Zeitschrift: Mémoires de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles

Herausgeber: Société Vaudoise des Sciences Naturelles

Band: 13 (1963)

Heft: 1

Artikel: Métabolisme azoté croissance et catabolisme auxinique des plantules du "Lens"

Autor: Siegenthaler, Paul-André

Kapitel: 1: Méthodes et techniques

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-258308

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: 12.07.2025

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

M. le Professeur P. E. Pilet veuille bien accepter l'expression de notre profonde reconnaissance.

Qu'il nous soit permis de présenter à M. le Professeur F. Cosandey notre sincère gratitude pour l'accueil chaleureux qu'il nous a réservé. Nous le remercions vivement de l'honneur qu'il nous fait en acceptant de juger notre thèse.

Nous ne saurions manquer d'évoquer toute la cordialité et l'esprit d'amicale émulation régnant dans ce Laboratoire où plusieurs de nos camarades ont travaillé ou travaillent encore sur des sujets voisins du nôtre.

Notre gratitude s'adresse enfin à tout le personnel technique de notre Laboratoire qui, par son aide et son dévouement, nous a permis de mener à bien le présent travail.

PREMIÈRE PARTIE : MÉTHODES ET TECHNIQUES

1. Le matériel

1.1. *Choix du matériel*

D'emblée, il nous a paru avantageux de travailler sur un matériel dont nous connaissions déjà certaines propriétés physiologiques et caractéristiques biochimiques (Pilet, 1951 a, 1953 a, 1961 a; Margot (1956).

De plus, les plantules du *Lens culinaris* Medikus, notre matériel biologique, présentent un certain nombre d'avantages : 1) la croissance des racines est rectiligne; 2) le pourcentage des germinations est relativement élevé; 3) la culture des plantules est aisée; 4) la croissance des racines est très sensible à l'action des substances de croissance; 5) et l'activité des auxines-oxydases est élevée.

Relevons toutefois un inconvénient majeur. En dépit des sélections (une ou deux suivant les cas), la variabilité du matériel au cours de la croissance (de la longueur des racines en particulier) s'est révélée relativement grande *(tableau I)*. On peut attribuer cette variabilité au fait qu'il est pratiquement impossible de se procurer des clones de graines du *Lens*. Au cours de nos essais, nous avons changé trois fois de fournisseur, ce qui nous a obligé à modifier, suivant les lots, le temps d'imbibition, le temps de croissance, etc.

1.2. *Technique de culture*

Nos essais ont porté essentiellement sur des racines. Toutefois, pour compléter les données relatives à la croissance et au métabolisme de ces organes, nous avons réalisé un certain nombre d'analyses sur les épicotyles et les cotylédons.

Les semences sont imbibées 4 ou 12 heures suivant les lots, dans de l'eau déionisée ou distillée, puis mises à germer en boîtes de Petri (diamètre : 17 cm) sur papier filtre, dans une étuve à 25° C, à l'obscurité. Après 24 heures environ,

on trie les graines et ne conserve que les plantules dont les racines mesurent 3 mm ± 0,5. Ces germinations sont placées dans de petites boîtes de Petri (diamètre : 10 cm), contenant 5 ml de solution. On arrange 10 graines par boîte sur un papier filtre, en prenant soin de diriger les racines vers le centre et de les baigner le mieux possible dans la solution. Lorsque les racines mesurent 18 mm, on les récolte pour en préparer les extraits.

Cette technique de base a été souvent modifiée au cours de nos essais. Nous préciserons, pour chacun d'eux, les nouvelles conditions.

TABLEAU I

Recherche des valeurs statistiques

Longueur des racines du *Lens* traitées à l'obscurité par de l'ABIA (concentrations variables) et à la lumière sans ABIA.

	Concentrations d'ABIA 1.10^{-x} M	Heures	M	N	σ	EM $= \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$
OBSCURITE	$x = \infty$	24	26,1	18	3,3	0,78
		48	37,0	18	4,1	1,3
	$x = 8$	24	24,2	13	2,7	0,75
		48	34,0	13	3,4	1,7
	$x = 6$	24	19,8	15	3,2	0,83
		48	28,3	15	6,8	2,0
	$x = 4$	24	15,2	14	2,3	0,60
		48	19,3	14	4,3	1,4
LUMIERE	$x = \infty$	24	21,2	13	2,8	0,78
		48	27,4	13	5,0	1,3

M : moyenne arithmétique (en mm) des longueurs de N lots de 30 racines chacun.

$$\sigma : \sqrt{\frac{y_i \cdot L_i^2}{N - 1}}$$

où L = erreur apparente = X_n — M
x = variants
y = fréquence du même variant.

1 σ et 1 EM représentent le 65 % des cas, 2 σ et 2 EM, le 95 % des cas.

