



HAL
open science

Recherches sur les transformations de l'eau dans les feuilles avec l'eau tritiée. I - Introduction : étude bibliographique des problèmes posés par l'utilisation de l'eau marquée en physiologie végétale

C. Costes, F. Ferron, J. van Assche, M.E. Deroche

► To cite this version:

C. Costes, F. Ferron, J. van Assche, M.E. Deroche. Recherches sur les transformations de l'eau dans les feuilles avec l'eau tritiée. I - Introduction : étude bibliographique des problèmes posés par l'utilisation de l'eau marquée en physiologie végétale. *Annales de Physiologie Végétale*, 1964, 6 (4), pp.303-315.
hal-02732218

HAL Id: hal-02732218

<https://hal.inrae.fr/hal-02732218>

Submitted on 2 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

RECHERCHES SUR LES TRANSFORMATIONS DE L'EAU DANS LES FEUILLES AVEC L'EAU TRITIÉE

I. — INTRODUCTION : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE DES PROBLÈMES POSÉS PAR
L'UTILISATION DE L'EAU MARQUÉE EN PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE

C. COSTES, Françoise FERRON, J. Van ASSCHE et Marie-Esther DEROCHE

*Station centrale de Physiologie végétale,
Centre national de Recherches agronomiques, Versailles (Seine-et-Oise)*

SOMMAIRE

L'utilisation de l'eau tritiée dans des recherches de physiologie pose des problèmes dus aux effets isotopiques (effet de masse, échange isotopique) et aux conditions de mesure de sa radioactivité par scintillation liquide (faible énergie des rayons β^- émis, phénomènes d'extinction). Dans un premier article, l'ensemble de ces problèmes est passé en revue, d'après les données de la bibliographie.

A. — INTRODUCTION

L'objet de la présente étude est d'introduire un travail expérimental qui consiste à comparer les mécanismes de l'utilisation de l'eau chez des plantes adaptées à la sécheresse et chez des plantes plus exigeantes en eau. Nous savons que chez les végétaux supérieurs la consommation de l'eau se fait de la manière suivante : une petite fraction de l'eau absorbée est fixée sous forme de matière organique, alors que la transpiration en transforme la plus grande partie de l'état liquide à l'état de vapeur. Nous nous proposons donc de mesurer et de comparer la fraction de l'eau absorbée :

qui est transformée en matière organique,
qui est transpirée,

dans des conditions microclimatiques contrôlées, par deux variétés de Blé ayant des résistances différentes à la sécheresse (*Triticum vulgare*, variété *Florence-Aurore* et *Triticum durum*, variété *Guelma*).

Pour tenter de résoudre techniquement ce problème nous avons choisi de fournir aux plantes étudiées de l'eau marquée par un isotope de l'hydrogène : le tritium. En effet, seuls les atomes d'hydrogène des molécules d'eau métabolisée sont intégralement introduits dans la matière organique. En revanche, seulement une partie de l'oxygène de l'eau est fixée dans la matière organique (réactions

d'hydratation), l'autre partie étant dégagée à l'état gazeux. En raison de notre objectif, ce fait exclut l'utilisation de l'oxygène-18 pour marquer l'eau dans nos expériences.

La fixation de l'hydrogène de H_2O se fait par des réactions d'hydrolyse, d'hydratation, d'isomérisation et principalement pendant la photosynthèse, par une réaction de réduction. Car, si longtemps la photosynthèse a été définie comme l'aptitude des plantes vertes à fixer le CO_2 de l'air à la lumière, depuis les travaux fondamentaux d'ARNON (1959) elle prend une définition unitaire et toute nouvelle : elle consiste en la formation simultanée à la lumière d'un réducteur et d'une source d'énergie chimique (ATP). Or le photoréducteur emprunte finalement son hydrogène à l'eau pour l'introduire dans de nouvelles combinaisons chimiques.

Par ailleurs, rappelons que la transpiration met également en jeu un mécanisme consommateur d'énergie, qui se traduit par la vaporisation de l'eau. Ainsi, *ces deux phénomènes, photosynthèse et transpiration consacrent l'utilisation de l'énergie lumineuse à la transformation de l'eau* (COSTES, 1960). Nous pouvons donc penser que l'utilisation de molécules d'eau marquée par un isotope de l'hydrogène nous permette d'obtenir une mesure simultanée de l'activité photosynthétique et de la transpiration, à la lumière.

Dans ce genre d'études, on peut imaginer l'emploi de deux traceurs, soit un isotope lourd de l'hydrogène, le deutérium (D ou 2H), soit l'isotope radioactif de l'hydrogène, le tritium (T ou 3H). Parmi ces isotopes, nous avons choisi le tritium car sa détection paraît plus aisée que celle du deutérium. Il est possible, en effet, de suivre la répartition du tritium dans le matériel expérimenté par mesure de la radioactivité émise. Si l'on incorpore de l'eau tritiée à la solution nutritive d'une plante et si l'on fait la somme des radioactivités retrouvées dans l'eau tissulaire, dans la matière organique et dans l'eau transpirée, on obtient une image des différentes voies de la consommation de l'eau par la plante. Il sera donc possible d'appliquer cette méthode à l'étude des transformations de l'eau dans une plante si l'on peut mesurer avec le même rendement la radioactivité du tritium dans les différentes fractions extraites.

Cependant si l'usage du tritium, traceur de l'hydrogène de l'eau, peut être envisagé comme un moyen rapide d'étude, il n'en reste pas moins que l'expérimentateur se heurte à certaines difficultés dues aux effets suivants :

— l'effet de masse, c'est-à-dire l'effet dû au remplacement d'un atome d'hydrogène de masse 1 par un atome d'hydrogène de masse 3. Cet effet a une répercussion sur la vitesse des réactions des substances marquées au tritium. Il en résulte que le tritium n'est pas un traceur analogue à ceux qui ont été utilisés jusqu'à présent en biochimie et dont l'effet de masse est habituellement tenu pour négligeable (^{14}C , ^{35}S).

— l'échange isotopique, c'est-à-dire l'échange entre l'hydrogène des molécules stables et le tritium de 3H_2O (1), ou entre les molécules d'eau stables et les molécules d'eau radioactives. Ce dernier type d'échange peut se produire soit entre les molécules occupant des sites différents dans les cellules, soit entre les molécules de l'eau tissulaire et les molécules de la vapeur d'eau atmosphérique.

