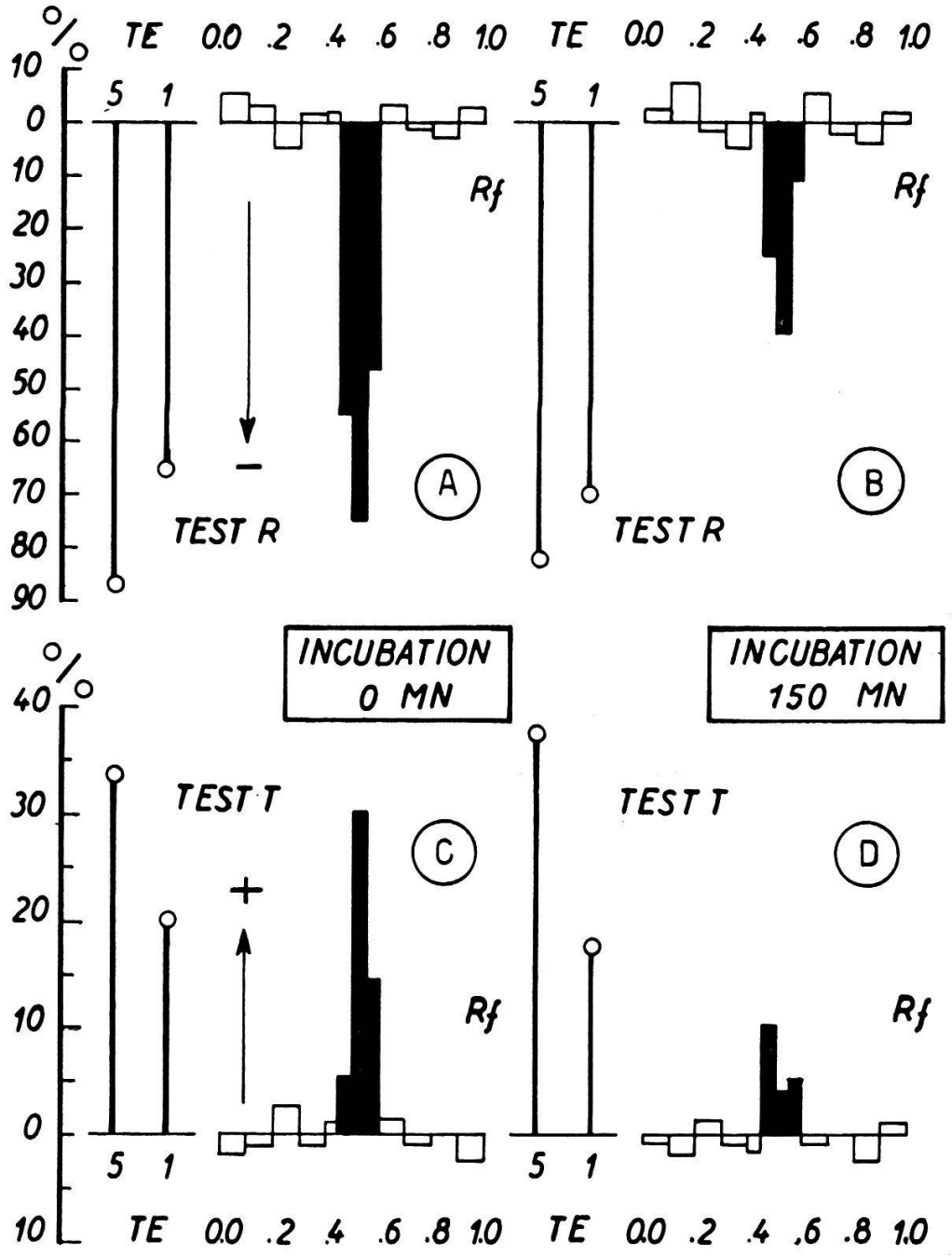

Fig. 9. — Bio-histogrammes.
Mêmes expériences que celles exposées dans la fig. 8.
Emploi de deux tests comparatifs : Test R (pointes de racines du *Lens;* A et B).
Test T (fragments de tiges du *Lens;* C et D).
Les solutions d'ABIA chromatographiées ont été utilisées soit immédiatement (A et C) soit 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.

5. METHODES RADIOCHIMIQUES

5. 1. Mesure de la radioactivité.

5. 1. 1. Types de mesures.

La mesure de la radioactivité d'un chromatogramme peut s'effectuer de trois manières :

a) découpage du chromatogramme en fragments de surfaces égales et mesures individuelles de la radioactivité des fragments;
b) élution et mesure de la radioactivité de parties aliquotes des fractions collectées après évaporation à sec;
c) mesure continue de la radioactivité, le chromatogramme défilant à vitesse constante devant le détecteur.

La première méthode est indiquée toutes les fois que des mesures très précises doivent être obtenues, et plus particulièrement lorsque la radioactivité à mesurer est extrêmement faible (voir plus loin, calcul de l'erreur statistique lors des mesures de la radioactivité). Elle présente le désavantage de nécessiter la destruction du chromatogramme.

Avec le même inconvénient, la seconde méthode peut donner des résultats au moins aussi précis, lorsqu'une élution quantitative est possible. Mais elle exige de nombreuses manipulations et le plus souvent la première méthode lui est préférable. Nous citons donc la méthode par élution pour mémoire et nous n'y reviendrons pas.

La troisième méthode présente les avantages de la rapidité et d'un nombre minimum de manipulations. Par surcroît, le chromatogramme peut être conservé après la mesure et servir par conséquent à des dosages biologiques. La précision est moindre, mais le plus souvent suffisante.

5. 1. 2. Mesures individuelles.

Une installation courante de mesure de la radioactivité, composée d'une haute tension pour l'alimentation du détecteur, d'un discriminateur et d'une échelle pour le dénombrement des impulsions, d'un tube de Geiger-Müller à fenêtre mince en bout, abrité dans un château de plomb, est généralement suffisante. Il faut pouvoir placer le fragment de chromatogramme aussi près que possible de la fenêtre du détecteur, dans une position bien définie, afin d'obtenir une géométrie élevée et une reproduction satisfaisante.

Lorsque le radioisotope utilisé n'émet que des rayons β très mous, le C^{14} notamment, il faut choisir un détecteur à fenêtre de faible épaisseur (1,5 à 2 mg/cm^2 de mica). Les compteurs à courant gazeux et fenêtre très mince de mylar (0,5 mg/cm^2) de même que les compteurs à courant gazeux où la source peut être introduite, seront

employés avec grand avantage. Dans le premier cas, la manipulation est simple et les mesures rapides; avec le second dispositif, l'introduction de la source dans le compteur et le balayage de ce dernier sont plus longs, mais la précision plus élevée aussi.

Les surfaces découpées doivent être rigoureusement égales et la dimension des fragments petite par rapport à celle de la fenêtre du compteur, afin que la géométrie soit sensiblement constante en chaque point du fragment mesuré.

Pour que l'erreur statistique soit toujours la même, les mesures s'effectuent à nombre constant d'impulsions reçues. Les activités en cpm [9] sont portées en ordonnées sur un graphique; l'élongation du chromatogramme est donnée en abscisses.

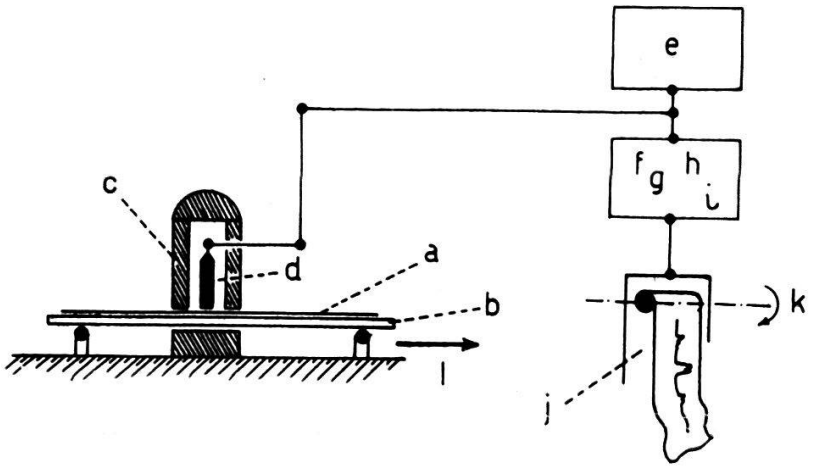

FIG. 10 — Schéma de l'appareil utilisé.
Chromatogramme (a) - platine mobile (b) - château de plomb (c) - détecteur (d) - haute tension (e) - système électronique : amplificateur (f) - discriminateur d'amplitude (g) - metteur en forme (h) - circuit intégrateur (i) - appareil d'enregistrement.
Le déplacement (I) de la platine est synchronisé avec la rotation (k) du papier où s'enregistrent les impulsions.

5.1.3. MESURES CONTINUES.

Nous indiquerons brièvement le principe [10] de l'appareillage utilisé (fig. 10) :

Le chromatogramme (a) est fixé sur une platine mobile (b) qui traverse de part en part un château de plomb (c) et défile ainsi devant le détecteur (d) qui s'y trouve logé. Généralement ce détecteur est un tube de Geiger-Müller à fenêtre mince de mica, ou mieux un tube de Geiger-Müller à circulation gazeuse et fenêtre très mince de mylar. L'appareillage électronique comprend une haute tension (e) pour l'alimentation du détecteur. Les impulsions de tension sortant du détecteur sont tout d'abord amplifiées (f) puis passent par un discriminateur d'amplitude (g); elles sont ensuite mises en forme et

[9] *Count per minute.*

[10] Voir LERCH et NEUKOMM, 1954.

égalisées (h) ; enfin elles parviennent au circuit intégrateur (i) (fig. 11).

L'impulsion d'entrée de forme carrée positive et de hauteur V_e charge le condensateur C_1 au travers de la diode D_1 conductrice. Ainsi l'impulsion de tension est convertie un une charge électrique unité. Sitôt l'impulsion passée, le condensateur C_1 se décharge au travers de la diode D_2 conductrice (D_1 ne conduit pas dans ce sens) et charge le condensateur C_2, qui est l'élément intégrateur proprement dit. Ce transfert de charge effectué, la capacité intégratrice C_2 se vide lentement au travers de la résistance élevée R. La charge intégrée est peu à peu transformée en un courant i_s. Il est possible de mesurer, soit la différence de potentiel V_s entre les bornes du condensateur, soit l'intensité i_s. Cette dernière méthode est plus généralement employée. V_s et i_s sont proportionnels au nombre A d'impulsions reçues par unité de temps.

On a, en régime permanent et pour autant que $V_s \leqslant V_e$,

$$i_s = A \,.\, V_e \,.\, C_1$$

$$V_s = R \,.\, i_s = A \,.\, V_e \,.\, C_1 \,.\, R$$

Afin d'obtenir une gamme de sensibilités permettant la mesure de radioactivités variables dans de larges limites, le circuit comprend une capacité C_1 et une résistance R variables par bonds. De même,

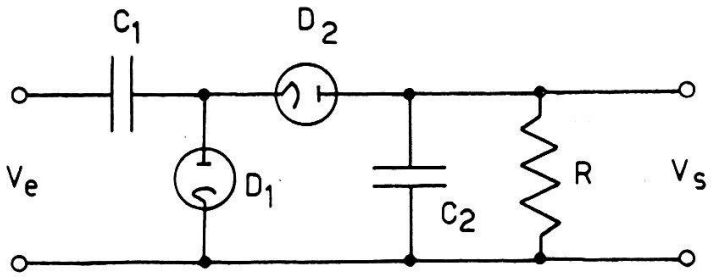

FIG. 11. — Impulsions d'entrée et de sortie.
V_e : tension d'entrée — V_s : tension de sortie — C_1 et C_2 : condensateurs — D_1 et D_2 : diodes — R : résistance.

pour obtenir une décharge plus ou moins lente de la capacité intégratrice C_2, ce condensateur est aussi variable. La constante de temps θ est :

$$\theta = R \,.\, C_2$$

Comme nous le verrons, elle présente un grand intérêt pour le calcul de l'erreur statistique.

Pratiquement, les composants du circuit d'intégration ont pour valeur :

$$R = 1 \text{ à } 10 \text{ M}\Omega \qquad C_1 = 10^2 \text{ à } 10^4 \text{ pF} \qquad C_2 = 1 \text{ à } 10 \ \mu\text{F}$$

Ainsi les constantes de temps varient de quelques secondes à quelques centièmes de seconde. Le courant i passe par un milliampèremètre enregistreur (j) qui trace ses variations au cours du temps. Pour que la mesure soit automatique, il faut que le déroulement du papier (k) de l'enregistreur soit synchronisé avec l'avance de la platine sur laquelle est fixé le chromatogramme. Il

est très utile d'avoir plusieurs vitesses de déroulement du papier. Nous verrons (p. 243) que lorsque la radioactivité est importante, la vitesse peut être plus grande pour une même erreur statistique.

Enfin, il faut interposer un diaphragme entre la fenêtre du détecteur et la platine afin de définir avec précision la surface lue; il est bon de pouvoir régler la largeur du diaphragme (dimension dans le sens du mouvement de la platine) et de l'adapter aux conditions de la mesure. Cela permet une meilleure localisation des plages radioactives sur le chromatogramme.

Caractéristiques de notre appareillage :

Vitesses de passage du papier : 2 mm/mn et 20 mm/mn.

Largeur du diaphragme : variable de 0 à 6,35 mm.

Constantes de temps : 2,5 s , 10 s et 40 s.