1. 3. *Récolte du matériel*

Pour éviter les dégradations (protéines, etc.) et les effets traumatiques provoqués par la coupe des organes ou des sections, il importe d'opérer dans le minimum de temps. Nous avons pris, dans tous les cas, des précautions dont voici les principales :

Un organe ou un tissu coupé, prêt à l'analyse, est toujours entreposé pendant un temps minimum et dans des conditions physiologiques (isotonie). Pour les

essais à l'obscurité, la préparation du matériel se fait à la lumière verte, la moins active sur les systèmes enzymatiques étudiés.

Les organes entiers (racines, épicotyles et cotylédons) sont séparés les uns des autres à l'aide d'une lame de rasoir. Pour l'étude des gradients radiculaires, les sections de 3 mm sont coupées à l'aide d'une *guillotine* dont le principe a été donné ailleurs (PILET, 1959 a). Les fragments mesurent 3,05 ± 0,25 mm. La longueur des racines est mesurée à l'aide d'une réglette graduée à ± 0,5 mm près pour des racines de 18 mm et à ± 1,0 mm près pour des racines supérieures à 36 mm. Nous avons utilisé un magnétophone pour abréger le temps de mesure. Les pesées sont faites à la balance Mettler (Zurich), à la précision de 0,1 mg. La teneur en eau est obtenue, après dessiccation, par différence du poids frais et du poids sec.

1. 4. *Traitements*

Les traitements ont été effectués à l'acide β-indolylacétique (ABIA). Les concentrations et les applications ayant varié, nous préciserons par la suite les conditions propres à chacun des essais.

Un certain nombre de méthodes sont actuellement préconisées pour préparer l'ABIA en solution.

La première repose sur la propriété de l'ABIA de former des sels hydrosolubles avec NaOH, KOH et $NaHCO_3$, etc. Pour éviter la présence, dans nos milieux, d'ions étrangers qui pourraient modifier la perméabilité des membranes et certains processus métaboliques, nous avons renoncé à utiliser cette méthode.

La constante de solubilité de l'ABIA dans l'eau (obscurité, à 26° C, après 6 h.), déterminée par PILET et ATHANASIADES-MERCANTON (1959) est de 1,6 mg/ml, soit de $9{,}14.10^{-3}$M. Il est donc facile de préparer, par dilutions successives dans des ballons jaugés, les solutions aqueuses d'ABIA dont nous avons besoin (1.10^{-9} à 1.10^{-3}M), à partir d'une solution-mère concentrée (agitation électro-magnétique pendant 4 h., à l'obscurité).

Le PM de l'ABIA est de 175,18 exactement, mais dans nos recherches nous avons adopté le PM de 175,00.

Notons enfin que les milieux de culture ne sont pas tamponnés. La présence des ions phosphates, sodiques et potassiques du tampon de Mac Ilwaine (généralement utilisé dans le test R) aurait pu perturber le métabolisme des plantules dont nous voulions étudier la croissance et le métabolisme azoté sans apport extérieur. Il est évident que le pH des différentes solutions aqueuses d'ABIA peut modifier la pénétration des substances de croissance (v. PILET, 1961a, p. 419). Mais une étude comparée des effets d'un traitement auxinique à plusieurs concentrations sur la croissance de pointes de racines (test R, en milieu tamponné) et de racines entières (en milieu non tamponné) a montré que l'on pouvait négliger ce facteur.

2. ANALYSE DES COMPOSÉS AZOTÉS

2. 1. *Introduction*

Les méthodes suivies dérivent, pour la plupart, du procédé de Kjeldahl ; cette technique a subi de nombreuses améliorations (CHIBNALL, 1922-1943; VICKERY, VICKERY et coll., 1924-1946; PUCHER et coll., 1935-1949; BRUNEL, 1949, Vol. II, p. 441; MOYSE, 1950, où l'on trouvera une bibliographie détaillée) mais le principe en est toujours le même.

Les organes ou tissus végétaux (ou les fractions d'azote soluble ou protéinique) sont attaqués par de l'acide sulfurique concentré, à chaud, en présence de divers catalyseurs. L'azote des composés

minéraux et organiques est transformé en sulfate d'ammonium. Par distillation avec un excès de soude, l'ammoniaque est mise en liberté, recueillie dans un acide et titrée (v. détails plus bas).

KIRK (1950) propose une autre méthode. Les fractions d'azote soluble ou protéinique (obtenues par précipitation à l'acide trichloracétique 0,5 M) sont minéralisées dans des tubes de Folin-Wu par H_2SO_4 conc. et quelques gouttes de H_2O_2, en présence d'un catalyseur (acétate de Hg et de SeO_2). Avec le réactif de Nessler, la solution prend une coloration que l'on apprécie à l'aide d'un photocolorimètre. Une courbe standard permet de calculer la quantité d'azote.

Cette dernière technique a été adoptée, entre autres, par GALSTON et DALBERG (1954), PILET et GALSTON (1955), puis par PILET (1957 e). En utilisant le même matériel, nous avons comparé ailleurs (PILET et SIEGENTHALER, 1959) les résultats obtenus pour chacune de ces méthodes. La technique de Kjeldahl-Brunel que nous avons adoptée semble plus sensible, bien que pour les fragments de la zone basale les différences observées ne soient pas significatives.