L'effet de masse est susceptible d'avoir une répercussion sur la physiologie de la plante. En outre, l'échange isotopique peut, *a priori*, être une cause d'erreur dans les mesures de la radioactivité détectée après incorporation de l'eau tritiée. Cela peut conduire à des interprétations fausses sur le métabolisme de l'hydrogène de l'eau.

Par ailleurs, la détection de la radioactivité due au tritium semble, à première vue, assez délicate par suite des propriétés de ce radio-isotope. Le tritium, de période égale à 12 ans, émet par désintégration un rayonnement β^- de faible énergie (0,018 MeV). Ce rayonnement est facilement autoabsorbé et son intensité ne peut être mesurée que par un compteur à circulation de gaz, ou mieux, par scintillation liquide. Mais, comme nous le verrons, le rendement des comptages est relativement faible pour des échantillons tritiés. De plus, dans la technique par scintillation liquide, le volume des prises d'essai des métabolites dissous dans des solvants appropriés est limité par la miscibilité de ces solvants avec ceux des scintillateurs. Enfin nous verrons que certains corps sont capables d'éteindre

(1) Nous utilisons cette formule pour simplifier l'expression. En réalité le mélange d'eau et d'eau tritiée est mieux représenté par $^3HO^2H$.

la luminescence par défaut qu'il

C'est pour la mise au point de l'eau pe

Avant d'objectif, nous ration d'eau m

B. —

Les effets actifs) ont été intramoléculai

L'effet de engagés les co normal. BIGE intermoléculai deutérium, ou (1963) constai métabolisme i topique peut vivantes, si le

Le phéno (1956) l'hydr $\equiv C-H$. D'aj et une tempé confirmation rapide, alors lui-même qui hydroxylées. un échange produisant e constituant l isotopique d biologiques, ressantes.

Depuis montre que souvent été

Des aut végétaux à organites ce organites ét stabilité de

Annales

la luminescence des scintillateurs excités par le rayonnement radioactif. Il s'ensuit un comptage par défaut qu'il est nécessaire de corriger pour connaître la radioactivité réelle de l'échantillon.

C'est pourquoi l'utilisation du tritium pour l'étude du métabolisme de l'eau demande d'abord la mise au point de techniques qui permettent l'obtention rapide des diverses formes de transformation de l'eau par la plante, et la mesure de leur radioactivité avec le même rendement.

Avant d'exposer les techniques d'extraction et de comptage que nous avons adaptées à notre objectif, nous nous proposons de rapporter brièvement quelques-unes des études faites sur l'incorporation d'eau marquée dans les plantes, et sur les techniques de mesure de la radioactivité du tritium.

B. — UTILISATION D'EAU MARQUÉE DANS LES RECHERCHES SUR LES TRANSFORMATIONS DE L'EAU «IN VIVO»

Les effets qui résultent de l'utilisation, comme traceurs, d'isotopes lourds (stables ou radioactifs) ont été bien analysés par ARONOFF (1960). Ces effets, qui peuvent être intermoléculaires ou intramoléculaires ont été mesurés par divers auteurs.

L'effet de masse (*mass discrimination*) a tendance à ralentir la vitesse des réactions où sont engagés les composés enrichis avec un isotope de masse atomique plus lourde que celle de l'atome normal. BIGELEISEN (1949) a notamment calculé que, par effet de masse, la vitesse des réactions intermoléculaires peut être freinée *au maximum 18 fois*, lorsque l'hydrogène est remplacé par le deutérium, ou *au maximum 60 fois* lorsque le remplacement est fait par le tritium. RITTENBERG (1963) constate même que des changements notables surviennent dans la vitesse des réactions du métabolisme intermédiaire quand on remplace H_2O par D_2O ou par $H_2^{18}O$; cette substitution isotopique peut conduire comme nous allons le voir, à l'inhibition de croissance et de division des cellules vivantes, si les concentrations en eau lourde dans le milieu sont fortes.

Le phénomène d'échange isotopique a été plus étudié que l'effet de masse. D'après VIALARD (1956) l'hydrogène le plus rapidement échangeable se trouve dans les groupes $-OH$, $=N-H$ et $\equiv C-H$. D'après BRODSKY (1958), les échanges isotopiques requièrent en général un milieu acide et une température supérieure à $100^\circ C$ pour se produire d'une façon notable. Selon cet auteur, en confirmation des résultats précédents, l'échange de l'hydrogène dans les liaisons $C-H$ est peu rapide, alors que l'hydrogène du groupe OH est plus mobile. Dans ce cas, c'est parfois le groupe OH lui-même qui est échangé, mais la vitesse d'échange varie beaucoup avec la structure des molécules hydroxylées. Ainsi BRODSKY a observé un échange rapide entre $H_2^{18}O$ et le triéthylsilanol à $100^\circ C$, un échange entre $H_2^{18}O$ et l'hydroquinone seulement à partir de $150-170^\circ C$, aucun échange ne se produisant entre $H_2^{18}O$ et le pyrogallol, le phénol ou le catéchol. Pour chaque type de métabolite constituant la matière organique des plantes, il conviendra donc de mesurer l'intensité de l'échange isotopique du tritium à partir de 3H_2O . Quant à l'échange entre les molécules d'eau, dans les milieux biologiques, ce sont des expériences menées avec $H_2^{18}O$ qui ont donné les informations les plus intéressantes.

1. — Études faites avec de l'eau enrichie en oxygène-18

Depuis la célèbre expérience de RUBEN et *al.* (1941) sur des Algues alimentées en $H_2^{18}O$, qui montre que l'oxygène dégagé a toujours la composition isotopique de l'eau, l'eau enrichie en ^{18}O a souvent été utilisée dans les recherches de physiologie végétale.

Des auteurs russes, notamment, ont étudié le métabolisme et l'échange de l'eau dans les tissus végétaux à l'aide de $H_2^{18}O$. VASIL'EVA et BURKINA (1960) ont pu estimer le déficit hydrique de divers organites cellulaires grâce à l'introduction de $H_2^{18}O$ dans les feuilles étiolées de Fève. De tous les organites étudiés, les chloroplastes sont ceux qui sont le moins vite saturés en eau, ce qui révèle la stabilité de leurs réserves hydriques.