Sensibilité : 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 et 10^6 cpm (impulsions/minute).

Cet instrument est avant tout destiné à la mesure des radiations β molles du C^{14}, le détecteur est un compteur de Geiger-Müller à fenêtre mince de mylar de 0,5 mg/cm² parcouru par un flot gazeux, mélange d'hélium, d'isobutane et de butadiène (Tracerlab, G-1).

5. 2. Discussion des résultats.

5. 2. 1. Mesures individuelles.

L'activité mesurée, A cpm, est une grandeur relative qui dépend des conditions de mesure. Sa connaissance peut être suffisante, lorsqu'on désire simplement comparer des radioactivités entre elles. Pour obtenir la valeur absolue D dpm (désintégration par minute) ou D′ (mC), on peut :

a) soit étalonner le détecteur (Lerch, 1956; Lerch et Jaep, 1958), à l'aide d'une source dont l'activité absolue est connue, dans des conditions rigoureusement semblables à celles de la mesure des fragments, (l'étalon doit être fait du même radioisotope que celui qui est mesuré sur le chromatogramme);

b) soit calculer l'activité absolue (Lerch, 1953 a et b) : les facteurs suivants doivent être connus pour le calcul de D : géométrie du détecteur — facteur de transmission T — facteur de diffusion Q — facteur de rétrodiffusion R — facteur d'auto-absorption S. D vaudra :

$$D = A \cdot \frac{1}{G.T.Q.R.S}$$

Dans le cas d'émetteurs de radiations β de faible énergie, les facteurs T et S sont sujets à des changements importants lorsque les conditions de mesure varient. Les graphiques (fig. 12 A et B) montrent l'évolution de T en fonction de l'épaisseur massique sépa-

rant la source du volume sensible du détecteur (principalement air et fenêtre du détecteur) et de S en fonction de l'épaisseur de la source, en l'occurrence celle du papier du chromatogramme.

Enfin, il ne faut pas oublier de déduire de l'activité brute mesurée, l'effet zéro ou *background*, d'une part, et éventuellement d'ajouter, lors de la mesure de radioactivités importantes, une correction pour la perte d'impulsions due au temps mort du détecteur.

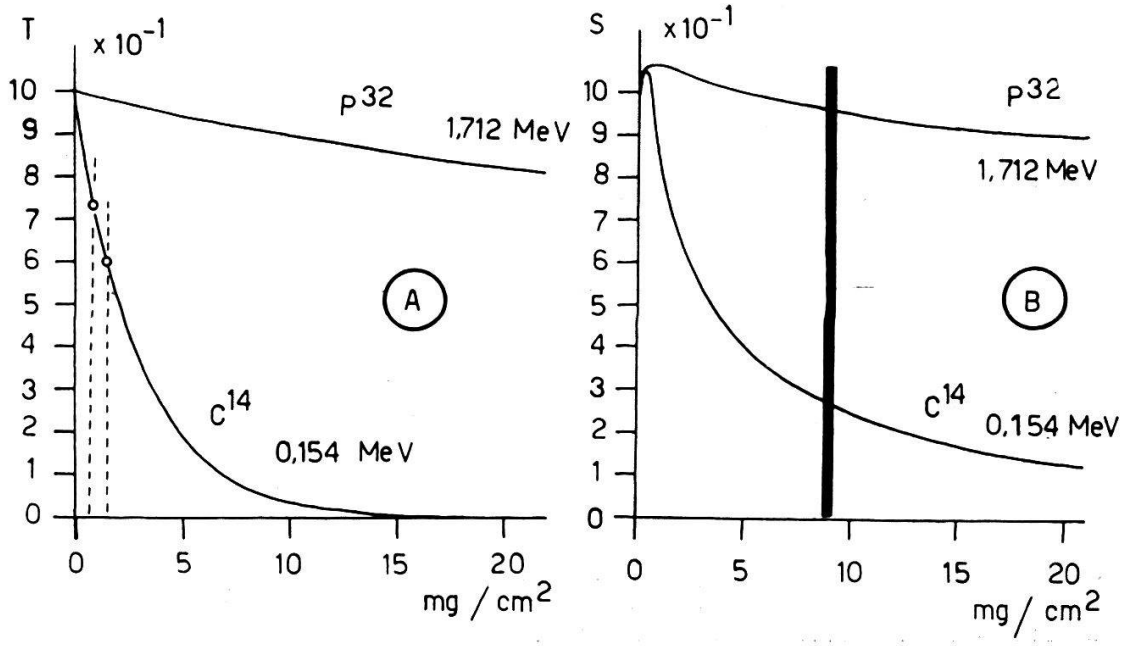

FIG. 12. — Facteurs de transmission (T) et d'auto-absorption (S).
A) T est donné en fonction de l'épaisseur massique qui sépare la source du volume sensible du détecteur. B) S est donné en fonction de l'épaisseur du papier du chromatogramme. Les valeurs ont été calculées pour du radiocarbone (C^{14}) et du radiophosphore (P^{32}).

Caratéristiques de notre appareillage :

Pour le C^{14} :

$$S = 0{,}27 \qquad T = 0{,}42 \qquad G = 0{,}27$$

Pour le P^{32} :

$$S = 0{,}97 \qquad T = 0{,}96 \qquad G = 0{,}27$$

L'activité relative A cpm est environ le 1/30 de l'activité absolue D dpm pour le C^{14} (rayons β mous) et le 1/4 pour le P^{32} (rayons β durs).

5. 2. 2. MESURES CONTINUES.

En chaque instant, le détecteur mesure les radiations émises par un petit fragment rectangulaire du chromatogramme défini par la largeur *d* du diaphragme et la largeur *b* du chromatogramme lui-

même (la longueur du diaphragme est toujours supérieure à b, afin d'éviter que des régions du chromatogramme soient inexplorées). Considérons (fig. 13) une plage radioactive Σ et soit $a(x, y)$,

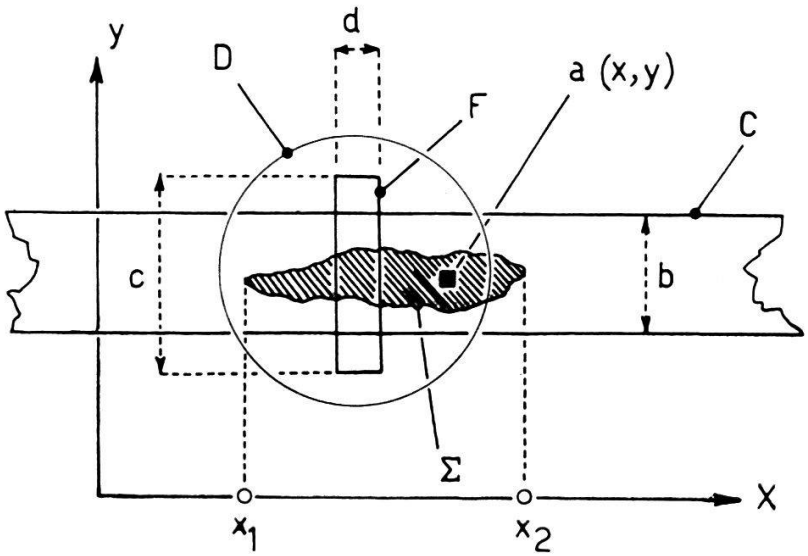

FIG. 13. — Mesure de la radioactivité d'une plage Σ du chromatogramme. a (x,y) : activité en cpm de chaque point de la plage — d : largeur de la fenêtre (F) du diaphragme (D) — c : longueur de la fenêtre (F) du diaphragme (D) — b : largeur du chromatogramme (C). La longueur de la tache est $x_2 - x_1$.

l'activité en cpm en chaque point de la plage. La mesure de la radioactivité de cette plage est la somme

$$A = \int\int_{\Sigma} a(x, y)\, dx\, dy$$

Comme la longueur du diaphragme est supérieure à la largeur de la bande, l'intégrale double est ramenée à une intégrale simple, la variable étant l'élongation dans le sens du mouvement :

$$A = \int_{x_1}^{x_2} a(x)\, dx$$

C'est la raison pour laquelle il faut planimétrer la courbe obtenue au milliampèremètre enregistreur, après déduction de l'effet zéro, et éventuellement correction pour la perte statistique d'impulsions, lors de la mesure de grandes radioactivités. La hauteur des sommets de cette courbe ne peut être prise en considération, car la répartition de la radioactivité sur les plages et leur étendue varient grandement d'un cas à l'autre.

Les milliampèremètres enregistreurs choisis doivent avoir une réponse linéaire et les coordonnées du papier doivent être rectangu-

laires; l'intégration est alors facile, à l'aide d'une mesure au planimètre. Lorsque la plume de l'instrument n'a pas un déplacement rectiligne mais se meut sur un segment de cercle, ou lorsque le graphique n'a pas des ordonnées linéaires, l'intégration est beaucoup plus délicate.

Quoiqu'il soit possible théoriquement de calculer l'efficacité d'un tel appareillage, s'il est nécessaire de passer des mesures relatives en cpm aux valeurs absolues en dpm ou en μC, il vaut mieux avoir recours à un étalonnage à l'aide d'une substance dont la radioactivité absolue est connue.

Si l'on dépose simplement le produit sur le papier, sans le faire migrer par chromatographie, on obtient le plus souvent, par « autochromatographie » une courbe à deux pics séparés par un col, qui montre clairement que le produit s'est réparti dans le papier sous forme annulaire. Ce fait montre suffisamment que seule une détermination de surface est valable.

Il est bon, dans les étalonnages au moins, de vérifier que la réponse est la même, que l'on mesure le verso ou le recto du chromatogramme. Des résultats différents témoigneraient d'un mauvaise chromatographie. Or, un simple dépôt donne souvent des résultats différents par mesure du recto, puis du verso. C'est pourquoi, il est plus précis d'effectuer la chromatographie du produit étalon et de mesurer la radioactivité sur une plage ayant migré.

Pour qu'un tel étalonnage soit valable, il faut, à cause de l'auto-absorption dans le papier, que toutes les plages aient à peu près une surface équivalente, et prendre un papier aussi mince que la technique chromatographique le permet.

Toutes les fois qu'une mesure relative est suffisante, il vaut mieux éviter de passer aux valeurs absolues, toujours entachées d'une erreur plus ou moins élevée, à ajouter à l'erreur statistique.

5. 2. 3. Calculs de l'erreur.

Pour apprécier les résultats obtenus, il est nécessaire de déterminer l'erreur statistique du comptage. L'erreur problable absolue sur la mesure de N impulsions est :

$$\sigma = \pm\, 0{,}6745\, \sqrt{N}$$

Cela équivaut à dire qu'il y a autant de chances que la valeur du résultat soit comprise à l'intérieur qu'à l'extérieur des limites :

$$N = -\, 0{,}6745\, \sqrt{N} \quad \text{et} \quad N = +\, 0{,}6745\, \sqrt{N}$$

Sur l'activité $A = N/t$ cpm, où t est le temps en minute pendant lequel N impulsions parviennent au détecteur, l'erreur probable absolue est :

$$\sigma_A = \frac{\pm\, 0{,}6745\, \sqrt{N}}{t} = \pm\, 0{,}6745 \sqrt{\frac{A}{t}}$$

et l'erreur relative (en %) :

$$\rho = \frac{100\ \sigma_A}{A} = \pm \frac{0{,}6745\ .\ 100}{\sqrt{At}} = \frac{\pm\ 67{,}45}{\sqrt{At}}$$

$$\text{ou} \qquad \rho = \frac{100\ \sigma_A}{A} = \frac{\pm\ 67{,}45}{\sqrt{N}}$$

Pour que ρ soit égal à $\pm$ 1 %, $\pm$ 2 %, $\pm$ 5 % et $\pm$ 10 %, il faut compter respectivement 4500 coups, 1100 coups, 200 coups et 45 coups.

Pour les très basses activités (Lerch et Bercier, 1960), le calcul est plus compliqué, car il faut tenir compte de l'erreur sur la mesure du *background*. Soit N_0, le nombre d'impulsions comptées lors de la mesure de ce dernier, A_0 et t_0 l'activité zéro et le temps de cette mesure, l'erreur absolue est :

$$\sigma_r = \pm\ 0{,}6745 \sqrt{\frac{A}{t} + \frac{A_0}{t}}$$

et l'erreur relative vaut :

$$\rho_r = \frac{100\ \sigma_r}{A - A_0} = \pm \frac{67{,}45}{A - A_0} \sqrt{\frac{A}{t} - \frac{A_0}{t}}$$

Si les nombres d'impulsions comptées, N et N_0, sont égaux, on obtient un résultat plus simple :

$$\rho'_r = \frac{100\ \sigma_r}{A - A_0} = \frac{67{,}45}{\sqrt{At}}\ \frac{\sqrt{A^2 + A^2_0}}{A - A_0}$$

$$= \rho\ \frac{\sqrt{A^2 + A^2_0}}{A - A_0}$$

Lors des mesures de la radioactivité par un intégrateur, le calcul de l'erreur statistique sur le courant à la sortie du circuit d'intégration conduit, pour l'erreur probable absolue, à l'expression suivante :

$$\sigma_i = \pm\ 0{,}6745 \sqrt{\frac{A}{2\ \theta}}$$

où A est l'activité (en cpm) et θ la constante de temps de l'intégrateur (en mn). Pour avoir la constante de temps θ (sec.), ce qui est plus usuel, la relation devient :

$$\sigma_i = \pm\ 0{,}6745 \sqrt{\frac{30\ A}{\theta}} = \pm\ 0{,}6745 \sqrt{\frac{30\ A}{RC_2}}$$

où R s'exprime en ohms et C_2 en farads.

$$\rho_i = \frac{100\ \sigma_i}{A} = \pm\ 67{,}45 \sqrt{\frac{30}{ARC_2}}$$

Ceci est valable pour une source fixe placée sous le détecteur, et l'on suppose que la mesure a lieu pendant un temps $t \leqslant RC_2$.