2. 2. *Dessiccation des organes*

Le matériel récolté (racines, épicotyles ou cotylédons) est débarrassé de l'eau de lavage au moyen de papiers filtres (Schleicher et Schuell, N° 595), pesé à l'état frais, puis desséché.

Une étude antérieure (PILET et SIEGENTHALER, 1959) nous a fait adopter la méthode suivante : les flacons à peser contenant le matériel frais sont placés dans un dessiccateur, sous vide et en présence de $CaCl_2$ (v. BRUNEL, Vol. I, p. 54-56). Au bout de 4 à 7 jours, suivant le matériel, on obtient le poids constant.

Plus récemment, nous avons remplacé la dessiccation sous vide par un séchage plus rapide dans une étuve, dont la température est réglée à 70° C pendant une heure, puis maintenue entre 50° et 60° C jusqu'à poids constant. Cette méthode présente l'avantage de coaguler et stabiliser plus vite les protéines. De même à 70° C, les enzymes sont inactivées. Au bout de 24 h. en général, le poids constant est atteint.

Bien que nous n'ayons pas remarqué, dans les résultats, de différences significatives entre ces deux méthodes de dessiccation, nous savons toutefois (MOYSE, 1950, p. 16) que quelques amino-acides (la glutamine surtout) sont des composés très instables. D'autre part, cette dernière méthode conduit à une certaine perte de glucides endogènes (BRUNEL, 1949, Vol. I, p. 343). Il est donc probable que nos résultats soient entachés d'un certain nombre d'erreurs ; mais notre propos n'étant pas de faire une analyse détaillée des différents composés azotés (des amides par exemple), nous n'avons pas jugé utile d'étudier systématiquement l'influence du séchage sur la concentration des différents composés azotés. D'une façon générale, ces méthodes provoquent le départ de 90 à 95 % d'eau.

2. 3. *Précipitation des protéines*

Pour faciliter l'extraction, le matériel séché est réduit, dans un mortier, en une fine poudre. Après adjonction d'eau distillée, on transvase le mélange quantitativement dans de petits béchers que l'on place 30 mn dans un BM maintenu à une température de 60° C (cette méthode peut toutefois provoquer la dégradation de substances thermolabiles comme la glutamine). On refroidit le mélange auquel on ajoute une solution aqueuse d'acide trichloracétique (ATAc) à 10 % et on laisse reposer pendant 12 h.

L'ATAc permet une très bonne extraction des composés azotés solubles (acides aminés et peptides). Le résidu insoluble comprend essentiellement les protéines (qui sont complètement dénaturées et rendues insolubles), les acides nucléiques, les produits membranaires, etc.

Toutefois, une faible quantité de protéines, d'ailleurs assez difficile à estimer, peut s'hydrolyser en milieu acide (BERTHELOT et ANDRÉ, 1886, cités par MOYSE, 1950). Ce déféquant est plus actif que l'alcool ajouté postérieurement à l'extraction aqueuse par exemple, ainsi que le montre VICKERY (1924, cité par MOYSE, 1950).

La précipitation, par l'ATAc, des protéines de broyats de cotylédons (contenant des matières gélifiables et de l'amidon en abondance) s'est révélée assez difficile. Souvent, nous avons dû filtrer plusieurs fois pour obtenir un filtrat suffisamment limpide. La précipitation par de l'alcool à 50°, préconisée par OSBORNE et coll. (1922) et DENNY (1929, v. MOYSE, 1950) ne s'est pas montrée plus efficace. Après 12 h, la solution se décante et le liquide est filtré sur papiers filtres avec une légère aspiration dans des fioles à filtrer. Le résidu est lavé trois fois avec une solution d'ATAc à 2,5 %.

2. 4. *Minéralisation*

Le résidu insoluble (filtre y compris) et le filtrat sont traités, dans des matras de Kjeldahl, par de l'acide sulfurique concentré (en général, 4 ml pour 30 racines et épicotyles et 10 ml pour 18 cotylédons), en présence d'un catalyseur au sélénium (5 p. de SO_4Cu cristallisé + 5 p. de SO_4K_2 cristallisé + 1 p. de Se). Le chauffage sur une rampe à gaz, est poursuivi 6 heures après la décoloration (CHIBNALL, REES et WILLIAMS, 1943). Cette méthode ne tient pas compte des ions nitriques contenus dans le filtrat. Ne procédant pas à une étude séparée des différents composés azotés, nous n'avons pas jugé utile d'assurer leur réduction par l'acide phényl-sulfurique en présence de poudre de zinc.

2. 5. *Dosage de l'azote protéinique et soluble*

La distillation de la liqueur contenue dans les matras est faite dans l'appareil de Parnas et Wagner. L'ammoniaque est mise en liberté par un excès de NaOH (30 à 40 %), entraînée par la vapeur d'eau et recueillie dans de l'acide borique à 2 %, contenant déjà l'indicateur de Taschiro. *(Préparation :* 10 mg de bleu de méthylène dissous dans 10 ml d'alcool à 95 ° ; 20 mg de rouge de méthyle dissous dans 10 ml d'alcool à 95° ; mélanger les deux solutions et conserver à l'obscurité). On procède alors à la titration directe de l'ammoniaque par une solution d'HCl n/50 dont on connaît le facteur exact.