VARTAPETIAN (1960 a) a mesuré la vitesse d'échange entre $H_2^{18}O$ incorporé à une solution nutritive et H_2O contenue dans les différents organes de Haricots et de Mimosas transplantés sur ce milieu : au bout de 1 minute, environ la moitié de l'eau des racines, séparées ou non des parties aériennes, est remplacée par l'eau de la solution et l'équilibre est pratiquement atteint au bout de 7 minutes. Après 75 heures d'immersion dans une solution nutritive enrichie en $H_2^{18}O$, cet auteur constate que la teneur en ^{18}O des feuilles et des racines correspond à 70-80 p. 100 de celle du milieu extérieur, tandis que la teneur en ^{18}O des tiges est égale à celle de la solution (100 p. 100). VARTAPETIAN attribue cette différence entre feuilles et racines d'une part, tiges d'autre part, aux pertes de $H_2^{18}O$ par la grande rapidité d'échange de l'eau des feuilles et des racines avec la vapeur d'eau atmosphérique lors de la préparation des échantillons à l'analyse. Cette interprétation est confirmée par une étude plus récente de VARTAPETIAN et KURSANOV (1961) : sur des feuilles de *Vallisneria* immergées dans $H_2^{18}O$, on constate à nouveau que 50 p. 100 de l'eau tissulaire est échangée en 60 secondes et la totalité en 8 à 15 minutes ; cet échange entre « l'eau liquide » interne et « l'eau liquide » externe est encore plus rapide chez les êtres unicellulaires (levures). De plus, ces auteurs montrent, sur les parties aériennes et sur les racines de végétaux placées dans une atmosphère enrichie en $H_2^{18}O$, que l'échange entre « l'eau liquide » interne et « l'eau vapeur » externe peut être également rapide, surtout pour les racines et pour les feuilles. Nous verrons combien cette observation est intéressante du point de vue pratique : les faibles teneurs en eau marquée, trouvées dans les organes végétaux, en comparaison de la teneur plus élevée des solutions nutritives, peuvent s'expliquer par des échanges de ce type, susceptibles de se produire pendant la préparation des échantillons à analyser. Après avoir mis en évidence la rapidité des échanges entre l'eau du tissu végétal et l'eau du milieu extérieur, VARTAPETIAN (1960 b) a montré chez le Haricot que $H_2^{18}O$ atteint rapidement le protoplasme et ses inclusions, et participe activement aux réactions chimiques dont ils sont le siège. Ce dernier résultat nous donne l'assurance que *les molécules d'eau marquées atteignent très rapidement tous les sites cellulaires où elles sont métabolisées*. La vitesse de pénétration de l'eau dans les cellules ne semble donc pas devoir être un obstacle à l'utilisation d'eau marquée dans des recherches sur le métabolisme.

L'oxygène-18 donne une image de la molécule d'eau dans son entier au cours de sa migration et de ses échanges dans la plante. Mais nous pensons que les plus intéressantes études ont été faites à l'aide d'eau deutériée.

2. — Études faites avec de l'eau deutériée

Nous devons d'abord observer que les expériences faites sur les végétaux avec de l'eau deutériée ont pleinement confirmé les résultats obtenus à partir de $H_2^{18}O$ sur l'échange des molécules d'eau. Ainsi avec de l'eau marquée au deutérium, HÜBNER (1960) a confirmé les observations de VARTAPETIAN (1960) : l'eau des racines et des feuilles de *Vicia faba* s'échange plus rapidement que l'eau des tiges, avec l'eau du milieu extérieur. Et cet auteur indique que *si la partie aérienne d'une plante est placée dans une atmosphère anhydre, il est possible d'obtenir, dans l'eau des feuilles, un taux d'enrichissement en deutérium égal à celui de la solution nutritive*.

De même, JAMVILOV et EFREMOV (1962) montrent, sur un plant de Maïs maintenu pendant 7 heures dans une chambre hermétiquement close, où circule en permanence un courant d'air sec, que l'eau du tissu végétal peut s'échanger complètement avec l'eau deutériée de la solution nutritive. Ils sont alors amenés à considérer la participation des diverses fractions de l'eau cellulaire à cet échange : selon leurs résultats, les molécules d'eau de solvatation des macromolécules du protoplasme et les molécules d'eau « libre » s'échangent constamment et très rapidement entre elles, après que l'eau ait pénétré dans la cellule à partir du milieu extérieur.

Cependant, même si des conditions expérimentales soigneusement étudiées, comme nous le verrons dans les suivantes publications, permettent de limiter au maximum les phénomènes d'échange isotopique des molécules d'eau marquée, il reste que la vitesse des réactions qui assurent le métabolisme du traceur (deutérium ou tritium) est altérée par l'effet de masse. Il en résulte une certaine toxicité de l'eau deutériée pour les végétaux, bien mise en évidence par les travaux de PRATT (1937)

Les prem
(1934), qui on
de l'eau sur le
rium ne sont
faible fixation
des groupes —
première dém
Un isotope de
plantes. Mais
réduite quan

Dans le r
gement de l'e
99,9 p. 100 :
en présence d
CRAIG et TRE
deutériée, à c
obscur de l
photochimiqu
d'eau deutéri
lites deutéri
ainsi que RIE
de HILL, con
la réaction c
maire ; l'effe
stances réact
a été confirm
l'enrichissem
poration du
corporation d
Chlorella vulg
 $^{14}CO_2$ à la lu
dans l'eau H

Cependa
deutériée ; e
capables de
études sur l
publie la p
la croissance
tion nutritiv
solution, ces
presque prop
des limbes et
toutes les réa
un freinage
brunissent e
sorption pou
développent
teneur en d
déséquilibre
quée.

Si l'on

Les premiers travaux sur la photosynthèse en présence de D_2O sont dus à REITZ et BONHOEFFER (1934), qui ont montré que des végétaux chlorophylliens (Algues vertes) peuvent fixer le deutérium de l'eau sur le carbone, à la lumière, alors que chez des hétérotrophes (Levures), les atomes de deutérium ne sont pratiquement pas introduits dans les liaisons avec le carbone. Dans ce dernier cas, la faible fixation de deutérium observée dans la matière organique provient de l'échange de l'hydrogène des groupes $-OH$ et $-NH_2$ des sucres et des protéines. Nous pensons que ce résultat constitue la première démonstration expérimentale du fait que la photosynthèse s'accompagne d'une réduction. Un isotope de l'hydrogène pourrait alors servir à mesurer l'intensité de la photosynthèse chez les plantes. Mais ces auteurs ont déjà observé que beaucoup de réactions chimiques ont leur vitesse réduite quand l'hydrogène ordinaire est remplacé par l'hydrogène lourd.