Qu'en est-il lorsque le chromatogramme défile à une vitesse v mm/s devant le détecteur, la largeur du diagramme étant d mm ?

Les relations précédentes n'ont un sens que si chaque partie du chromatogramme séjourne suffisamment longtemps devant le détecteur, pour que l'intégration soit complète (régime permanent).

Théoriquement, ce régime n'est atteint que pour un temps infiniment long. On peut montrer que :
après un temps égal à $t = 3\ RC_2$, $4\ RC_2$, $5\ RC_2$ et $6\ RC_2$ le régime permanent sera respectivement établi à 95 %, 98,2 %, 99,3 % et 99,8 %.

Pour des mesures plus précises, il est bon de choisir $t = 6\ RC_2$, mais il faut remarquer que souvent un passage un peu plus rapide ne fausse pas beaucoup les résultats, et peut rendre de grands services (chromatogrammes avec substances instables), soit $t = n\ RC$, on a évidemment :

$$v = \frac{d}{t} = \frac{d}{n\,RC} \text{ mm/s}$$

lorsque v et d sont bien choisis, les relations précédentes sont applicables. Le pouvoir séparateur désiré impose généralement d, lorsque les taches radioactives sont rapprochées; en outre, lors du choix de d, il faut tenir compte des dimensions de la fenêtre du détecteur, afin que l'efficacité géométrique reste sensiblement égale pour tous les points du papier se trouvant devant l'ouverture du diaphragme.

TABLEAU 4.

Caractéristiques de l'appareillage employé

Valeur de l'erreur probable en régime permanent ± en %

Avance de la platine : v en mm/mn — Constante de temps : θ en sec.

Ouverture du diaphragme : d en mm — Régime permanent établi à X %

v	θ	d	X	A en cpm				X	d	θ	v
				10^4	10^3	10^2	10				
20	2,5	2	92	2	7	23	74	100	2	2,5	2
		4	99	2	7	23	74	100	4		
		6	100	2	7	23	74	100	6		
	10	—	—	1	4	12	37	100	2	10	
		4	75	1	4	12	37	100	4		
		6	85	1	4	12	37	100	6		
	—	—	—	0,5	2	6	19	90	2	40	
		—	—	0,5	2	6	19	99	4		
		—	—	0,5	2	6	19	100	6		

Enfin, si *d* est trop petit, l'activité mesurée devient très faible et la mesure très imprécise.

Nous reportons dans le tableau 4 les valeurs de l'erreur probable en régime permanent et le % d'établissement du régime permanent en fonction des conditions de la mesure.

Pour les activités proches de l'effet zéro, les chiffres précédents ne conviennent plus et des corrections plus complexes devraient être tentées. Nous n'en parlerons pas, car la méthode de mesure par découpage du chromatogramme est beaucoup plus indiquée dans ces conditions.

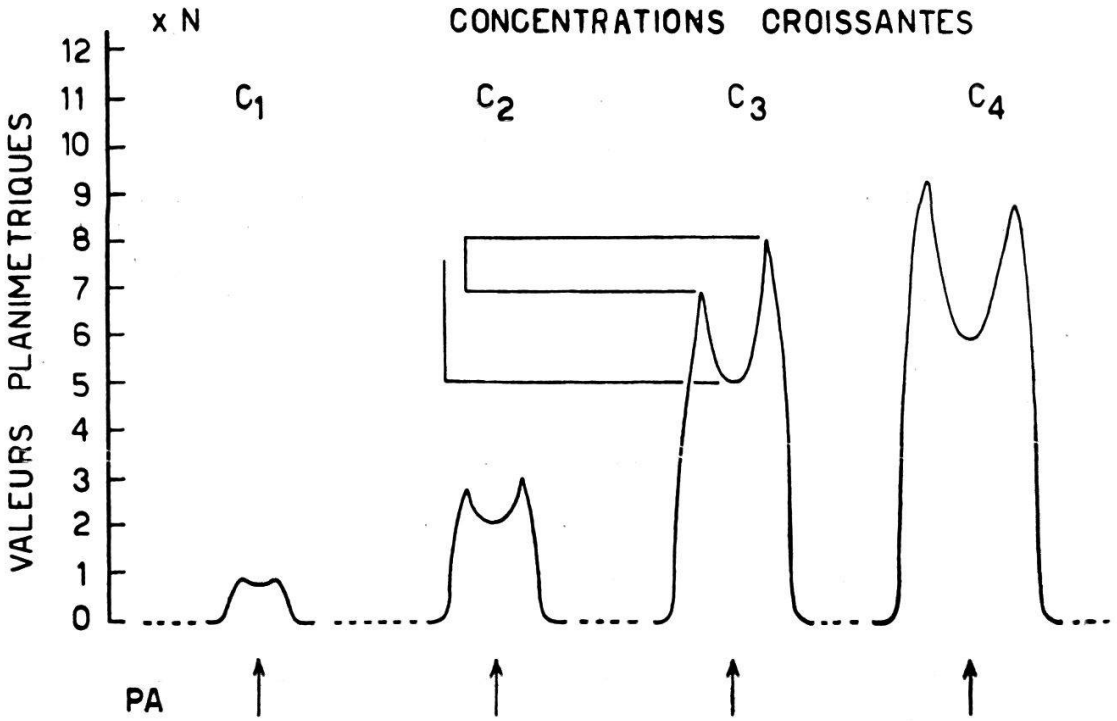

FIG. 14. — Autochromatographie de dépôts de quantités croissantes d'ABIA marqué au radiocarbone.
Rapport de concentration:
$C_2 / C_1 = 5$ $C_3 / C_1 = 18$ $C_4 / C_1 = 27$
Valeurs approximatives
PA : point d'application

5.3.
Quelques applications de la méthode radiochromatographique.

5.3.1. Introduction.

Avant d'utiliser systématiquement, pour l'expérimentation biologique, la méthode radiochromatographique qui vient d'être exposée, il nous est apparu indispensable de l'éprouver dans le cas particulier de l'ABIA ou de ses dérivés, marqués au carbone-14.

A cette fin, plusieurs essais ont été tentés; il s'agissait notamment de déterminer le rôle de l'activité spécifique de l'ABIA*, son influence éventuelle et celle de l'épaisseur du papier sur l'auto-absorption des radiations β molles du carbone-14; la répartiton initiale et finale de la radioactivité sur le papier était intéressante à examiner également, à cause de l'influence qu'elle pouvait exercer sur la reproductibilité de la méthode.

5. 3. 2. Dépôts non chromatographiés — autochromatographie.

Afin de connaître la répartition de l'ABIA sur le papier avant la chromatographie, et de déterminer la largeur optimum de la bande de papier, nous avons effectué un certain nombre de dépôts qui n'ont pas été suivis d'une chromatographie, et dont la radioactivité a été directement mesurée.

Cette expérimentation nous a permis de mettre en évidence une autochromatographie très marquée de l'ABIA. Par autochromatographie, nous désignons le processus de séparation automatique qui se produit au moment du dépôt de la substance à chromatographier, lors de son étalement sur le papier. Comme le montrent les courbes d'activité (fig. 14) la répartition de la radioactivité le long de la tache est variable aux alentours du point de dépôt et présente souvent un minimum en ce point. Il y a donc une migration de la substance radioactive dans le papier pendant que celui-ci est imbibé de solvant.

Tableau 5.

Autochromatographie d'ABIA marqué au C^{14}.

ABIA déposé		Activité mesurée relative (unités arbitraires)	Rapport de l'activité mesurée à la radioactivité déposée
Radioactivité μC	Masse totale mg		
7,4	0,185	320	43
4,3	0,108	215	50
1,1	0,028	63	57
0,27	0,0068	14,8	55
0,075	0,0019	4,0	53
0,38	0,202	23,2	61
0,055	0,029	2,92	53

Les dimensions de l'anneau d'ABIA* ainsi constitué varient avec la masse de l'ABIA déposé et la quantité de solvant utilisée. Dans certains cas le radiochromatogramme ne montre pas de double pic,

mais seulement un sommet très élargi, terminé par un plateau incurvé vers le bas ou vers le haut. Enfin, lorsque la masse de l'ABIA déposé est suffisamment faible (10 à 20 γ) le phénomène d'autochromatographie ne s'observe pratiquement plus. De toute manière, les dimensions de l'anneau sont telles que la largeur choisie (32 mm) pour les bandes de papier est suffisante.

Nous avons cherché, par mesure de l'activité relative du dépôt autochromatographié, si la radioactivité décelée dans plusieurs dépôts d'importance croissante était bien proportionnelle à la quantité d'ABIA* déposé. Les valeurs obtenues (tableau 5) montrent que si la proportionnalité est respectée, la précision laisse bien à désirer. L'auto-absorption dans la substance et le papier, mais surtout l'inégale répartition de celle-ci, sont à incriminer.

5. 3. 3. Dépôts chromatographiés.

Des dépôts analogues à ceux qui ont été réalisés pour étudier l'autochromatographie ont été chromatographiés. Nous avons alors procédé à la mesure relative de l'activité afin de contrôler si la radioactivité décelée était bien proportionnelle à la quantité d'ABIA* déposé. Les valeurs obtenues sont données dans le tableau 6.

A nouveau, si la proportionnalité est grossièrement respectée, la précision laisse beaucoup à désirer.

Tableau 6.

Chromatographie d'ABIA marqué au C^{14}.

ABIA chromatographié		Activité mesurée relative (unités arbitraires)	Rapport de l'activité mesurée à la radioactivité déposée
Radioactivité μC	Masse totale mg		
7,4	1,85	230	31
4,3	0,108	150	35
1,1	0,028	25,5	23
0,27	0,0068	8,9	33
0,075	0,0019	2,25	30
0,38	0,202	12,9	34
0,055	0,029	1,98	39
0,014	0,0072	0,55	39

Comme dans la série précédente, (v. tableau 6) les derniers essais sont effectués avec une activité spécifique différente, environ 20 fois plus faible. Une partie de l'imprécision, plus marquée pour ces es-

sais, doit venir de la qualité différente de l'ABIA non radioactif utilisé pour ces dilutions.

Les radiochromatogrammes montrent nettement un traînage plus ou moins accentué qui indique que la pureté radiochimique de l'ABIA* n'est pas excellente : les impuretés également marquées, éloignées par la séparation chromatographique, contribuent à expliquer les différences importantes qui existent entre les valeurs des dernières colonnes des tableaux 5 et 6. L'hétérogénéité du papier et la répartition de l'ABIA contribuent à expliquer aussi l'imprécision des résultats d'une part, et les différences entre les valeurs des tableaux 5 et 6.

5. 3. 4. Conclusions.

S'il est théoriquement possible d'utiliser la méthode radiochromatographique d'une manière absolue, pratiquement les difficultés de mise au point portent à y renoncer. Les raisons principales peuvent être résumées ainsi :

a) le processus chromatographique n'est jamais strictement quantitatif.

b) la non uniformité de l'épaisseur du papier et de la répartition du matériel chromatographié entraînent, *dans le cas d'émetteurs de radiations* β *molles comme celles du* C^{14} *notamment* (a fortiori dans le cas du tritium), des erreurs de géométrie et d'auto-absorption assez considérables pour rendre la mesure de radioactivité peu précise.

c) Lorsque la pureté radiochimique des substances chromatographiées n'est pas grande (substances autodégradées sous l'action de leurs propres radiations par exemple) un artefact est créé.

C'est pourquoi dans la pratique du laboratoire, l'emploi de la radiochromatographie comme méthode relative est préférable, pour les radioéléments à radiations molles notamment (H^3, C^{14}, S^{35} ...).

6. ABIA MARQUE PAR DU C^{14}

Dans les essais dont il est fait mention ici, nous avons utilisé deux types de molécules d'ABIA marquées par du C^{14} :

1) celle dont le C^{14} se trouve dans la chaîne latérale ;
2) celle dont le C^{14} est contenu dans le cycle.

6. 1. C^{14} dans la chaîne latérale.

Deux types de composés sont actuellement en vente dans le commerce :

a) *C^{14} dans le - COOH.*

Il s'agit de l'acide β-indolyl-acétique [$C^{14}OOH$] qu'on peut appeler aussi acide indolyl-3-acétique [$C^{14}OOH$].

Ce produit est relativement peu intéressant pour des essais biologiques. Mentionnons qu'il a été toutefois utilisé avec succès par SHAW et HAWKINS (1958) dans des essais de décarboxylation de l'ABIA. On le fabrique à partir de la gramine et du $NaC^{14}N$ (FANG et BUTTS, 1957).

b) *C^{14} dans le - CH_2 - .*

Il s'agit de l'acide β-indolyl-acétique [C^{14} α'] appelé aussi acide indolyl-3-acétique [C^{14}α]. Cette substance se prépare actuellement selon la technique de STUTZ, ATKINSON et GORDON (voir STUTZ, 1957), également à partir de gramine (marquée par la combinaison de l'indole avec le diméthylamino-hydroxy-méthane, substance marquée par du C^{14} en - CH_2 -).

6. 2. C^{14} dans le cycle.