La détermination de l'azote total se fait selon le même principe, mais sans précipitation par l'acide trichloracétique ; après séchage, le matériel est introduit directement dans les matras de Kjeldahl.

2. 6. *Expression des résultats*

L'azote insoluble, contenu dans le résidu, provient de polypeptides insolubles et de protéines essentiellement, mais aussi des acides nucléiques et des substances membranaires : nous l'appellerons *l'azote protéinique,* NP (ou protéique). L'azote contenu dans le filtrat provient des combinaisons inorganiques (composés ammoniacaux, etc.) et organiques (amino-acides, amides, peptides, etc.). La quantité des composés inorganiques, dans les organes d'une plantule non traitée, est faible en regard de la concentration des combinaisons organiques. C'est pourquoi, cet *azote soluble,* NS, représente les protides solubles essentiellement. L'*azote total,* NT, est la somme de l'azote protéinique et de l'azote soluble.

Ces différentes formes d'azote sont exprimées en γ par rapport à un nombre fixe d'organes, par rapport à l'unité de poids frais, de poids sec, de teneur en eau et s'il y a lieu de longueur. Nous discuterons plus loin la valeur de chacun de ces critères de référence (v. p. 8). La quantité d'N exprimée en γ par unité de poids frais (10 mg) est donnée par la formule suivante :

$$\gamma \text{ N/10 mg PF} = \frac{(N)}{50\,000} \cdot 10^6 \cdot (a\text{-}b) \cdot f_{HCl} \cdot \frac{10}{PF}$$

où (N) = poids atomique de l'N (= 14,008 g.)
a = ml HCl n/50 employé pour doser l'ammoniaque
b = ml HCl n/50 utilisé dans l'essai à blanc (filtre seul)
f = facteur de HCl n/50
PF = poids frais en mg.

La teneur en protéines correspondant en poids à l'azote protéinique trouvé est obtenue en multipliant NP par le coefficient 6,25 (CHIBNALL, 1939). Il nous

a paru inutile d'effectuer ce calcul pour chacun de nos résultats. Il suffit de faire remarquer que les courbes ainsi obtenues sont tout simplement parallèles à celles que nous discuterons.

2. 7. *Valeurs des résultats*

Des essais préliminaires à partir de sels azotés (sulfate d'ammonium, phénacétine, etc.) nous ont donné, après distillation, des valeurs d'N très satisfaisantes (erreurs ± 0,5 %). Mais il va sans dire qu'en tenant compte des erreurs dues à la précipitation par l'ATAc et surtout aux variations individuelles (v. PILET et SIEGENTHALER, 1959), nous obtenons des résultats variant à ± 7 % (MOYSE, 1950, admet 5 %).

3. ANALYSE DE L'ACTIVITÉ DES SYSTÈMES AUXINES-OXYDASIQUES

3. 1. *Les techniques*

Quelques techniques permettant la détermination de l'activité des systèmes auxines-odasiques sont proposées dans la littérature (v. PILET, 1961 a, p. 302 à 319). Rappelons-en les principales :

Analyse directe de l'ABIA détruit : 1) technique colorimétrique; 2) technique spectrophotocolorimétrique ; 3) technique biochromatographique; 4) technique radiochromatographique ;

Analyse indirecte de l'ABIA détruit : 1) technique manométrique.

Toutes ces techniques présentent à la fois des avantages et des inconvénients et permettent de fournir des renseignements particuliers. A la suite de l'étude critique de PILET (1961 a, p. 316 à 319), et dans l'impossibilité d'appliquer parallèlement toutes ces méthodes, nous avons adopté la technique colorimétrique, la plus rapide, qui suffit largement à notre étude.

3. 2. *La technique colorimétrique*

Cette technique (PILET, 1957 c) a fait récemment l'objet d'une mise au point et d'un examen critique (PILET et COLLET, 1962). Notre méthode est empruntée à ces études ; rappelons-en les principales étapes :

1. Le matériel frais (racines) est pesé, puis broyé dans un mortier conservé jusqu'à l'emploi dans un congélateur (— 23° C). Au besoin, on ajoute du SiO_2 pour faciliter la formation d'une pâte homogène et l'on ajoute, le plus tard possible, quelques ml d'une solution tampon phosphate (pH 6,1). L'extrait est alors centrifugé (ultracentrifugeuse à congélation, à — 4° C ± 2) une première fois à 5000 tours/mn pendant 20 mn. La solution surnageante est décantée dans un ballon jaugé de 20 ml. On rince consciencieusement le mortier avec la solution tampon. Les eaux de lavage et le culot (homogénéisé dans la solution par agitation) sont soumis à une deuxième centrifugation à 10 000 tours/mn pendant 10 mn. La solution surnageante est alors versée dans le ballon qui est complété jusqu'au trait de jauge. L'extrait peut être conservé au maximum 24 h au frigo.