Dans le même temps CURRY et TRELEASE (1935) mesurent la diminution de la vitesse de dégagement de l'oxygène par des *Chlorelles* incubées dans un tampon contenant de l'eau deutériée à 99,9 p. 100 : l'intensité de la photosynthèse ainsi déterminée représente 41 p. 100 de celle observée en présence d'eau pure (0,02 p. 100 D_2O). Cependant, avec le même matériel et les mêmes techniques, CRAIG et TRELEASE (1937), PRATT et al. (1937), puis PRATT et TRELEASE (1938) démontrent que l'eau deutériée, à cette concentration, diminue la vitesse de ce qu'ils appelaient à l'époque les réactions obscures de la photosynthèse (cycle de CALVIN) et n'a que peu d'effet sur la vitesse des réactions photochimiques. Ce résultat peut conduire à penser que l'inhibition de la photosynthèse en présence d'eau deutériée concentrée est due à l'altération des constantes de vitesse de réaction des métabolites deutériés, plus qu'à la diminution de la vitesse de formation du photoréducteur primaire. C'est ainsi que RIESKE et al. (1962), au terme d'une étude des effets de D_2O sur la cinétique de la réaction de HILL, considèrent que la substitution isotopique ne doit pas exercer son action directement sur la réaction d'ionisation de l'eau qui fournit les protons (ou les deutons) au photoréducteur primaire ; l'effet ralentisseur de D_2O est interprété par ces auteurs comme une inactivation des substances réactives (enzymes, coenzymes) après leur marquage. Cette inhibition de la photosynthèse a été confirmée chez *Chlorella pyrenoidosa* : WEINBERGER et PORTER (1954) ont montré que même si l'enrichissement du milieu de culture en eau deutériée n'atteint que 23,5 p. 100, la vitesse d'incorporation du deutérium dans la matière organique représente à peu près la moitié de la vitesse d'incorporation de l'hydrogène. Plus récemment, BLAKE et al. (1962) ont observé dans des cultures de *Chlorella vulgaris* et de *Scenedesmus* adaptés à la croissance dans l'eau deutériée, que la fixation de $^{14}CO_2$ à la lumière est de 10 à 30 p. 100 inférieure à celle mesurée pour les mêmes algues cultivées dans l'eau H_2O .

Cependant, le ralentissement de la photosynthèse ne suffit pas à expliquer la toxicité de l'eau deutériée ; et la découverte qu'un grand nombre de champignons, d'Algues et de Bactéries sont capables de croître dans 99,6 p. 100 de D_2O (KATZ et al., 1958 ; DABOLL et al., 1962) a stimulé les études sur les effets biologiques de l'eau deutériée. Par ailleurs c'est BLAKE et al., qui, en 1964, publient la première étude complète des effets du remplacement de l'hydrogène par le deutérium sur la croissance d'une plante supérieure. En transplantant des plants adultes de Menthe sur une solution nutritive contenant des proportions de D_2O , allant de 10 à 100 p. 100 du volume d'eau de la solution, ces auteurs ont observé les effets suivants : l'oxyde de deutérium provoque une réduction, presque proportionnelle à sa concentration, de l'élongation de la pousse axiale, des pousses latérales, des limbes et des pétioles des feuilles. Cet effet est attribué à la diminution, par le D_2O , de la vitesse de toutes les réactions normales de synthèse, en particulier des réactions photosynthétiques, ce qui entraîne un freinage de la vitesse de croissance. En présence de fortes concentrations en D_2O , les racines brunissent et se recroquevillent par suite d'une réduction de leur surface et de leur capacité d'absorption pour l'eau. L'aptitude des plantes à fleurir est annulée ; des surfaces brunes nécrotiques se développent sur les feuilles le long de la nervure centrale. Les auteurs ont, en outre, comparé la teneur en deutérium de l'eau tissulaire et des métabolites extraits de la plante ; ils constatent un déséquilibre dans la répartition du deutérium entre ces deux formes, l'eau tissulaire étant plus marquée.

Si l'on veut éliminer le ralentissement général des réactions et la toxicité, le deutérium ne doit

être utilisé qu'à de faibles doses, en biologie, comme traceur de l'eau : de ce point de vue c'est le tritium qui nous semble être le meilleur isotope.

3. — Études avec l'eau tritiée

En effet, le tritium, s'il présente les mêmes inconvénients que le deutérium, dus à l'effet de masse, a en revanche l'avantage d'être détecté à l'état de traces, par sa radioactivité. Alors que l'enrichissement de l'eau deutériée incorporée aux systèmes biologiques ne peut guère être inférieur à 10 p. 100, si l'on veut doser facilement le deutérium dans les métabolites, l'enrichissement en eau tritiée peut être parfaitement négligeable : de l'ordre de 10^{-6} atome de ^3H pour cent.

Pour ces faibles teneurs en tritium, la toxicité ne devrait pas apparaître dans une plante. Mais il demeure le fractionnement isotopique, dû également à l'effet de masse, qui ralentit spécifiquement les réactions quand un atome de tritium est métabolisé à la place d'un atome d'hydrogène. Ainsi, on a mesuré, chez *Chlorella*, que la vitesse d'intégration de ^3H représente 40 à 45 p. 100 de celle de ^1H dans la matière organique, à partir de l'eau, à la lumière, pour une solution nutritive contenant 1 mCi de $^3\text{H}_2\text{O}$ par ml (WEINBERGER et PORTER, 1953 et 1954). Il faudra tenir compte de cet effet dans l'interprétation de nos résultats, bien que nos expériences soient conçues en vue de comparer l'incorporation de l'eau tritiée entre plusieurs types de plantes.

D'une manière générale l'effet de masse n'est pas un obstacle majeur à l'emploi du tritium, si l'on prend soin d'en connaître l'intensité.

En 1957, WILZBACH (1957 a) a fait le point, lors du symposium, des possibilités d'utilisation du tritium comme traceur en biologie. Il a décrit notamment une méthode de tritiation par exposition des substances au tritium gazeux sous pression (1957 b). Cette technique entraîne le minimum de destruction des substances par irradiation et permet d'obtenir des produits tritiés à haute activité avec un rendement élevé. Par la suite, SIMON (1961) a inventorié les travaux permis grâce à l'obtention de substances marquées au tritium. Le tritium apparaît comme un auxiliaire d'analyse qui permet notamment d'étudier les effets isotopiques, de reconnaître la réactivité de certains groupes chimiques, de préciser certaines étapes de biosynthèse.