Il s'agit surtout d'ABIA marqué en position α du noyau et qu'on apelle acide β-indolyl-acétique [C^{14}α] ou acide β-(C^{14}-2-indolyl) acétique ou encore acide indolyl-3-acétique [C^{14}]-2.

Ce produit qui a été employé pour la première fois par RAY et THIMANN (1956) pour des expériences d'inactivation enzymatique de l'ABIA, est préparé selon la technique de PICHAT, AUDINOT et MONNET (1954). Ce procédé consiste à traiter l'o-formo-toluidine par du formiate d'éthyle marqué par du C^{14}; l'o-formo-toluide formée donnera de l'indole marqué.

6. 3. Molécules employées.

Nous avons utilisé :

1. de l'acide β-indolyl-acétique [C^{14}α'] fabriqué par le « Radiochemical Centre » d'Amersham (England) ; l'activité spécifique de cette substance est de 3,82 mc/mM ;
2. de l'acide β-indolyl acétique [C^{14}α] synthétisé par le « Centre d'Etudes nucléaires » de Saclay (France) ; l'activité spécifique de ce produit est de 6,9 mc/mM.

La première substance a, avant tout, servi à des essais préliminaires, les graphiques que nous donnons dans ce travail ont tous été construits à partir de résultats obtenus avec le second composé.

6. 4. Protection.

Lorsqu'on travaille avec le C^{14}, les précautions à prendre sont relativement modérées. En effet, le C^{14} figure dans la classe 4, celle des radioéléments les moins toxiques. Pour un laboratoire de re-

cherches en biochimie, il est actuellement admis [11] que des quantités allant jusqu'à 10 mC peuvent être manipulées sans précautions spéciales. A titre d'indication, le soufre-35 et le phosphore-32 figurent dans la classe 3 et la limite est fixée à 1 mC. Il est rare qu'on soit appelé à manipuler des quantités de radioisotopes supérieures à ces normes.

L'organisme inhalant du C^{14} sous forme de $C^{14}O_2$ ou de poussières contenant des produits marqués au C^{14}, ne garde pas longtemps ces composés, le danger ne doit pas être toutefois sous-estimé. Au cours des manipulations, une grande propreté doit être observée. C'est par ailleurs une garantie quant aux mesures suivantes, la contamination des instruments conduisant aux erreurs les plus insidieuses.

Par surcroît de précaution, le personnel porte en permanence des films dosimétriques qui renseignent sur la dose accumulée. Ces films sont développés tous les quinze jours dans un centre spécialisé: ils doivent donner les doses β et γ. Les locaux et en particulier les tables de travail sont périodiquement contrôlés pour la contamination, à l'aide d'un instrument muni d'un compteur Geiger-Müller. La manipulation des quantités plus importantes se fait sous hotte ventilée: les surfaces de travail sont recouvertes d'un revêtement facilement détachable et remplaçable en cas de contamination.

Enfin, les règles générales pour la manipulation des radioisotopes sont observées.

7. DOSAGE RADIOCHROMATOGRAPHIQUE

L'essentiel de la technique a déjà été dit à propos de la discussion de la méthode biochromatographique, aussi serons-nous très bref dans la description de cette méthode.

7.1. Extrait enzymatique.

Des extraits aqueux sont préparés comme précédemment (v. p. 217): puis la période d'incubation enzymatique achevée, on récupère l'ABIA par de l'éther (v. p. 226).

7.2. Séparation chromatographique.

On applique une fraction de cette solution éthérée (tache initiale), (v. p. 225).

La préparation du papier est toutefois légèrement différente, on utilise du papier Whatmann n° 1, mais les feuilles sont de plus petit format que celles qu'on emploie pour le dosage biochromatographique. De plus, pour éviter une dispersion des composants auxiniques au cours de la diffusion du solvant, on utilise des papiers perforés (fig. 15).

7.3. Recherche du Rf.

Des essais contrôle sont réalisés, en partant d'une solution éthérée ne contenant que de l'ABIA*. On détermine alors les valeurs

[11] Safety Serie n° 1, International atomic Energy Agency, Vienna, 1958.

du Rf de l'ABIA*; on procède à l'analyse 1° dans le sens de la migration du solvant, 2° perpendiculairement.

Des analyses parallèles sont faites avec notre réactif (v. p. 219). On peut remarquer (fig. 16) que la technique radiochimique est plus sensible que la méthode colorimétrique : en effet, la zone périphérique de la tache, dont les contours sont révélés par le *ratemeter*, n'est pas marquée par la coloration (la concentration de l'ABIA y étant vraisemblablement trop faible).

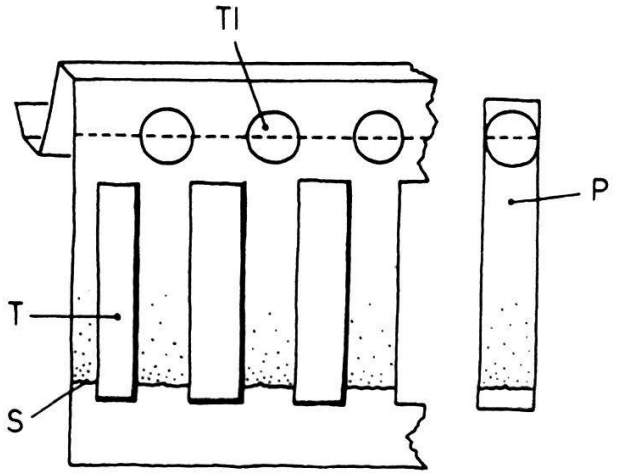

FIG. 15. — Type de papier chromatographique employé pour la séparation (chromatographie descendante) des produits marqués.
P : chromatogramme — Ti : tache initiale — T : trou — S : front du solvant.

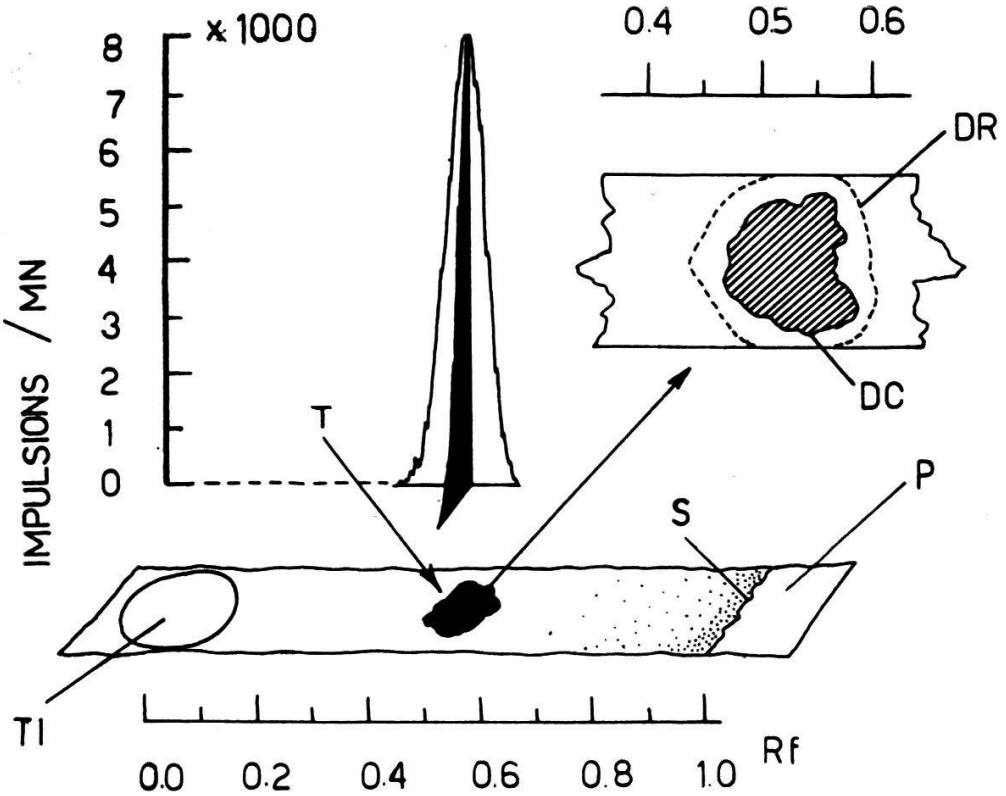

FIG. 16. — Comparaison de la méthode radiochimique et de la technique colorimétrique TI : tache initiale — S : front du solvant — T : tache révélée — DC : région détectée par un dosage colorimétrique — DR : région détectée par un dosage radiochimique — P : papier chromatographique.

7.4. Correction.

On procède à des expériences témoins pour déterminer les valeurs des facteurs de correction α (v. p. 227) et β (v. p. 231).

7.5. Mesures.

Le papier, une fois séché, est alors passé directement sous le compteur (v. p. 236) et les impulsions correspondant à la présence du C^{14} sont immédiatement enregistrées (v. p. 237).

7.6. Expression des résultats.

La distribution sur le chromatogramme de l'ABIA* et des divers composés auxiniques contenant du C^{14} et qui résultent de la dégradation enzymatique de l'ABIA* peut être donnée de diverses façons :

a) *Valeurs d'impulsion.*

On peut indiquer directement le nombre d'impulsions par minute enregistrées au compteur et représenter la variation du nombre d'impulsions en fonction du Rf.

b) *Valeurs planimétriques.*

A partir des courbes d'impulsions, on peut, à l'aide de mesures planimétriques, déterminer (v. p. 240 et 254) la surface comprise entre la courbe et l'axe. A cet effet, nous utilisons l'instrument suivant : Kompensations-Planimeter Coradi n° 37-III.

c) *Valeurs en μg d'ABIA.*

Connaissant l'activité spécifique de l'ABIA*, on peut construire une courbe étalon qui donne la correspondance entre le nombre d'impulsions/mn et la concentration en μg d'ABIA. Par suite, on peut traduire les valeurs correspondantes données en *a*), en μg d'ABIA. Ces données quantitatives seront calculées en tenant compte des coefficients de correction α et β.

d) *Valeurs en %.*

Enfin, on peut exprimer le % d'ABIA* (et par conséquent le % des composés auxiniques, marqués par du C^{14}, formés) en partant directement des valeurs planimétriques. Supposons, par exemple, que l'on ait, au début de l'expérience, de l'ABIA* (à un Rf déterminé) correspondant à S mm^2. Après une incubation enzymatique de *t* mn, on constate que la surface correspondant à l'ABIA a baissé, elle vaut par exemple S′ et qu'un autre composé marqué apparaisse pour un autre Rf et corresponde à une mesure planimétrique de *s* mm^2. Tenant compte des facteurs α et β, on doit pouvoir écrire :

$$S - S' = s \text{ mm}^2$$

mais on peut poser que :

$$S \text{ mm}^2 = 100\ \%$$

par conséquent :

$$S' \text{ mm}^2 = \frac{S'}{S} \cdot 100\ \%$$

et

$$s \text{ mm}^2 = \frac{s}{S} \cdot 100\ \% = \frac{S - s'}{S} \cdot 100\ \% = \left(1 - \frac{S'}{S}\right) \cdot 100\ \%.$$

8. DESTRUCTION ENZYMATIQUE DE L'ABIA*

8. 1. Principe.

A une quantité déterminée d'extrait (on emploie le plus souvent le mélange suivant : *a*) extrait brut ... 4 ml — *b*) Sol. tampon (pH 6,1) ... 4 ml — *c*) Eau déionisée ... 8 ml), on ajoute de l'ABIA* en solution aqueuse (4 ml d'ABIA* à 50 μg/ml). Après une incubation variable qui se déroule dans les mêmes conditions que pour l'analyse biochromatographique (v. p. 234) on récupère l'ABIA qui n'a pas encore été détruit dans la solution, ainsi que les composés qui se sont formés par dégradation enzymatique, dans de l'éther (v. p. 226). On procède ensuite à la séparation chromatographique du mélange et on détermine la distribution du C^{14} sur le chromatogramme (v. 249).

L'ABIA qui reste sera représenté par la teneur en C^{14} trouvée dans les zones de Rf correspondant à l'ABIA (Rf compris entre 0,45 et 0,60) et les composés résultant de la décomposition de l'ABIA seront également caractérisés par la présence de C^{14} sur le chromatogramme ailleurs que dans les régions où s'est accumulé l'ABIA.

8. 2. Premiers résultats.

Ainsi qu'on l'a vu plus haut, on peut exprimer la teneur en C^{14} de diverses façons. Pour une analyse préliminaire, on se borne à reporter, en fonction du Rf, les résultats :

a) en impulsions / mm (fig. 16 A) ;
b) en mm² (planimètre) (fig. 16 B).

Ces graphiques, qui donnent la distribution du C^{14} sur le chromatogramme en fonction de la durée d'incubation enzymatique, permettent de tirer quelques conclusions :

1° C'est dans une zone à peu près identique à celle où l'on avait localisé l'ABIA que se trouve, du moins pour un temps d'incubation faible, le maximum du C^{14} décelé.