2. On prépare une batterie de tubes à essais (deux par extrait) contenant : 4 ml H_2O + 4 ml extrait. Au temps 0 de l'incubation, on ajoute 2 ml d'ABIA (50 γ/ml) dans la série des premiers tubes (I), tandis que la série des deuxièmes tubes (I') est incubée sans ABIA. On agite, et les tubes sont incubés dans une étuve, munie d'un dispositif d'agitation, à 25° C, pendant 1 et 2 heures.

3. A la fin de l'incubation, 2 ml du mélange I sont pipetés dans les tubes colorimétriques de Klett contenant 8 ml de réactif de Salkowski modifié (PILET, 1957 c.) La composition de ce réactif est la suivante :

3 ml $FeCl_3 . 6H_2O$ (pro anal., PM 270,32) 1,5 M. (eau distillée)
60 ml H_2SO_4 (1,84 ; PM 98,08 ; 85-97 %)
100 ml H_2O distillée.

On mélange quatre fois le contenu des tubes, dans un ordre et un temps déterminés. Simultanément, on ajoute 2 ml d'ABIA (50 γ/ml) aux extraits I' que l'on mélange énergiquement ; on prélève tout de suite 2 ml que l'on verse dans un tube de Klett contenant 8 ml de réactif et l'on mélange quatre fois.

4. On détermine, au cours du temps, la variation du coefficient d'extinction, pour chacune de ces solutions, à l'aide du colorimètre Klett-Summerson (filtre vert, N° 54, 535 ± 25 mμ) dont on cherche préalablement (et avant chaque série de mesures) le zéro (tube contenant 8 ml de réactif et 2 ml de tampon phosphate). On établit généralement les calculs à partir des indices colorimétriques trouvés au bout de 1200 secondes de réaction.

5. La formule suivante (Collet, thèse, 1962) permet de calculer l'activité auxines-oxydasique (ABIA OX) exprimée en γ d'ABIA détruit pendant 60 ou 120 mn par rapport à 100 mg de poids frais (PF).

$$\text{ABIA OX} = \frac{I'_c - I_c}{I'_c} .500. \frac{100}{PF}$$

où I'_c = Indice colorimétrique, au bout de 1200 sec., de l'extrait incubé sans ABIA

I_c = Indice colorimétrique, après 1200 sec., de l'extrait incubé avec ABIA.

3. 3. *Valeur des résultats*

Le choix du réactif (qualité, quantité, sensibilité, spécificité) et certaines conditions expérimentales (température, pH du tampon) ont été mis au point ailleurs (Pilet, 1957 c). De même, l'importance de l'opacité de l'extrait qui augmente avec la concentration du substrat, l'établissement et l'approximation de la courbe standard et les erreurs de manipulation ont fait l'objet d'une étude critique particulière (Pilet et Collet, 1962). Toutefois, relevons ici l'approximation des résultats : erreurs de manipulation, 0,5 à 1,5 % ; l'erreur de la préparation de l'extrait est difficile à estimer ; d'autres composés indoliques (résultant en particulier de la dégradation de l'ABIA) donnent une coloration positive avec le réactif de Salkowski. Les variations, sur l'indice colorimétrique, sont de l'ordre de 3 %.

4. Autres méthodes d'analyse

A maintes reprises, nous établirons des comparaisons entre la teneur en composés azotés et d'autres composés biochimiques analysés sur le même matériel.

Nous nous bornerons à citer ici les références des travaux où sont décrites et discutées en détail ces techniques :
teneurs en auxines endogènes par le test *Avena* (Pilet, 1951 a), par biochromatographie et le test R (Pilet, 1958 d), enfin par le test T (Pilet et Collet, 1959) ; *teneur* en *amidon* (Pilet et Margot, 1953) ; *polarité bioélectrique* (Pilet et Meylan, 1953) ; *teneur en glucides* (Pilet et Meylan, 1953) ; *activité des peroxydases* et *genèse des peroxydes* (Pilet et Galston, 1955) ; *teneur en groupes —SH* (Pilet, 1957 e) et *mesures respirométriques* (Pilet et Kobr, 1959 et Kobr, thèse, 1962).

5. Les critères de référence

5. 1. *Le problème*

Lorsqu'on exprime la concentration d'un composé contenu dans un tissu ou un organe, on la rapporte à une unité déterminée (nombre

d'organes, poids frais, poids sec, teneur en eau, nombre de cellules, azote protéinique, etc.). On se trouve alors en présence de trois difficultés :

1) Le critère de référence choisi est toujours discutable ;
2) Suivant le critère de référence, les courbes obtenues peuvent être très différentes. Les valeurs trouvées dépendent essentiellement du mode d'expression adopté ;
3) Si l'on désire comparer les composés chimiques (auxines, glucides, protéines...) d'un tissu témoin et traité (par de l'ABIA par exemple), le facteur de référence adopté subit, lui aussi, des modifications dues au traitement auxinique ou à la croissance.