Ainsi SIMON (1963) a pu mettre en évidence la distribution différente du tritium dans diverses molécules de sucres au cours du marquage par la technique de WILZBACH : il est possible d'avoir une idée de la réactivité des différents groupes —OH dans les molécules de sucres. De même, en biochimie, les résultats obtenus par l'emploi de composés tritiés ont déjà été extrêmement précieux pour élucider certains mécanismes de biosynthèse dans la série des composés polyisopréniques, stéroïdes ou caroténoïdes (COSTES, 1964).

Il n'est donc pas étonnant que cet isotope ait été utilisé en physiologie végétale, dès que les techniques de détection de sa radioactivité ont été au point.

A notre connaissance un des premiers travaux réalisés avec le tritium dans ce domaine a consisté en une étude de l'absorption de l'eau chez le Haricot : CLINE (1953) a observé le premier qu'il s'établit un équilibre très lent entre l'eau tritiée absorbée par les racines et l'eau des feuilles. Puis BID-DULPH et al. (1961) ont confirmé, avec $^3\text{H}_2\text{O}$, les résultats obtenus par VARTAPETIAN (1960) avec H_2^{18}O et par HÜBNER (1960) avec D_2O : l'eau des tiges est moins rapidement échangeable que celle des racines ou des feuilles, avec l'eau du milieu extérieur.

Par la suite, l'eau tritiée a principalement été utilisée dans des études de translocation. Ainsi GAGE et ARONOFF (1960) ont comparé la vitesse de pénétration de l'eau dans les feuilles par infiltration pétiole et par incorporation de $^3\text{H}_2\text{O}$ à l'état de vapeur. Mais l'extraction de l'eau tissulaire par distillation à 100°C , et des métabolites tritiés par l'éthanol à 80 p. 100 bouillant ont certainement entaché les résultats d'erreurs dues à l'échange isotopique. Plus récemment, en soumettant de l'eau tritiée (vapeur ou liquide) à des feuilles d'*Helianthus annuus* et de *Pinus halepensis*, VAADIA et WAISEL (1963) ont mesuré la vitesse d'entrée de l'eau dans les feuilles en fonction de leur état de turgescence et de l'épaisseur de leur cuticule : ils constatent que le transport de l'eau dans la tige est extrêmement lent et, en plusieurs cas, que le tritium ne peut être détecté dans la tige que 3 heures après

une exposition co
qu'en phase vap
de diffusion. Ré
libre entre l'exs
racines plongent

Dans le dor
principaux résul
à MOSES et CAL
plus intense à l
 ^{14}C de $^{14}\text{CO}_2$: d
les monophosph
l'acide malique
radioactivité tot
la lumière (49,3
ont montré que
 $^{14}\text{C}^3\text{H}$ dans les
($^{14}\text{CO}_2$ et $^3\text{H}_2\text{O}$)
7,6 atomes de ^3H
isotopique. Mai
poration dans le
risation du cycl

D'autre pa
plastés avec d
11 composés, su
l'extrait acéton
les quinones at
MOSES et CAL
fixer le tritium
dant obtenu un
de Tomate, fix
observe que la
excède presque
liquide ou de
immédiate, dér

D'une ma
dans l'interpré
ces résultats n
bolisme.

Au terme
marquée par
solution expér
vapeur d'eau
nous le verrou
matière organ
basses et la ra

Enfin le t
apparaît com
graphie, les t
tenant fixer

une exposition continue des feuilles. L'entrée de l'eau dans les feuilles est plus rapide en phase liquide qu'en phase vapeur, et, dans tous les cas, l'entrée est moins rapide que celle prévue par l'équation de diffusion. Récemment, HODGES et VAADIA (1964) ont montré au moyen de l'eau tritiée, que l'équilibre entre l'exsudat racinaire d'oignons et la solution nutritive est atteint en 10 heures, quand les racines plongent en entier dans la solution.

Dans le domaine de la photosynthèse, il y a encore peu de travaux réalisés avec $^3\text{H}_2\text{O}$ et les principaux résultats ont été obtenus sur la *Chlorella*. La première recherche systématique est due à MOSES et CALVIN (1959) qui ont observé chez *Chlorella* une fixation du tritium de $^3\text{H}_2\text{O}$ trois fois plus intense à la lumière qu'à l'obscurité. Le tritium se retrouve dans les mêmes produits que le ^{14}C de $^{14}\text{CO}_2$: dès les courtes périodes d'incubation à la lumière, ^3H apparaît principalement dans les monophosphates d'oses, l'acide phosphoglycérique, l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'acide malique et l'acide glycolique. Par ailleurs il est intéressant de noter que la proportion de la radioactivité totale fixée dans les acides aminés est plus élevée à l'obscurité (72,8 p. 100) qu'à la lumière (49,3 p. 100). Au terme d'une étude expérimentale plus critique, SIMON et TREBST (1961) ont montré que le rapport $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ dans les sucres obtenus par photosynthèse est inférieur au rapport $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ dans les substrats fournis simultanément aux suspensions de *Chlorella* ou de chloroplastes ($^{14}\text{CO}_2$ et $^3\text{H}_2\text{O}$). Ce fait traduit un enrichissement des sucres en tritium : il peut y avoir jusqu'à 7,6 atomes de ^3H fixé pour 1 atome de ^{14}C . Ces auteurs ont d'abord interprété ce résultat par un effet isotopique. Mais dans une récente publication, SIMON et al. (1964) rapportent que l'excès d'incorporation dans les sucres du tritium de $^3\text{H}_2\text{O}$ à la lumière serait dû, en général, aux réactions d'isomérisation du cycle de CALVIN.