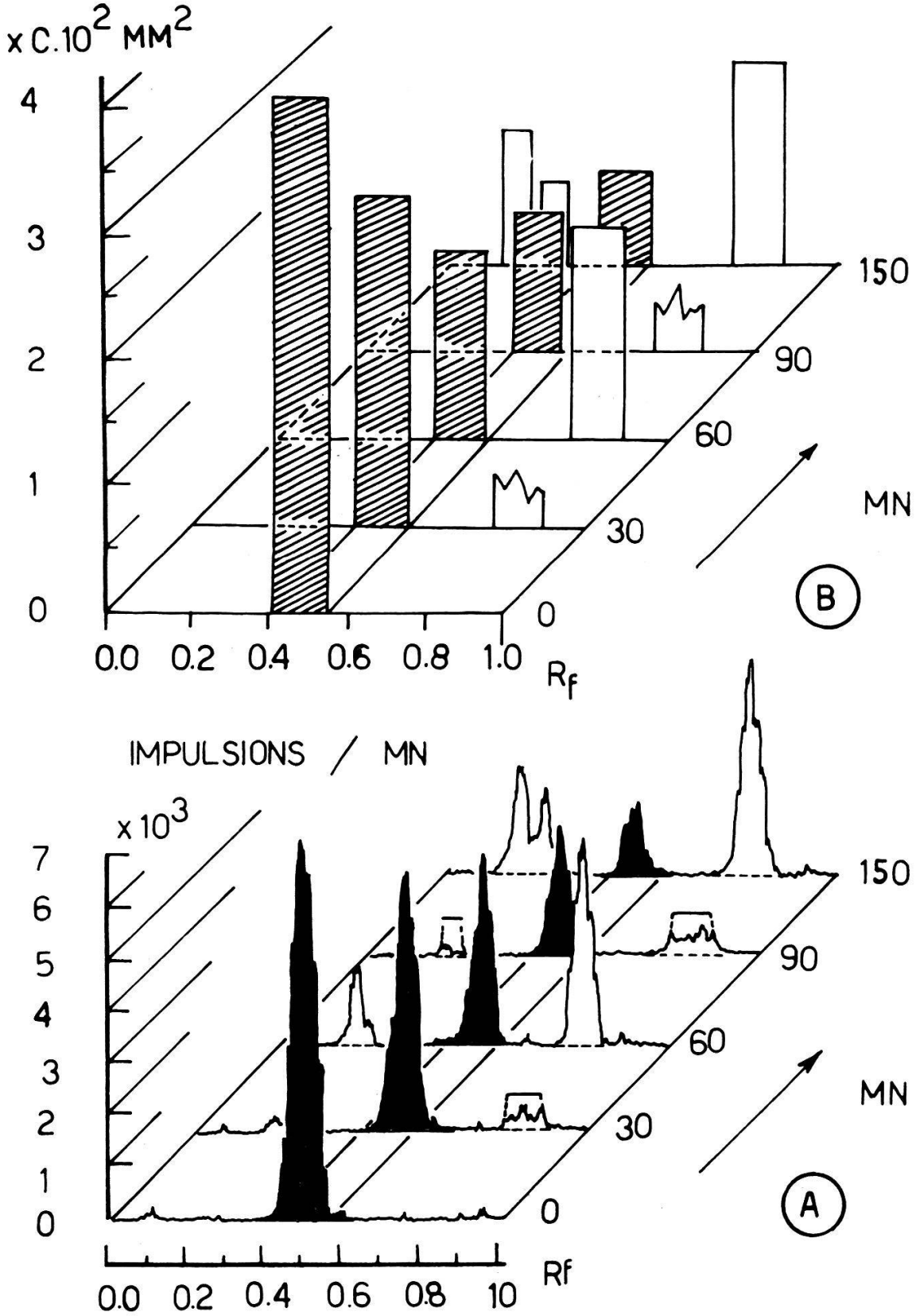

FIG. 17. — Dégradation enzymatique de l'ABIA marqué par du radiocarbone.
A. Impulsions trouvées pour les diverses zones (Rf différent) du radio-chromatogramme et ceci pour divers temps d'incubation enzymatique en mn (contact de la solution d'ABIA marqué avec un extrait de nature auxines-oxydasique).
B. Ces impulsions sont « converties » en valeurs planimétriques (mm²).

2° Plus le temps d'incubation enzymatique augmente, moins on trouve de C^{14} dans cette zone. Ceci signifie évidemment que l'ABIA est progressivement détruit.

3° Parallèlement à cette reduction du taux en C^{14} dans la zone correspondant au Rf de l'ABIA, on note l'apparition de C^{14} dans d'autres régions du chromatogramme.

4° Ces zones qui s'« enrichissent » en composés marqués par du C^{14}, doivent donc correspondre à des produits nouveaux qui se sont formés aux dépens de l'ABIA*. Il s'agit de véritables substances de dégradation, par voie enzymatique, de l'ABIA*.

8. 3. Dosages quantitatifs.

Les valeurs données en termes d'impulsions par mm, ne sont pas commodes pour la discussion des résultats. Nous avons vu plus haut (fig. 16 B) qu'on pouvait les exprimer par des mesures de surface, et nous avons dit, à propos des techniques radiochimiques, qu'il s'agissait de déterminer la surface comprise entre la courbe d'impulsions et l'axe des X (fig. 18). La mesure de cette surface se fait au planimètre, mais deux méthodes peuvent être envisagées :

1) On peut d'abord découper la courbe d'impulsion en une série de bandes (fig. 18 A) de hauteurs différentes, mais dont la largeur correspond très exactement à une zone déterminée du Rf,

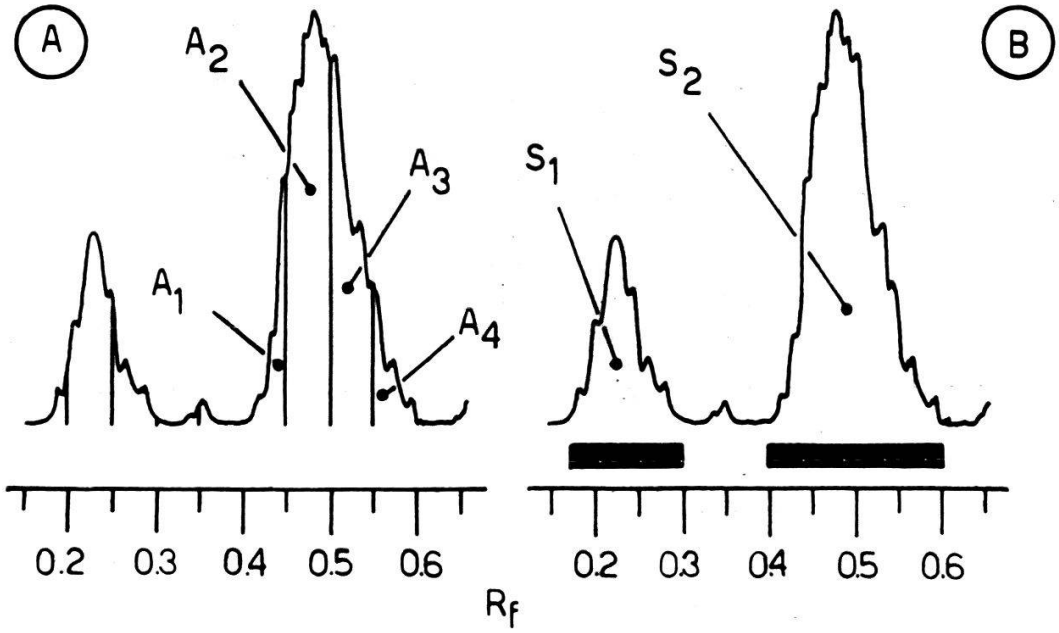

Fig. 18. — Mesures planimétriques.

A. Chaque courbe est découpée en bandes correspondant à un Rf donné et dont on mesure la surface partielle (A_1, A_2, A_3, A_4).

B. Chaque zone, correspondant à une substance déterminée, est exprimée par une surface particulière (par exemple S_2).

Dans ce cas : $S_2 \cong A_1 + A_2 + A_3 + A_4$.

TABLEAU 7.

Dosages radiochromatographiques

ABIA détruit par des extraits auxines-oxydasiques (pointes (6 mm) de racines de 18 mm de longueur)
Valeurs planimétriques (en mm²) par « unité » de Rf.

Rf	Temps d'incubation (minutes)		
	0	60	150
0,00 - 0,05	2	0	0
0,05 - 0,10	1	2	0
0,10 - 0,15	3	6	12
0,15 - 0,20	1	27	80
0,20 - 0,25	0	8	16
0,25 - 0,30	2	9	12
0,30 - 0,35	0	5	29
0,35 - 0,40	4	2	1
0,40 - 0,45	72	24	13
0,45 - 0,50 (1)	310	103	31
0,50 - 0,55	68	40	10
0,55 - 0,60	9	6	7
0,60 - 0,65	3	1	0
0,65 - 0,70	0	3	2
0,70 - 0,75	2	2	4
0,75 - 0,80	1	53	31
0,80 - 0,85	3	112	77
0,85 - 0,90	4	29	54
0,90 - 0,95	2	1	3
0,95 - 1,00	1	0	2

(1) ABIA*

par exemple, de 0,00 à 0,05 — 0,05 à 0,10 ... 0,95 à 1,00. Le chromatogramme est ainsi découpé en 20 parties, chacune étant définie par une surface particulière. Cette méthode est évidemment à rapprocher de la technique biochromatographique dans laquelle nous découpions, pour l'élution, le chromatogramme en 20 parties égales dont on déterminait la teneur en facteurs actifs sur la croissance.

2) Lorsqu'on examine les courbes d'impulsions, on voit très facilement un certain nombre de « pics » qui correspondent chacun à

une substance ou à un groupe de produits caractérisés par un Rf identique. Au lieu de découper la courbe et de donner la valeur de la surface pour chaque zone de Rf, on peut alors mesurer la surface correspondant à ces produits et qui s'étale sur plusieurs « unités » de Rf) (fig. 18 B). Chaque substance séparée se trouvera ainsi caractérisée par une surface déterminée.

TABLEAU 8.

Distribution du C^{14} (mesures planimétriques (S en mm^2) et valeurs en %) en fonction du Rf et de la durée de l'incubation enzymatique (T en mn)

Extrait enzymatique : pointes (6 mm) de racines de 18 mm.

T	Mesures	ABIA	Prod. de dégradation			Total	Δ (1)
			I	II	III		
0	S	450	0	0	0	450	0
	%	100	0	0	0	100	0
30	S	351	59	14	9	432	16
	%	78	13	3	2	96	4
60	S	167	194	41	14	416	34
	%	37	43	9	3	92	8
90	S	104	167	104	23	398	52
	%	23	37	23	5	88	12
120	S	90	135	108	59	392	58
	%	20	30	24	13	87	13
150	S	54	162	108	41	365	85
	%	12	36	24	9	81	19

(1) Δ = Différence entre le total des valeurs initiales et celui qui a été calculé au temps T.

Le premier mode de représentation n'est pas très précis, il présente aussi le gros inconvénient de ne pas faciliter la « lecture » des résultats. Cette méthode est en outre relativement longue, car au lieu de mesurer planimétriquement quatre ou cinq surfaces assez grandes, il faut déterminer vingt surfaces, dont quelques-unes très petites. Toutefois, dans le tableau 7, nous donnerons quelques-uns des résultats obtenus à l'aide de cette technique de mesure.

Le second mode de représentation est plus rapide, plus simple, plus précis et surtout plus commode pour la discussion des valeurs

trouvées. Nous donnerons dans le tableau 8 les résultats obtenus de cette façon. Nous y avons ajouté les valeurs en % calculées comme on l'a indiqué plus haut (v. p. 252).

Ces deux tableaux, le second surtout, nous permettent les quelques remarques suivantes :

1. La dégradation enzymatique de l'ABIA s'accompagne d'une formation régulière de trois catégories de substances dont nous parlerons plus loin.

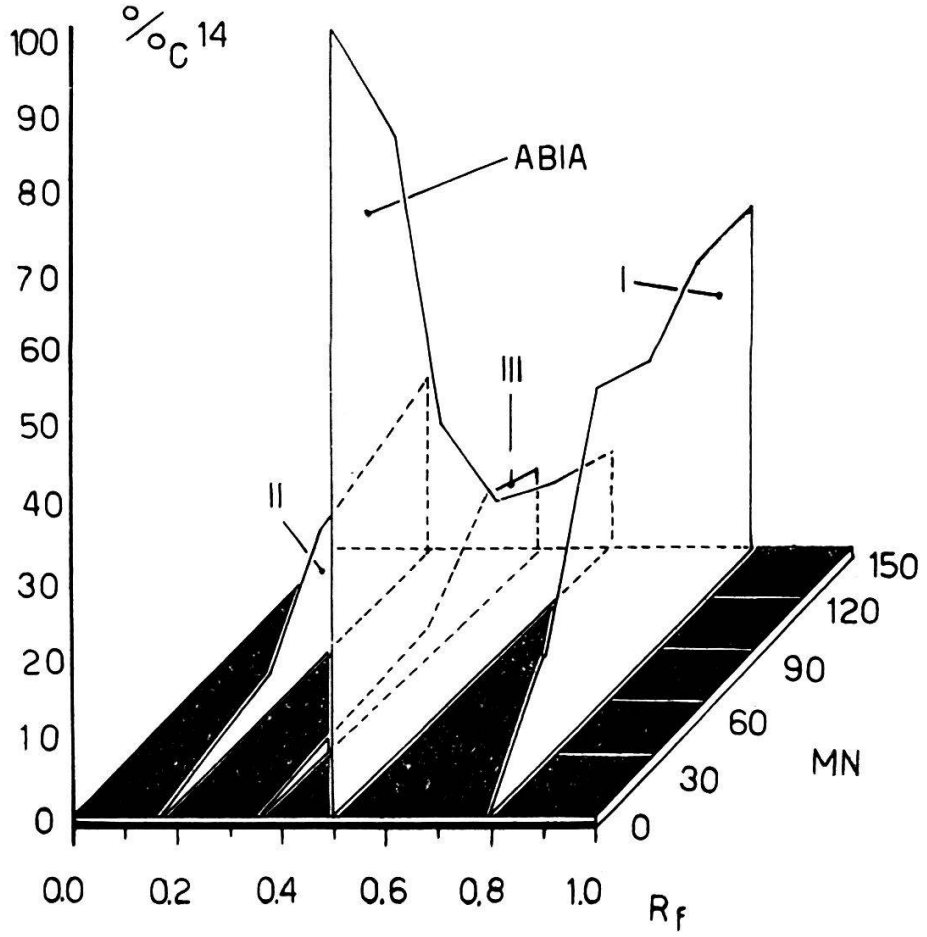

FIG. 19. — Concentration relative (exprimée en % de C^{14}) pour divers composés (I, II et III) formés à partir de l'ABIA marqué. Chacun de ces corps se trouve caractérisé par un Rf moyen. L'apparition de ces produits et la dégradation de l'ABIA sont donnés en fonction de la durée de l'incubation enzymatique (de 0 à 150 mn).