A maintes reprises, nous avons insisté sur l'importance qu'il faut attacher aux modes d'expression des résultats (Pilet et Siegenthaler, 1959 et 1961). Nous consacrons ce chapitre à l'étude critique des critères de référence généralement utilisés, en illustrant chacun des cas par des exemples pris dans nos expériences.

5. 2. *Définitions*

Un tissu ou un organe est caractérisé par un certain nombre de grandeurs que l'on peut classer « grosso modo » de la façon suivante:

1. *Les données expérimentales immédiates,* directement mesurables; les *données macrophysiologiques* (poids frais ou sec, teneur en eau, nombre de fragments ou d'organes, longueur, volume, etc.); les *données cytologiques* (nombre de cellules, etc.).

2. *Les données expérimentales* plus difficiles à déterminer ou *données microphysiologiques* qui requièrent une analyse plus complexe :

a) *Les données biochimiques* (teneur en azote total, protéinique et soluble, en glucides, en lipides, en auxines, échanges respiratoires, etc.) ;
b) *Les données biophysiques* (polarité électrique, conductivité, extension des membranes, etc.) ;
c) *Les données enzymatiques* (activité auxines-oxydasique, protéolytique, etc.).

Les données fournies directement par l'expérience sont des *valeurs absolues.* Chacune de ces valeurs peut être utilisée comme *unité* ou *critère* de référence. Une valeur absolue quelconque exprimée en fonction d'une unité de référence devient une *valeur relative.*

Les données expérimentales immédiates sont les critères de référence les plus souvent utilisés. En effet, on cherche généralement à exprimer une donnée biochimique, qui constitue une des nombreuses composantes d'un tissu, en fonction d'une valeur plus générale. Nous exprimerons ainsi l'azote protéinique (la partie) par rapport au poids sec (le tout).

5. 3. *Quelques critères de référence.*

L'unité d'individu (d'organe, de section, de fragment). C'est un critère de référence souvent utilisé qui permet de suivre (au cours de la croissance par exemple) les variations d'un facteur endogène, à l'exclusion de toute autre modification que peut entraîner la croissance ou un traitement (auxinique par exemple). Mais ce critère de référence ne tient par compte des variations réciproques des autres facteurs endogènes. D'autre part, si l'on veut comparer entre elles des données microphysiologiques d'organes dont les longueurs sont différentes, ce mode d'expression est nettement incomplet et il est indispensable d'utiliser d'autres unités. (Exemples, v. *tableau V*).

L'unité de poids (frais, sec ou teneur en eau). Un premier point nous paraît essentiel. Les différents composés chimiques endogènes étudiés (au cours de la croissance par exemple) (*v. tableau XVI*) sont rapportés au poids frais ou sec des tissus au moment de la récolte du matériel et non pas, comme le préconisent certains auteurs (CHRISTIANSEN et THIMANN, 1950; THIMANN et LOOS, 1957) au poids initial de l'individu. Un individu subit, au cours du temps, des variations de poids dont il faut tenir compte. Ce critère de référence est sans doute l'un des plus valables par le fait qu'il tient compte de l'ensemble des autres variations de l'individu.

Discutons, à titre d'exemple, un cas précis (*v. fig. 9* et *tableau XVII*). Au fur et à mesure que la racine s'allonge, on assiste à une accumulation des protéines. Il y a donc protéosynthèse au cours de la croissance. Mais cette première conclusion ne s'avère pas suffisante et ne met en évidence qu'un seul aspect du phénomène réel. En effet, au cours du temps, la teneur en protéines par rapport au poids sec diminue. En d'autres termes, la teneur en protéines décroît par rapport à l'ensemble des autres composés, soit par diminution de l'activité protéosynthétique, soit par intensification de la protéolyse, soit aussi par augmentation relative de la concentration en substances ternaires (non azotées). Il pourrait y avoir simultanément : protéogenèse et protéolyse (?). D'autres données sont évidemment nécessaires pour le prouver définitivement. Mais cet exemple nous montre que l'emploi de plusieurs critères de référence, loin d'apporter des contradictions entre les résultats obtenus, les explicite et peut suggérer des hypothèses de travail fructueuses.

L'unité de cellule. On considère généralement la cellule comme l'unité fondamentale d'un tissu. Aussi, la méthode qui consiste à rapporter une donnée expérimentale à l'échelle cellulaire apporte un élément nouveau, qui tient compte par exemple de la prolifération (mérésis) et de l'élongation (auxésis) cellulaires. Mais il faut se gar-

der d'interpréter trop hâtivement et de généraliser les résultats ainsi obtenus. En effet, on compare souvent des cellules dont la fonction physiologique, la taille, le volume cytoplasmique et vacuolaire sont très différents. D'autre part, la fonction physiologique d'une cellule est loin d'être autonome; elle dépend, dans une large mesure, de la présence des cellules voisines.