D'autre part, l'incubation de fragments de chloroplastes avec $^3\text{H}_2\text{O}$ et l'extraction de ces chloroplastes avec des solvants de polarité différente permettent à VISHNIAC (1963) d'isoler au moins 11 composés, séparables par chromatographie, qui incorporent le tritium à la lumière seulement. Dans l'extrait acétonique notamment, l'auteur constate que la chlorophylle *a* est très marquée ainsi que les quinones absorbant à 255 et 277 m μ . Ce résultat est en contradiction avec les observations de MOSES et CALVIN (1959) qui pensent que les chlorophylles et les caroténoïdes ne peuvent rapidement fixer le tritium de $^3\text{H}_2\text{O}$ dans des positions non échangeables. Rappelons que l'un de nous a cependant obtenu une fixation enzymatique de ^3H à partir de $^3\text{H}_2\text{O}$ dans le β -carotène de chloroplastes de Tomate, fixation distincte de celle obtenue par échange (COSTES, 1963). Enfin ARONOFF (1963) observe que la radioactivité spécifique molaire des sucres photosynthétisés par des feuilles de Soja, excède presque toujours celle de l'eau tritiée, après équilibre avec celle-ci incorporée sous forme de liquide ou de vapeur ; l'auteur conclut que les hydrogènes des sucres, quelle que soit leur origine immédiate, dérivent d'un agent réducteur en équilibre relativement rapide avec l'eau.

D'une manière générale, tous les auteurs s'accordent à reconnaître les difficultés rencontrées dans l'interprétation des résultats obtenus avec le tritium. Mais peu ont pris soin de s'assurer que ces résultats n'étaient pas dus à des phénomènes d'échange ne relevant pas des réactions du métabolisme.

4. — Conclusions

Au terme de cet examen des principaux travaux réalisés en physiologie végétale avec de l'eau marquée par différents traceurs, nous voyons surgir des difficultés dont certaines ont déjà reçu une solution expérimentale. C'est ainsi qu'on peut arrêter l'échange isotopique de l'eau foliaire avec la vapeur d'eau atmosphérique, en desséchant l'air qui parvient au niveau des feuilles. De même, comme nous le verrons, il est possible de limiter l'échange entre l'hydrogène de l'eau et l'hydrogène de la matière organique en prévoyant pour toutes les phases de l'analyse chimique, des températures assez basses et la rapidité des opérations.

Enfin le tritium dont la teneur peut être mesurée, même à l'état de traces, par sa radioactivité, apparaît comme le meilleur traceur de l'hydrogène. Il paraît donc utile d'examiner, dans la bibliographie, les techniques de comptage de la radioactivité de cet isotope, sur lequel nous allons maintenant fixer notre attention.

C. — TECHNIQUES DE COMPTAGE DU TRITIUM INCORPORÉ DANS DES SYSTÈMES BIOLOGIQUES

Notre objectif est de mesurer, dans les mêmes conditions, et avec le même rendement, la radioactivité du tritium incorporé dans l'eau tissulaire, dans les métabolites hydrosolubles libres et dans les pigments liposolubles extraits de feuilles de Blé. Or les deux principales méthodes qui permettent la mesure de la radioactivité du tritium sont le comptage par circulation de gaz ou le comptage par scintillation liquide. Nous savons que le comptage du tritium incorporé dans des échantillons biologiques présente des difficultés dues, d'une part à la faible énergie des particules β^- émises par ce radioélément, d'autre part à la possibilité de phénomènes d'extinction provoqués par les composés biologiques lors du comptage par scintillation liquide. Dans ce chapitre, nous ne prétendons pas faire une revue exhaustive de toutes les publications qui rapportent des techniques permettant de résoudre ces difficultés. Comme le notaient, dès 1957, DAVIDSON et FEIGELSON, la possibilité d'appliquer le comptage par scintillation liquide à un problème de mesure de radioactivité doit être examinée spécifiquement. Nous allons donc indiquer quelques-unes des solutions adoptées par les chercheurs dans des travaux récents, nous réservant, dans un prochain article, de présenter une étude expérimentale de la technique de comptage du tritium, par scintillation liquide, dans des substances de structures différentes.

1. — Comptage avec un compteur à circulation de gaz

Selon GLASCOCK (1956) c'est à l'état gazeux que le tritium est le mieux dosé ; en effet, avec les compteurs à gaz, le rendement atteint ou dépasse 75 p. 100. En outre, la radioactivité du tritium peut être mesurée dans un mélange avec d'autres isotopes radioactifs, grâce à la séparation chimique du tritium pendant la préparation du gaz : une combustion produit le tritium sous la forme d'eau, le carbone-14 sous la forme de gaz carbonique et laisse le phosphore-32 dans les cendres. Dans l'exemple décrit par l'auteur, le tritium obtenu est d'abord introduit dans des molécules d'hydrocarbure, notamment de butane normal : ce corps présente l'avantage de se condenser complètement à la température de l'air liquide, donc d'être facilement piégé et de pouvoir ultérieurement être introduit dans le compteur sous forme gazeuse, à la température du laboratoire.

2. — Comptage par scintillation

Certaines substances appelées « scintillateurs » ont la propriété de transformer les rayonnements radioactifs en rayonnement lumineux. Dans la mesure de la radioactivité par scintillation, le comptage des particules émises par l'échantillon radioactif se ramène à un comptage de photons émis par le scintillateur. Mais, principalement en milieu liquide, l'énergie absorbée par les molécules de scintillateur n'est pas entièrement réémise sous forme de lumière : elle peut être dégradée sous d'autres formes. On dit qu'il y a extinction. Cette extinction varie avec les mélanges de scintillateurs, avec les solvants, et avec la nature des substances dont on veut mesurer la radioactivité.

Pour le comptage d'émetteurs β^- mous (cas du tritium), l'emploi de scintillateurs liquides diminue considérablement l'autoabsorption, grâce à l'incorporation des substances radioactives, également en solution, dans un mélange homogène avec le système scintillant. Cette méthode a été appliquée notamment, par JACOBSON et ses collaborateurs (1960), pour la mesure du tritium dans le sang et les tissus animaux ; le tritium est dosé sous forme d'eau recueillie par distillation sous vide, après combustion du matériel biologique.

Les substan
solubles, nous av
et leur rendeme

21. — Les

Différents
tier en continu
la poudre crista

Mais les s
qu'ils peuvent s
(15 p. 100) ; en
que les second
celui décrit pa
le 1, 4bis(2-5-
à la première

BRAY (196
ses : il utilise,
méthanol, éthy
nous donneror
(1963) propose
un solvant au
échantillons a
par d'autres a
de naphthalène
sa miscibilité
sant comme s
l'éthylène gly

22. — L

Divers p
tritiés par sc
substance ra

Dans le
Ainsi WERBI
le but d'obte
scintillant p
demander s
l'hydrogène
tritiée.