2. En fixant arbitrairement à 100 le taux en C^{14} pour de l'ABIA non dégradé, on constate que plus le temps d'incubation augmente, plus le total de tout le C^{14} étalé sur le chromatogramme s'éloigne de 100. On peut attribuer cette différence qui, après 150 mn d'incubation, atteint 19 %, au fait que d'autres composés se forment : les causes d'erreurs augmentent aussi sensiblement. Ajoutons que l'expérience étant évidemment plus longue si l'incubation se prolonge, les pertes de tout

ordre (malgré les corrections apportées aux valeurs définitives) s'accroissent dans la même mesure.

Ces résultats peuvent être donnés encore sous une autre forme qui mettra mieux en évidence, en fonction de la durée d'incubation et pour divers Rf, la transformation de l'ABIA* en composés également porteurs de C^{14} (fig. 19). On peut voir qu'après 150 mn d'incubation, certains produits au Rf différent de celui de l'ABIA sont plus abondants que cette substance. Nous reparlerons plus loin de ces composés.

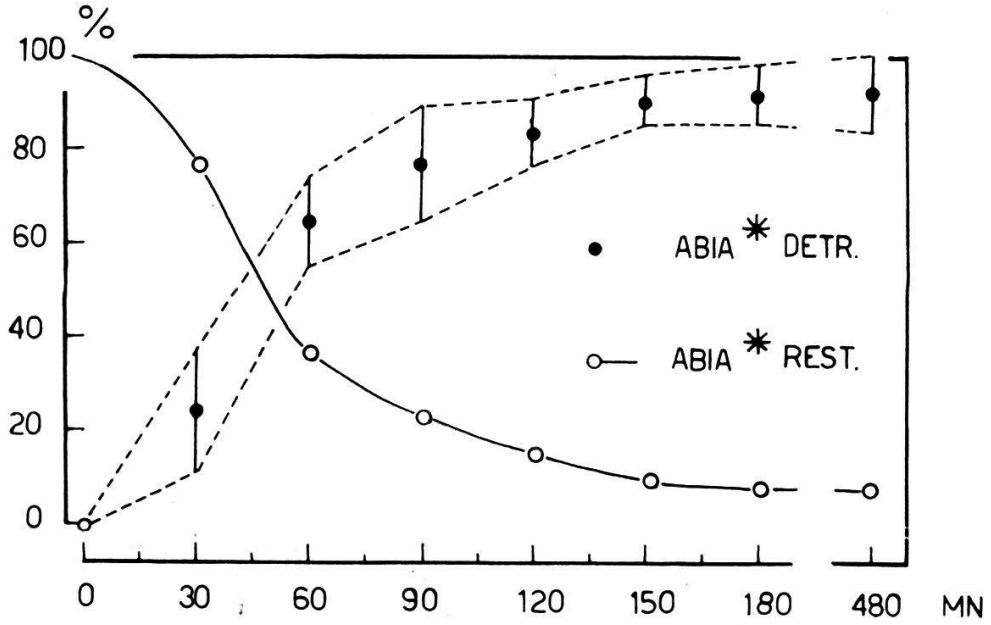

FIG. 20. — Destruction de l'ABIA marqué en fonction de la durée d'incubation enzymatique (de 0 à 480 mn). Les résultats sont donnés en % et calculés à partir des valeurs trouvées précédemment (v. FIG. 19).

8.4. Dégradation de l'ABIA.

Si l'on suit la dégradation de l'ABIA* en fonction du temps (fig. 20) en mesurant la quantité (donnée en % de C^{14}) d'ABIA* qui reste sur le chromatogramme, on peut constater que l'inactivation de cette substance est particulièrement rapide au début du traitement par l'extrait enzymatique. On peut alors introduire la *vitesse de dégradation de l'ABIA* qu'on calculera de la façon suivante :

1° L'ABIA* est rapporté en % de C^{14} par unité de poids frais de l'extrait enzymatique.

2° A partir des valeurs qui donnent la quantité d'ABIA* restant dans la solution c'est-à-dire celle qu'on peut évaluer sur le chromatogramme au Rf correspondant, nous déterminons, toutes les 5 mn, la concentration de l'ABIA disparu.

3° On a donc $\frac{dc}{dt}$ = vitesse de dégradation.

4° Pour éviter d'utiliser des valeurs en %, on exprimera la teneur relative en ABIA en fonction d'une constante N.

Les résultats de ces calculs sont donnés dans la fig. 21 et on peut, à ce propos, faire les remarques suivantes :

1° Pendant les 30 premières minutes d'incubation, la destruction enzymatique de l'ABIA* est relativement lente; la vitesse de dégradation augmente toutefois rapidement avec le temps d'incubation.

2° C'est pendant les 15 minutes (de 30 à 45 mn) qui suivent que la destruction est la plus intense; la vitesse de dégradation atteint sa valeur maximum.

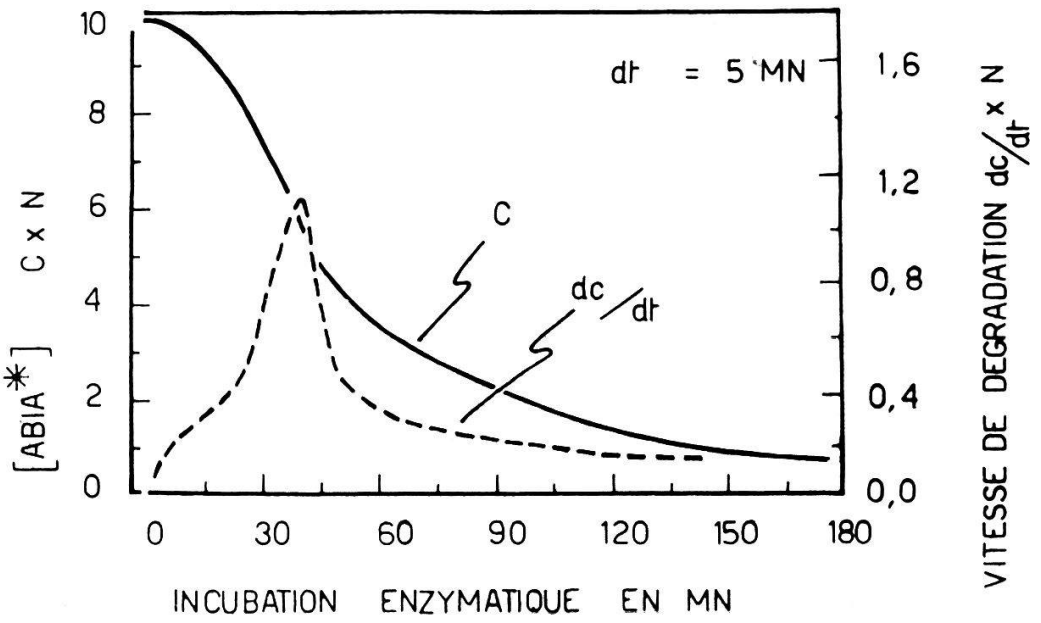

FIG. 21. — Dégradation enzymatique de l'ABIA marqué donnée en valeurs absolues (C) et en termes de vitesse de destruction (dc/dt) en fonction de la durée d'incubation enzymatique (en mn).

3° Puis pendant les nouvelles 30 minutes (de 45 à 75), la décomposition de l'ABIA* reste importante tout en diminuant sensiblement; la vitesse de dégradation est progressivement réduite.

4° Enfin, dès que la durée d'incubation dépasse 75 minutes, la destruction de l'ABIA est fortement ralentie et la vitesse de dégradation devient constante, tout en étant très faible.

8.5. Produits de dégradation.

Dans les résultats précédents (v. tableaux 7 et 8 et fig. 19), nous avons déjà pu constater que la décomposition de l'ABIA, sous l'action de systèmes enzymatiques s'accompagnait de l'apparition de trois ca-

tégories de substances distinctes. La fig. 22 nous permettra de mieux comprendre l'importance relative de ces corps.

Il est évidemment difficile, pour le moment, d'affirmer si ces composés sont des substances simples ou au contraire diverses substances dont le Rf serait semblable. Pour simplifier la discussion, nous admettons qu'il s'agit de trois « produits » que nous pouvons caractériser ainsi (tableau 9).

TABLEAU 9.

Rf de l'ABIA*, des produits de dégradation enzymatique de l'ABIA* et de quelques composés indoliques

Séparation par chromatographie descendante (25°C); solvant : 80 % isopropanol — 10 % NH_3 à 28 % — 10 % H_2O.

Composés	Rf		
	Inférieur	Supérieur	Moyen
ABIA*	0,41	0,53	0,46
Produit I	0,75	0,90	0,83
» II	0,10	0,25	0,18
» III	0,25	0,35	0,30
Ac. β-indolyl-propionique	0,43	0,55	0,49
Ac. β-indolyl-butyrique	0,50	0,64	0,57
β-indolyl-acétonitrile	0,75	0,89	0,82
β-indolyl-aldéhyde	0,80	0,96	0,88
Tryptophane	0,23	0,27	0,25
Tryptamine	0,69	0,81	0,75
Indole	0,91	0,99	0,95
Scatole	0,95	0,99	0,97

1° *Produit I* — Rf de 0,75 à 0,90.

Ce produit apparaît immédiatement au moment où l'ABIA commence à se dégrader. Après une incubation enzymatique de 60 mn approximativement, ce produit est plus abondant même que l'ABIA et sa concentration relative va rester constante pendant une période relativement grande alors que celle de l'ABIA continue à diminuer progressivement.

2° *Produit II* — Rf de 0,10 à 0,25.
Ce produit semble se former également assez tôt, il est toutefois moins abondant que le précédent. C'est après une incubation de l'ordre de 105 mn que sa concentration dépasse celle de l'ABIA.

3° *Produit III* — Rf de 0,25 à 0,35.
Ce produit est toujours peu abondant et jamais sa concentration n'est supérieure à celle de l'ABIA.

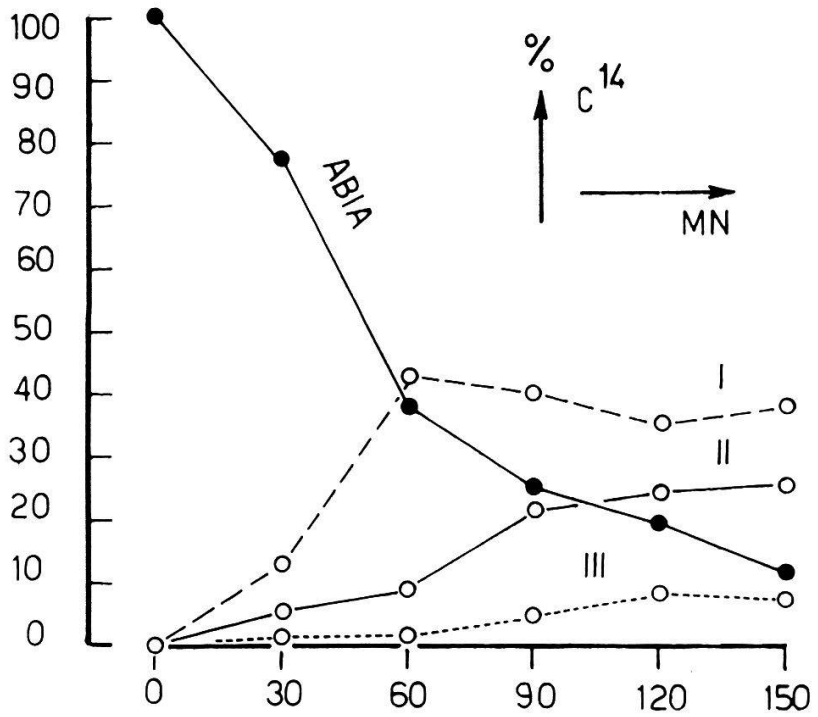

FIG. 22. — Concentration relative de l'ABIA et des composés (I, II et III) résultant de sa dégradation (en % de C^{14}) en fonction de la durée de l'incubation enzymatique (en mn.)

Quelle est la nature chimique des trois produits que nous avons mis en évidence ? Il est tout d'abord très clair que les produits I, II et III dérivent directement ou indirectement (v. discussion) de l'ABIA marqué, puisque, tous les trois, ils contiennent également du radiocarbone.