Prenons, à titre d'exemple, un cas précis relatif aux gradients radiculaires (*v. tableau V*). Le nombre de cellules (par section unité; PILET, 1959 b) est environ six fois plus élevé dans la zone de division que dans la zone d'élongation. Ce rapport explique pourquoi la plupart des composés biochimiques (en particulier les protéines) exprimés en fonction du nombre des cellules, sont moins concentrés dans la zone de division que dans la zone d'élongation. Il est certes intéressant de savoir que les cellules de grande taille et de grand volume contiennent davantage de protéines mais il ne suffit pas de connaître ce seul renseignement. En fait, les variations des protéines par rapport aux autres substances fondamentales de la cellule sont plus riches en enseignements (NP/PS) et complètent les données précédentes. On trouve alors que la zone méristématique est la plus riche en protéines.

Il n'est donc pas surprenant, suivant le critère de référence, d'obtenir des résultats apparemment divergents. Plusieurs valeurs relatives sont autant de résultats complémentaires qui permettent de cerner plus facilement les problèmes que pose l'étude d'un phénomène déterminé.

L'unité d'azote protéinique (*d'azote total ou soluble*). On a parfois adopté ce critère de référence parce que les protéines représentent une partie fondamentale et plus ou moins constante du cytoplasme et le substrat indispensable à toute vie. Mais, nous avons montré (v. p. 20) que le long d'un axe radiculaire, par exemple, la teneur en azote total et protéinique, loin d'être uniforme, variait considérablement suivant la zone étudiée (v. *tableau V*). C'est pourquoi tout en reconnaissant la valeur de ce critère de référence, nous pensons qu'il est utile de comparer les résultats à d'autres valeurs relatives.

L'unité de longueur et de surface. Ce nouveau mode d'expression ne peut être utilisé que dans la mesure où l'organe ou le fragment étudié est homogène. Il est évident qu'un millimètre au niveau de la zone de division d'une racine est loin d'être l'équivalent de celui de la zone de différenciation. Le diamètre, la section sont différents. Néanmoins, à défaut de pouvoir rapporter certaines données aux volumes cellulaires, ces critères de référence nous permettent de parler, dans une certaine mesure, de concentration ou de densité

par unité de longueur ou de surface, et nous renseignent indirectement sur l'épaisseur ou le volume du fragment (exemple, *v. tableau X*). Il est évident que *l'unité de volume*, qui se rapproche de l'unité de poids, est meilleure.

Autres unités de référence. D'une façon générale, toutes les combinaisons entre les différentes données expérimentales sont possibles. Ainsi, par exemple, l'étude de la teneur en ABIA endogène, en relation avec les phénomènes d'absorption d'eau, nous autorise à utiliser le rapport ABIA/T.eau ou T.eau/ABIA. On pourrait citer de nombreux exemples semblables.

En conclusion, chaque critère de référence n'envisage qu'un seul aspect du problème. C'est pourquoi, il nous paraît indispensable de représenter une même série de données en fonction de plusieurs critères de référence. L'analyse approfondie des valeurs relatives ainsi obtenues nous paraît la seule façon de se faire une idée exacte des processus étudiés.

5.4. *Expression des résultats*

Dans de nombreux cas, il est possible de présenter les résultats obtenus en %. Nous rappellerons brièvement les principales formules utilisées dans ce travail.

Supposons que nous ayons deux séries de données relatives correspondant à deux lots différents : un lot témoin (TE) et un lot traité (TR), *(tableau II)* :

TABLEAU II

Au temps 0		*Au temps t*	
lot 1	$Q_{(0)TE}$	lot 1	$Q_{(t)TE}$
lot 2	$Q_{(0)TR}$	lot 2	$Q_{(t)TR}$

Variations relatives en % :

p pour le témoin ; p' pour le traité.

$$p\ \% = \frac{Q_{(t)TE} - Q_{(0)TE}}{Q_{(0)TE}} \cdot 100 \qquad p'\ \% = \frac{Q_{(t)TR} - Q_{(0)TR}}{Q_{(0)TR}} \cdot 100$$

On voit que si

$p = 0$	$Q_{(t)} = Q_{(0)}$	(effet nul)
$p > 0$	$Q_{(t)} > Q_{(0)}$	(stimulation)
$p < 0$	$Q_{(t)} < Q_{(0)}$	(inhibition)

Les valeurs de p % et p' % dépendent de $Q_{(0)TE}$ et $Q_{(0)TR}$.
Il serait donc faux de comparer p et p' si $Q_{(0)TE} \neq Q_{(0)TR}$.

Dans certains cas, les valeurs initiales du témoin et du traité peuvent être identiques. Dans le cas contraire, il faut faire intervenir une nouvelle expression où cet inconvénient disparaît.