Quant à
radioactivité
sections de
(1959) ont v
fiole conten
tage. Pour
comptage é
qui contient
de chromat

(1) Tra

Les substances extraites de matériaux biologiques étant, les unes liposolubles, les autres hydro-solubles, nous avons été amenés à rechercher un compromis entre la polarité des systèmes scintillants et leur rendement.

21. — Les scintillateurs.

Différents scintillateurs ont été préconisés. SCHRAM et LOMBAERT (1962) proposent d'enregistrer en continu la radioactivité du carbone-14 et du tritium dans des solutions aqueuses, grâce à la poudre cristalline d'*anthracène*, qui joue le rôle de scintillateur solide.

Mais les scintillateurs liquides sont les plus utilisés et se classent en deux catégories suivant qu'ils peuvent se mélanger à peu d'eau (0,5 à 2,5 p. 100) ou à un plus grand volume de solution aqueuse (15 p. 100) ; en général les premiers assurent au comptage de radioactivité un rendement plus élevé que les seconds. Le système couramment utilisé pour le comptage de solutions peu polaires est celui décrit par « Tracerlab » (1) : il comporte deux scintillateurs, le *Diphényloxazole* (DPO) et le 1, 4bis(2-(5-phényloxazol)) benzène benzène (POPOP), en solution dans le toluène, et appartient à la première catégorie.

BRAY (1960) préconise un système mieux adapté à la mesure de radioactivité de solutions aqueuses : il utilise, outre le DPO et le POPOP, le *naphtalène* en solution dans des solvants plus polaires, méthanol, éthylène glycol et *p*-dioxane. Au cours d'une étude détaillée de ces deux scintillateurs, nous donnerons leur composition exacte et nous comparerons leurs propriétés. PROCKOP et EBERT (1963) proposent d'associer au scintillateur peu polaire (DPO et POPOP en solution dans le toluène) un solvant auxiliaire, l'éthylèneglycolmonométhyl éther. Mais ce système est peu miscible à des échantillons aqueux et le rendement des comptages est plus faible que ceux décrits auparavant par d'autres auteurs. En effet WERBIN et ses collaborateurs (1959) avaient suggéré l'introduction de *naphtalène* dans le système précédent pour accroître son rendement, et de *dioxane* pour accroître sa miscibilité à l'eau, tandis que BRÜNO et CHRISTIAN (1961) augmentent la miscibilité en utilisant comme solvant des trois scintillateurs (*Naphtalène*, DPO, POPOP), le xylène, le *p*-dioxane et l'éthylène glycol.

22. — Les procédés de mesure.

Divers procédés sont proposés par les auteurs pour mesurer la radioactivité d'échantillons tritiés par scintillation liquide. Le comptage est généralement effectué par addition directe de la substance radioactive en solution dans un système scintillant de polarité convenable.

Dans le cas de l'eau des systèmes biologiques, un entraîneur est souvent utilisé pour la recueillir. Ainsi WERBIN *et al.* (1959) préconisent la distillation des liquides de l'organisme avec le benzène, dans le but d'obtenir un échantillon presque pur d'eau tritiée ; le comptage est alors réalisé avec un système scintillant polaire (*Naphtalène*, DPO, POPOP en solution dans le dioxane). Mais on peut se demander si lors de la distillation, le tritium de l'eau ne s'échange pas partiellement avec l'hydrogène du benzène, ce qui aurait pour effet d'abaisser la radioactivité spécifique de l'eau tritiée.

Quant aux métabolites, après séparation chromatographique, il est classique de mesurer leur radioactivité sur une partie aliquote de la solution. Mais la mesure peut aussi être effectuée sur des sections de chromatogrammes plongées directement dans la fiole de comptage. WANG et JONES (1959) ont vérifié que l'insertion de bandes de papier imprégné de substances radioactives dans une fiole contenant le liquide scintillant, ne réduit pas d'une façon appréciable le rendement du comptage. Pour améliorer la « géométrie » de la mesure, ces auteurs proposent d'utiliser des fioles de comptage équipées d'un puits concentrique : les bandes de papier sont immergées dans ce puits qui contient la solution scintillante. Or d'après GEIGER et WRIGHT (1960), l'orientation de la bande de chromatogramme par rapport à la fenêtre des photomultiplicateurs ne modifie pas notablement

(1) Tracerlab Inc., 1960. LSC-10 B liquid scintillation counting system. Richmond California.

le rendement du comptage. Il n'est donc pas nécessaire d'utiliser des fioles de comptage spécialement conçues ; il suffit, lors de la préparation de bandes de papier, de bien localiser la tache qui porte les substances radioactives. PINTER *et al.* (1963) proposent un papier en fibre de verre de préférence au papier de cellulose. Le papier en fibre de verre adsorbe plus de matériel que le papier de cellulose ; en outre, le rendement du comptage avec ce dernier correspond à 60 p. 100 seulement de celui qui peut être obtenu avec un papier en fibre de verre. ROUCAVROL et TAILLANDIER (1963) décrivent une méthode de comptage de substances émettrices de rayons β^- mous et séparées par chromatographie sur couche mince d'un support pulvérulent. Ces auteurs proposent d'imprégner la couche mince avec un scintillateur gélatifiable ; les photons de fluorescence alors émis sont captés par un photomultiplicateur à travers une « fente » au-dessus de laquelle défile le support en verre du chromatogramme.

23. — Mesure simultanée de la radioactivité du ^{14}C et du ^3H .

Il est souvent intéressant de pouvoir mesurer simultanément la radioactivité du Carbone-14 et du Tritium incorporés dans des échantillons biologiques. Deux méthodes sont décrites par les auteurs.

KELLY *et al.* (1961) proposent la dégradation préalable des échantillons. Une combustion des substances marquées permet en effet d'obtenir séparément $^{14}\text{CO}_2$ et $^3\text{H}_2\text{O}$: le $^{14}\text{CO}_2$ est absorbé par une solution d'hydroxyde de hyamine, puis compté dans une solution scintillante au toluène ; l'eau tritiée est recueillie sous forme de glace, puis comptée dans une solution scintillante de polarité appropriée. McFARLANE et MURRAY (1963) préconisent également la combustion préalable des échantillons : $^{14}\text{CO}_2$ est condensé par de l'azote liquide, dissous dans de la phénéthylamine et sa radioactivité est mesurée dans une solution scintillante peu polaire ; $^3\text{H}_2\text{O}$ est également condensé et compté dans une solution scintillante polaire.