Le produit I semble être de la β-indolyl-aldéhyde, et ceci confirmerait les observations de RACUSEN (1955), tout en étant en contradiction avec celles de MANNING et GALSTON (1956). Nous avons identifié ce produit en faisant les observations suivantes :

a) Le produit I, isolé par radiochromatographie, a le même Rf approximativement que la β-indolyl-aldéhyde (séparée par chromatographie avec un solvant identique et dans de mêmes conditions).

b) Ce produit I doit être un composé indolique, il donne (par analyse directement sur le papier ou après élution) une coloration positive avec les trois réactifs suivants :

Réactif de Salkowski (H_2SO_4 et $FeCl_3$)
Réactif d'Ehrlich (HCl et p-diméthylaminobenzaldéhyde)
Réactif d'Hopkins-Cole (H_2SO_4 et acide glyoxylique).

c) Ce produit I enfin est certainement une aldéhyde. Après élution, il a été recueilli et traité par le réactif suivant : la p-rosaniline hydrochlorique décolorée par H_2SO_3. En présence de mélange incolore, les aldéhydes donnent une coloration rouge-pourpre (formation de composés quinoïdiques) qui ne peut être confondue avec la coloration prise par la fuchsine. Or nous avons obtenu une telle coloration.

Les *produits II et III* sont différents des substances que MANNING et GALSTON (1955) ont signalées. Avec un solvant chromatographique identique, les Rf de ces corps sont très différents (GALSTON trouvait respectivement 0,91 et 0,94). Pourtant, il n'est pas impossible que les produits II et III ne soient tout de même des composés voisins de l'o-formamido-acétophénone et de l'o-amino-acétophénone.

Il est certain, en effet, que ces substances ne sont pas de nature indolique. L'emploi des réactifs précédents, sur les papiers chromatographiques et dans les zones où se sont accumulées ces substances, n'a donné aucune coloration. On pourrait toutefois remarquer que ces produits sont trop dilués pour que le réactif chimique puisse les révéler. Mais, nous avons concentré trois fois (élution) ces substances sans pouvoir obtenir de résultats positifs.

8. 6. Discussion.

Comme on vient de le voir, les produits I, II et III, également marqués par du C^{14}, proviennent sans aucun doute de l'ABIA qui est, en fait, la seule « source » de radiocarbone. A première vue, on peut admettre que toutes ces substances dérivent directement de l'ABIA; pourtant cette conclusion n'est pas, comme on va le voir, aussi sûre qu'elle le paraît.

Le produit I qui semble bien être la β-indolyl-aldéhyde, peut être considéré comme le produit le plus important qui résulte de la dégradation de l'ABIA marqué, sous l'action d'un système auxines-oxydasique. Si l'on se rapporte aux valeurs données en % de C^{14}, on peut constater que la disparition de l'ABIA est immédiatement suivie par l'apparition du produit I. Il est clair que cette substance dérive directement de l'ABIA. Cependant si l'on établit un bilan du C^{14} tout le long du chromatogramme et si l'on tient compte des

pertes inévitables le long du papier, on doit constater que la concentration de l'ABIA détruit est nettement supérieure à celle du produit I formé. Il faut donc admettre que l'ABIA donne encore, parallèlement, mais dans une moindre mesure, des composés distincts du produit I. C'est bien ce que montre l'analyse radiochromatographique qui permet de mettre en évidence les produits II et III.

Ces produits II et III ne paraissent pas être des composés indoliques et l'on est donc obligé d'admettre que l'ABIA se dégrade non seulement par des modifications de sa chaîne (décarboxylation oxydative) mais encore par des changements appréciables dans son noyau (destruction du cycle pyrrole).

Si l'on suit, en fonction de la durée de l'incubation, la genèse du produit I, on constate que la vitesse de formation de cette substance coïncide à peu près avec celle qui traduit la dégradation de l'ABIA. Cette observation semble indiquer que cette voie de décomposition de l'ABIA est certainement la plus importante, du moins pour les premières phases de destruction, par voie enzymatique, de l'ABIA.

Pourtant, au bout d'un certain temps, alors que l'ABIA continue à être décomposé régulièrement, la concentration relative du produit I cesse pratiquement d'augmenter, sa vitesse de synthèse (nous devrions écrire d'apparition) devient constante. Comment expliquer ce phénomène ?

On peut admettre tout d'abord, que la formation de ce produit I est réellement réduite. Mais comme la décomposition de l'ABIA n'est que faiblement diminuée, il faut alors supposer que la synthèse, à partir de l'ABIA, de substances différentes s'accroît. C'est bien ce que montre l'expérience puisqu'on constate que la concentration relative des produits II et III augmente.

Cette hypothèse est pourtant difficilement soutenable, car on a peine à envisager en première analyse, qu'un système enzymatique se mette à dégrader d'une autre façon un substrat resté identique. Il est vrai qu'on pourrait faire intervenir ici des processus d'induction enzymatique (PILET, 1959 c) [12]. Mais une autre solution à ce problème nous paraît plus probable.

On pourrait imaginer que le produit I continue tout simplement à se former, à partir de l'ABIA, comme dans les premières phases de l'incubation enzymatique. Il faut alors supposer que parallèle-

[12] Par induction, nous entendons une adaptation de l'enzyme soit à la concentration de son substrat, soit à la nature chimique de ce substrat. Il est clair que l'apparition de substances de dégradation de l'ABIA (la β-indolylaldéhyde par exemple) peut être considérée comme une modification du substrat auxines-oxydasique.

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

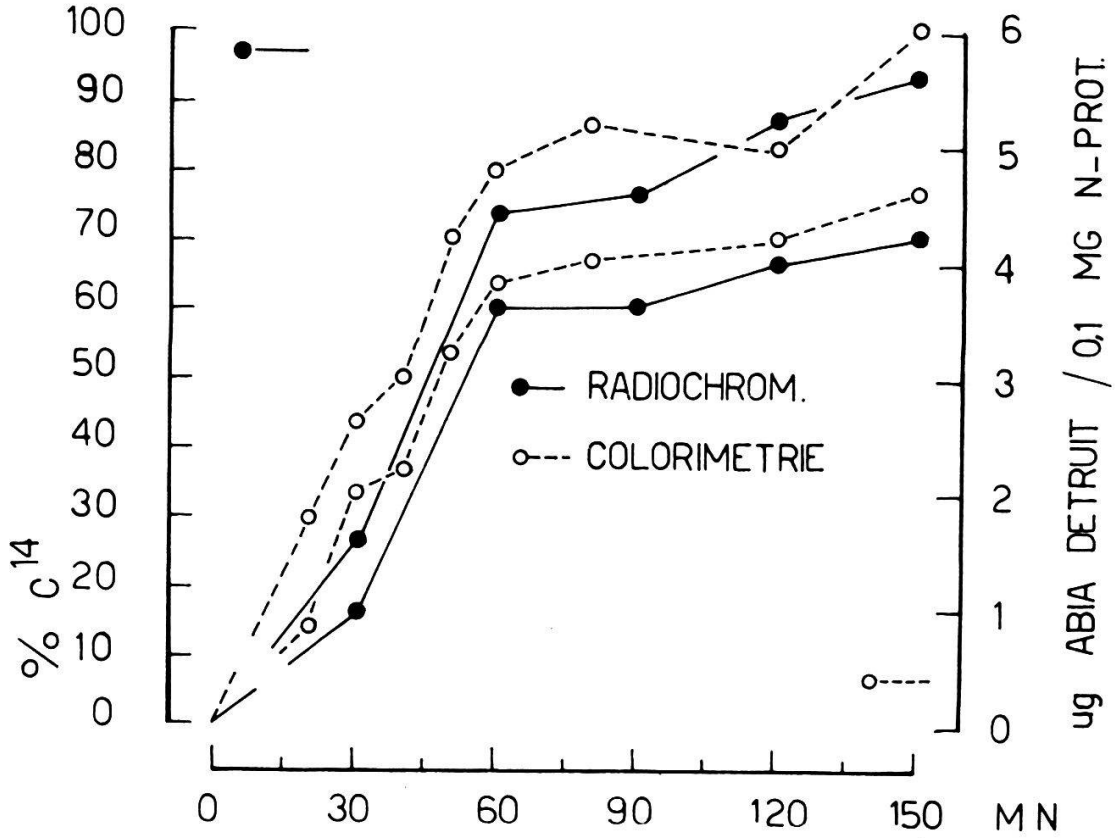

Fig. 23. — Destruction enzymatique de l'ABIA marqué par des extraits radiculaires de nature auxines-oxydasique. Comparaison des méthodes radiochromatographique et colorimétrique.
L'ABIA détruit est rapporté pour la première technique en % de C^{14} qui a disparu de la zone correspondant au Rf de l'ABIA 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.

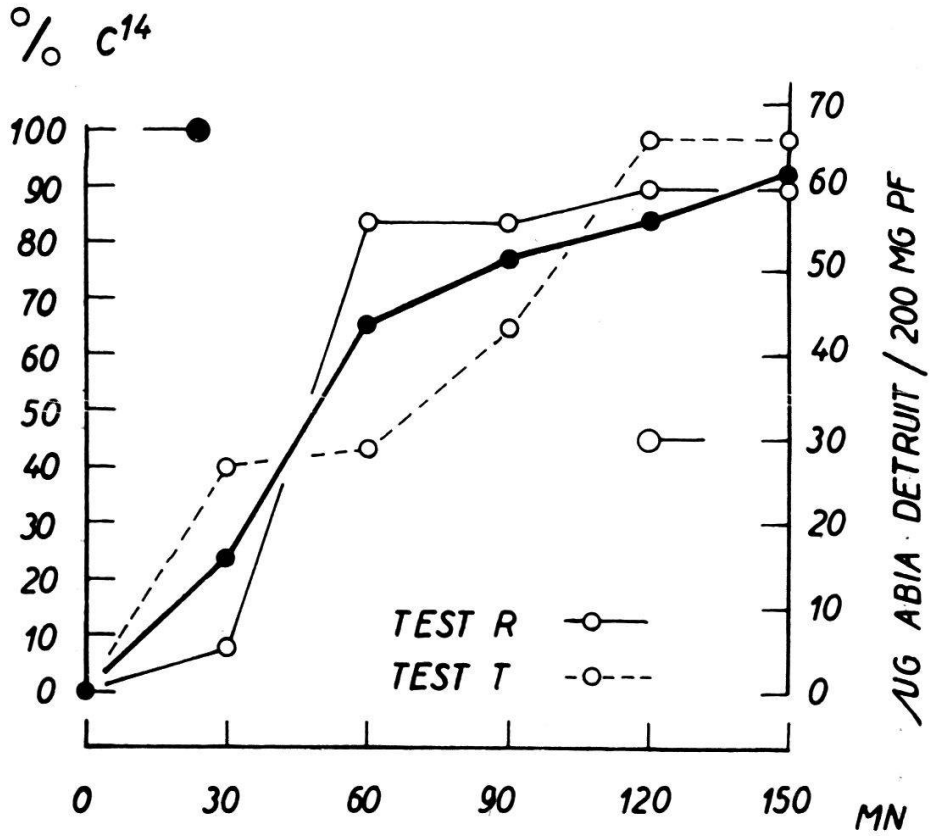

FIG. 24. — Destruction enzymatique de l'ABIA marqué par des extraits radiculaires de nature auxines-oxydasique. Comparaison des méthodes radiochromatographique et biochromatographique.
L'ABIA détruit est rapporté, pour la première méthode, en % de C^{14} qui a disparu de la zone correspondant au Rf de 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.

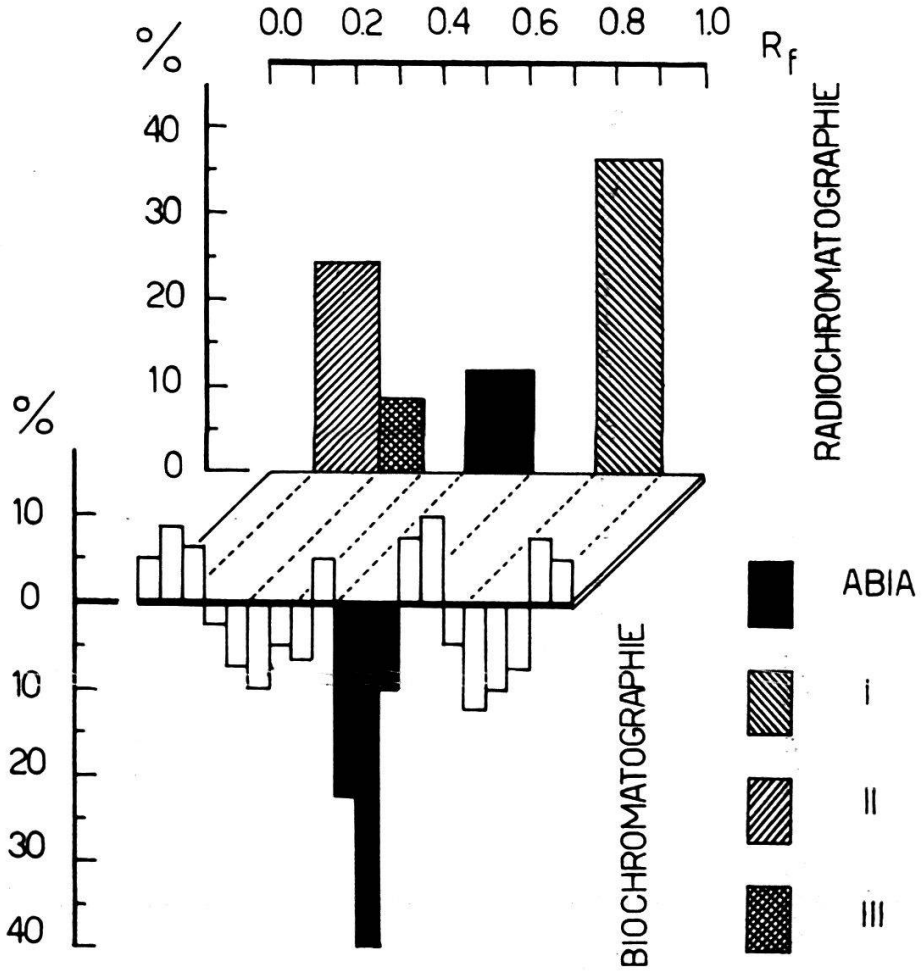

Fig. 25 — Comparaison des résultats obtenus par les méthodes radiochromatographique et biochromatographique. L'ABIA marqué par du radiocarbone est placé 150 mn en contact avec un extrait auxines-oxydasique préparé à partir de pointes de racines du *Lens*. On note la présence, outre de l'ABIA, de trois 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

contrôlées, imposent la collaboration presque permanente d'un physicien exercé à ces questions de technologie des radiations. Les résultats obtenus font souhaiter d'ailleurs, une autre collaboration, également indispensable et qui permettrait de mieux connaître la nature et les relations à établir entre les innombrables substances que de telles analyses ont permis de mettre en évidence. Avec le physicien, le physiologiste devra essayer de s'adjoindre un chimiste.