TABLEAU III

$$\Delta Q^{TE} = Q_{(t)TE} - Q_{(0)TE} \quad \text{et} \quad \Delta Q_{TR} = Q_{(t)TR} - Q_{(0)TR}$$

Au cours de nos essais, nous avons rencontré deux genres de cas:

Cas I (exemple : v. fig. *11*) $\Delta Q_{TE} > 0$

Expression (en %) de la variation de la grandeur Q du traité par rapport à celle du témoin :

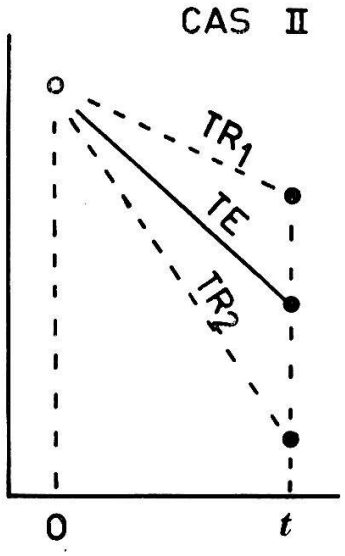
$$p'' = \frac{\Delta Q_{TR} - \Delta Q_{TE}}{\Delta Q_{TE}} \cdot 100$$

On voit que si

$p'' = 0 \quad \Delta Q_{TR} = \Delta Q_{TE}$ (effet nul)
$p'' > 0 \quad \Delta Q_{TR} > \Delta Q_{TE}$ (stimulation)
$p'' < 0 \quad \Delta Q_{TR} < \Delta Q_{TE}$ (inhibition)

Cas II $\Delta Q_{TE} < 0$

On voit que : p'' % < 0 pour TR_1
p'' % > 0 pour TR_2



Cherchons les variations absolues du témoin et du traité *(tableau III)* :

Nous avons utilisé un autre mode d'expression tenant compte de l'inhibition de la longueur. Prenons un exemple et supposons que l'inhibition (p ' %) de la longueur des racines traitées (TR) soit de *a* % et qu'une grandeur quelconque (poids frais ou sec, protéines, auxines, etc.) caractérisant ces organes soit égale à Q. Nous cherchons quelle serait la valeur de Q s'il n'y avait pas eu d'inhibition. La variation de TR représente le 100-a/100 de celle des racines témoins. S'il n'y avait pas eu d'inhibition, la valeur Q des racines traitées serait égale à :

$$\frac{100.Q}{100\text{-}a} = Q' \quad \text{pour le lot témoin : } a = 0 \text{ d'où } Q = Q'.$$

Nous avons rapporté un exemple dans le *tableau IV*.

Un autre mode d'expression consiste à comparer — lors d'un traitement ou au cours de la croissance — les résultats obtenus à une valeur témoin fixée arbitrairement à 100. L'analyse des variations enregistrées est plus facile à lire comme le montre l'exemple reporté dans le *tableau XVII*.

5. 5. *Quelques abréviations*

Pour alléger notre texte, nous avons utilisé un certain nombre d'abréviations, dont voici les principales :

ABIA :	acide β-indolylacétique	PF :	poids frais
ABIA OX :	activité des auxines-oxydases	PS :	poids sec
2,4-D :	acide 2,4-dichlorophénoxyacétique	QR :	quotient respiratoire
IR :	intensité respiratoire	SH :	fonction thiol
L :	longueur	Te :	teneur en eau
NP :	azote protéinique	TE :	témoin
NS :	azote soluble	TR :	traité
NT :	azote total		

TABLEAU IV

Etude comparative de deux modes d'expression

Valeurs de la teneur en eau et du poids sec de racines du *Lens* en fonction de la durée et de la concentration de traitements par de l'ABIA.

Heures	Données		Concentrations d'ABIA 1.10^{-x} M			
			$x = \infty$	$x = 8$	$x = 6$	$x = 4$
24	Te	mg/30 R	752,8	748,6	671,0	484,7
		Q'	752,8	824,4	981,0	2011,2
	PS	mg/30 R	72,5	68,7	65,3	52,3
		Q'	72,5	75,7	95,5	217,0
48	Te	mg/30 R	1049,9	—	865,7	616,3
		Q'	1049,9	—	1627,2	2379,5
	PS	mg/30 R	99,8	—	83,5	65,8
		Q'	99,8	—	157,0	254,0

DEUXIÈME PARTIE : GRADIENTS DES RACINES DU *LENS*

Problème général

L'analyse de la variation des propriétés morphologiques, physiologiques et biochimiques, tout au long de l'axe d'un organe déterminé, permet d'établir des gradients qui peuvent fournir des renseignements relatifs au métabolisme des divers tissus dont on étudie la croissance.

Un gradient biochimique donné présente un intérêt non seulement parce qu'il nous renseigne sur la répartition d'un composé endogène dans un organe mais aussi parce qu'il peut être comparé à d'autres gradients. Dans la comparaison de gradients d'organes de longueurs différentes, PILET a introduit, en les opposant, les notions de *gradients statiques* et de *gradients dynamiques*. Dans le cas d'organes de même longueur, nous parlerons de *gradients statiques* (PILET, 1960 f). Il est plus difficile de comparer des gradients sur des organes d'inégales longueurs. PILET (1961 c) a montré que « tout au long de l'axe d'une racine en voie d'élongation, le gradient de croissance est loin d'être uniforme; de plus, il se modifie au cours du temps ». Ainsi l'étude d'un gradient sur des racines de longueurs différentes « oblige, si l'on veut rester dans les zones physiologiquement équiva-