Les recherches sur les phytohormones de croissance accusent, une fois de plus, l'orientation caractéristique de la physiologie végétale d'aujourd'hui. Les perspectives qui progressivement s'imposent à cette science, les moyens d'analyse renouvelés qu'elle envisage et le matériel particulier auquel elle s'attache toujours davantage, la font entrer, qu'on le veuille ou non, dans le domaine autrefois strictement réservé aux sciences dites exactes.

Bibliographie.

1. Andreae W. A. et Andreae S. R., 1953. — Studies on indoleacetic acid metabolism. I. *Canad. J. Bot. 31,* 380.
2. — et Good N. E., 1955. — The formation of indoleacetylaspartic acid in pea seedlings. *Plant Physiol. 30,* 380.
3. Audus L. J. et Tresh R., 1953. — A method of plant growth substance assay for use in paper partition chromatography. *Physiol. Plant. 6,* 451.
4. Bentley A., 1950. — An examination of a method of auxin assay using the growth of isolated sections of *Avena* coleoptile in test solutions. *J. Exp. Bot. 1,* 201.
5. Dixon M., 1943. — Manometric methods. Macmillan Ed., New-York.
6. Fang S. C. et Butts J. S., 1957. — Studies of carboxyl-C^{14}-labelled 3-indoleacetic acid in plants. *Plant Physiol. 32,* 253.
7. Galston A. W., 1956. — Some metabolic consequences of the administration of indoleacetic acid to plant cells. *In* « The chemistry and mode of action of plant growth substances ». Wye College Proceedings of a symp.. London, 219.
8. — et Baker R. S., 1951. — Studies on the physiology of light action. III. Light activation of a flavoprotein enzyme by reversal of a naturally occurring inhibition. *Amer. J. Bot. 38,* 190.
9. — et —, 1953. — Studies on the physiology of light action. V. Photoinductive alteration of auxin metabolism in etiolated peas. *Amer. J. Bot. 40,* 512.
10. — et Dalberg L. Y., 1954. — The adaptative formation and physiological significance of indoleacetic acid oxidase. *Amer. J. Bot. 41,* 373.
11. — et Purves W. K., 1960. — The mechanism of action of auxin. *Ann. Rev. Plant Physiol. 11,* 239.

12. GARBARINI G., 1909. — Purification de l'éther sulfurique. *Bull. Assoc. Chim. Sucr. et Dist. France et Col. 26,* 1165.
13. GOLDACRE P. L., 1951. — Hydrogen peroxide in the enzymatic oxidation of heteroauxin. *Aust. J. Sci. Res. 4,* 293.
14. — , GALSTON A. W. et WEINTRAUB R. L, 1953. — The effect of substituted phenols on the activity of the indoleacetic acid oxidase of peas. *Arch. Biochem. Biophys. 43,* 358.
15. GORDON S. A., 1954. — Occurrence, formation and inactivation of auxins. *Ann. Rev. Plant Physiol. 5,* 341.
16. — et WEBER R. P., 1951. — Colorimetric estimation of indole-acetic acid. *Plant Physiol. 26,* 192.
17. GORTNER W. A. et KENT M., 1953. — Indoleacetic acid oxidase as an inhibitor in pineapple tissue. *J. Biol. Chem. 204,* 593.
18. KENTEN R. H., 1955. — The oxidation of indolyl-3-acetic acid by waxpod bean root sap and peroxidase systems. *Biochem. J. 59,* 110.
19. KULESCHA Z., 1952. — Recherches sur l'élaboration de substances de croissance par les tissus végétaux. *Rev. Gén. Bot. 59,* 19.
20. LARSEN P., 1951. — Formation, occurrence and inactivation of growth substances. *Ann. Rev. Plant Physiol. 2,* 169.
21. — , 1955. — Growth substances in higher plants. *In* « Moderne Methoden der Pflanzenanalyse », herausgegeben von K. PAECH et M. V. TRACEY, Bd III, 565-625. Springer Verlag, Berlin.
22. LERCH P., 1953. — (a). — Mesure de l'activité β des sources épaisses. *Helv. Phys. Acta, 26,* 663; (b). — Mesure de la radioactivité β. *Publ. Cent. EPUL,* 279.
23. — , 1956. — La mesure absolue de la radioactivité. *Bull. Acad. suisse Sc. méd. 12,* 385.
24. — et BERCIER P., 1960. — Compteurs de Geiger-Müller pour la mesure de très faibles radioactivités. *Bull. Soc. vaud. Sc. nat. 67,* 223.
25. — et JAEP-WITTGENSTEIN M., 1958. — Mesures semi-absolues de la radioactivité à l'aide de standards β simulés. *Bull. Soc. vaud. Sc. nat. 67,* 19.
26. — et NEUKOMM S., 1954. — Mesure de la radioactivité de substances séparées par chromatographie et par électrophorèse. *J. suisse Méd. 84,* 515.
27. LEXANDER K., 1953. — Growth regulating substances in roots of wheat. *Physiol. Plant. 6,* 406.
28. MANNING D. T. et GALSTON A. W., 1955. — On the nature of the enzymatically catalysed oxidation products of indole-acetic acid. *Plant Physiol. 30,* 225.
29. PICHAT L., AUDINOT M. et MOUNET J., 1954. — Synthèse de C^{14}-2 indole et d'acide β - (C^{14} - 2 indolyl) acétique (hétéroauxine). *Bull. Soc. Chim. France 21,* 85.
30. PILET P. E., 1957 (a). — Variations de l'activité des auxines-oxydases dans les racines du *Lens. Experientia 13,* 35.
31. — , 1957 (b). — Action of maleic hydrazine on *in vivo* Auxin destruction. *Physiol. Plant. 10,* 798.
32. — , 1957 (c). — Dosage photocolorimétrique de l'acide β-indolyl-acétique : application à l'étude des auxines-oxydases. *Rev. Gén. Bot. 64,* 106.

33. PILET P. E., 1958 (a). — Action de l'indole sur la destruction des auxines en relation avec la sénescence cellulaire. *C. R. Akad. Sc.* (Paris), *246*, 1896.

34. — , 1958 (b). — Etude chromatographique des facteurs de croissance radiculaires. *C. R. Acad. Sc.* (Paris) *246*, 2399.

35. — , 1958 (c). — Action du glutathion sur la morphologie et l'activité auxines-oxydasique de tissus cultivés *in vitro*. *Physiol. Plant. 11*, 745.

36. — , 1958 (d). — Analyse biochromatographique des auxines radiculaires. Techniques et résultats. *Rev. Gén. Bot. 65*, 605.

38. — , 1959 (a). — Une méthode de préparation de fragments de tissus ou d'organes végétaux. *Bull. Soc. vaud. Sc. nat. 67*, 133.

39. — , 1959 (b). — Activité auxines-oxydasique et expression cellulaire. *C. R. Acad. Sc.* (Paris) *248*, 1573.

40. — , 1959 (c). — Un cas d'adaptation auxines-oxydasique (racine). *Rev. Gén. Bot. 66*, 450.

41. — , 1960 (a). — Action de la lumière sur le transport d'acide β-indolyl-acétique marqué par du C^{14}. *Experientia 16*, 111.

42. — , 1960 (b). — Importance de la température dans la préparation d'extraits auxines-oxydasiques. *C. R. Acad. Sc.* (Paris) *250*, 2047.

43. — , 1960 (c). — Dégradation enzymatique de l'acide β-indolyl-acétique C^{14}. *Rev. Gén. Bot. 67*, 298.

44. — , 1960 (d). — *In vitro* destruction of auxin labelled with C^{14}. *Physiol. Plant. 13*, 766.

45. — , 1960 (e). — Gradients de croissance et problèmes auxiniques. *Bull. Soc. Bot. suisse 70*, 268.

46. — , 1961. — Les phytohormones de croissance (méthodes, chimie, biochimie et applications). Masson Ed., Paris.

47. — et COLLET G., 1959 (a). — Etude de l'allongement de sections d'épicotyles. (Comparaison de tests auxiniques). *Bull. Soc. Bot. suisse 69*, 47.

48. — et — , 1959 (b). — Acide gibbérellique et destruction auxinique *in vitro*. *C. R. Acad. Sc. 249*, 298.

49. — et GALSTON A. W., 1955. — Auxin destruction, peroxidase activity and peroxide genesis in the roots of *Lens culinaris*. *Physiol. Plant. 8*, 888.

50. — et KOBR M., 1959. — Mesures colorimétrique et manométrique de la destruction enzymatique des auxines. *C. R. Acad. Sc.* (Paris) *248*, 3023.

51. — , — et SIEGENTHALER P. A., 1960. — Proposition d'un test racine pour le dosage auxinique. *Rev. Gén. Bot.* (sous presse).

52. — et MIMAULT J., 1959. — Etude biochromatographique des composés auxiniques de l'amande du Bigarreau. *Rev. Gén. Bot. 66*, 329.

53. — et SIEGENTHALER P. A., 1959. — Gradients biochimiques radiculaires I. Auxines et réserves azotées. *Bull. Soc. Bot. suisse 69*, 58.

54. — et WENT F. W., 1956. — Control of growth of *Lens culinaris* by temperature and light. *Amer. J. Bot. 43*, 190.

55. Raalte van M. H., 1954. — On the synergism of indole and indole-3-acetic acid in root production. *Annales Bogorienses 1*, 167.
56. Ragusen D., 1955. — Formation of indole-3-aldehyde by indoleacetic oxidase. *Arch. Biochem. Biophys. 58*, 508.
57. Ray P. M., 1956. — The destruction of indoleacetic acid. II. Spectrophotometric study of the enzymatic reaction. *Arch. Biochem. Biophys. 64*, 193.
58. — , 1958. — Destruction of auxin. *Ann. Rev. Plant Physiol. 9*, 81.
59. — et Thimann K. V., 1955. — Steps in the oxidation of indoleacetic acid. *Science 122*, 187.
60. — et —, 1956. — The destruction of indoleacetic acid. I. Action of an enzyme from *Omphalia flavida*. *Arch. Biochem. Biophys. 64*, 175.
61. Salkowski E., 1885. — Ueber das Verhalten der Skatolkarbonsäure im Organismus. *Z. Physiol. Chem. 9*, 23.
62. Sen P. P. et Léopold A. C., 1954. — Paper chromatography of plant growth regulators and allied compounds. *Physiol. Plant. 7*, 98.
63. Shaw M. et Hawkins A. R., 1958. — The physiology of host-parasite relations. V. A preliminary examination of the level of free endogenous indoleacetic acid in rusted and mildewed cereal leaves and their ability to decarboxylate exogenously supplied radioactive indoleacetic acid. *Can. J. Bot. 36*, 1.
64. Siegel S. M. et Galston A. W., 1955. — Peroxide genesis in plant tissues and its relation to indoleacetic acid destruction. *Arch. Biochem. Biophys. 54*, 102.
65. Stowe B. B. et Thimann K. V., 1954. — The paper chromatography of indole compounds and some indole containing auxins of plant tissues. *Arch. Biochem. Biophys. 51*, 499.
66. Stutz R. E., 1957. — The indole 3-acetic oxidase of *Lupinus albus*. *Plant Physiol. 32*, 31.
67. — . 1958. — Enzymatic formation of indole-3-carbo-aldehyde from indole-3-acetic acid. *Plant Physiol. 33*, 207.
68. Tang Y. W. et Bonner J., 1947. — The enzymatic inactivation of indoleacetic acid I. Some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings. *Arch. Biochem. 13*, 11.
69. — et —, 1948. — The enzymatic inactivation of indoleacetic acid. II. The physiology of the enzyme. *Amer. J. Bot. 35*, 570.
70. Thimann K. V., 1954. — Studies on the growth hormone of plants. VI. The distribution of the growth substances in plant tissues. *J. gen. Physiol. 18*, 23.
71. Wagenknecht A. C. et Burris R. H., 1950. — Indoleacetic acid inactivating enzymes from roots and pea seedlings. *Arch. Biochem. 25*, 30.
72. Warburg O., 1926. — Ueber den Stoffwechsel der Tumoren. Springer Verlag, Berlin.

Manuscrit reçu le 20 juillet 1960.

Rédaction : Mlle Suzanne Meylan, professeur, Treyblanc 6, Lausanne.
Publicité : M. R. Magliocco, En Martines, Le Mont, Lausanne.
Imprimerie Baud, av. de l'Université 5, Lausanne.