PROCKOP et EBERT (1963) ont mis au point une méthode plus simple et plus rapide pour le comptage simultané de ^{14}C et de ^3H , sur des matériaux biologiques solubles dans l'eau et non dégradés au préalable. Avec le système scintillateur utilisé par ces auteurs et décrit plus haut il est possible, à l'aide de certains spectromètres, de déterminer différentiellement les valeurs absolues des radioactivités de ^3H et de ^{14}C incorporées à des échantillons biologiques aqueux. L'avantage de ce système de comptage est d'être peu sensible à l'effet d'extinction provoqué par les impuretés d'acides et de sels ; ce procédé pourra donc être appliqué à la mesure de radioactivité dans des hydrolysats et des mélanges.

24. L'extinction.

L'effet d'extinction qui est l'inconvénient majeur du comptage d'émetteurs β^- mous par scintillation liquide, a été étudié par de nombreux auteurs. Cet effet sera examiné en détail dans un prochain travail, et nous ne ferons ici que citer quelques études. KERR et ses collaborateurs (47) ont décrit les propriétés d'extinction d'un grand nombre de composés organiques, pour quelques solutions de scintillateurs liquides peu polaires et polaires d'usage courant. PENG (1960) propose deux méthodes pour la correction des phénomènes d'extinction, la méthode de l'étalon interne et la méthode de la dilution sur lesquelles nous reviendrons. Enfin SCHRAM et LOMBAERT (1963) ont réuni dans une publication récente, toutes les données relatives à la détection par scintillation organique d'émetteurs β^- de basse énergie.

D. — CONCLUSIONS

Nous voyons que, si l'eau marquée avec différents isotopes a déjà beaucoup servi à des recherches de physiologie végétale, c'est l'eau tritiée qui a été introduite le plus récemment. Nous pensons que les possibilités de ce traceur de l'eau sont encore à peine exploitées. Par exemple, nous n'avons

pas eu connaissance du chemin

Dans cet prochainement globale des tr Les principal isotopique et

L'échang les sites enzy gène des mo

L'effet d La toxicité r trations en a des réactions à l'interpréta utilisé comm

Par aill avec des sub dus au phén problèmes p tion des dif

RESEAR

This p work. A po ration) of v exchange a

Excha matic site exchange c

Tritium in physiolo molécules r rimental r or two spe

Final compound:

ARNON D. ARONOFF ARONOFF librated BIDDULPH Plant P

pas eu connaissance de recherches sur la transpiration des plantes, réalisées avec $^3\text{H}_2\text{O}$, et les voies du cheminement de l'hydrogène dans la photosynthèse commencent seulement à être explorées.

Dans cette mise au point constituant l'introduction d'un travail expérimental qui sera publié prochainement, nous avons examiné les possibilités d'utilisation de l'eau marquée dans une étude globale des transformations de l'eau dans les feuilles vertes par la photosynthèse et la transpiration. Les principales difficultés à l'emploi du tritium comme traceur de l'eau résident dans l'échange isotopique et dans l'effet de masse.

L'échange des molécules d'eau entre elles permet à ces molécules d'atteindre rapidement tous les sites enzymatiques où l'eau est métabolisée. Quant à l'échange du tritium entre l'eau et l'hydrogène des molécules organiques, il sera nécessaire d'en connaître l'intensité.

L'effet de masse introduit deux sortes de difficultés : la toxicité et le fractionnement isotopique. La toxicité ne semble pas devoir être redoutée car il est possible d'utiliser de très faibles concentrations en $^3\text{H}_2\text{O}$ dans les expériences de physiologie. Le fractionnement isotopique freine la vitesse des réactions qui métabolisent les molécules d'eau tritiée. Ce fait constitue en général un obstacle à l'interprétation correcte des résultats expérimentaux. La difficulté peut être levée si $^3\text{H}_2\text{O}$ n'est utilisé comme traceur de l'eau que dans des expériences comparatives.

Par ailleurs, l'établissement d'un bilan de la radioactivité du tritium par scintillation liquide avec des substances de propriétés physique et chimique différentes pose des problèmes techniques dus au phénomène d'extinction. C'est ce point qui sera l'objet d'un prochain travail : l'étude des problèmes posés par la mesure de la radioactivité du tritium, par scintillation liquide, après l'obtention des différentes substances que l'on peut extraire des feuilles.

Reçu pour publication en octobre 1964.

SUMMARY

RESEARCHES ON THE TRANSFORMATIONS OF WATER IN THE LEAVES WITH TRITIATED WATER

This paper is a review article which introduces the next publication from an experimental work. A possible use of tritiated water in a study on transformations (photosynthesis and transpiration) of water in green leaves is examined. The main difficulties in this subject reside in isotopic exchange and mass discrimination.

Exchange of water molecules between themselves allows them to quickly reach every enzymatic site where water is metabolized. Nevertheless it will be necessary to measure the rate of exchange of tritium between water and hydrogen from organic molecules.

Tritium toxicity should not appear, for it is possible to use very low concentration of $^3\text{H}_2\text{O}$ in physiological experiments. But mass discrimination decreases the reactions rate in which tritiated molecules are involved. So mass discrimination is a drawback for the right understanding of experimental results. This difficulty disappears in comparative experiments between two varieties or two species of plants.

Finally, liquid scintillation technics which allow to count radioactivity in various tritiated compounds, are discussed.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARNON D. I., 1959. Conversion of light into chemical energy in photosynthesis. *Nature*, **184**, 10-21.
ARONOFF S., 1960. Techniques of radiobiochemistry. *ISG* 56-7374, 1-15.
ARONOFF S. and CHOI I. C. S., 1963. Specific activity of photosynthetic sugars in soybean leaves equilibrated with tritiated water. *Arch. Biochem. Biophys.*, **102**, 159-612.
BIDDULPH O., NAKAJAMA F. S. and CORY R., 1961. Transpiration stream and ascension of calcium. *Plant Physiol.*, **36**, n° 4, 429-436.

- BIGEISEN J., 1949. The validity of the use of tracers to follow chemical reactions. *Science*, **110**, 14-16.
- BLAKE M. I., KAGANOVE A. S. et KATZ J. J., 1962. Carbon dioxide uptake studies in algae grown in water and deuterium oxide. *J. Pharm. Sci.*, **51**, 375-379.
- BLAKE M. I., CRANE F. A., UPHAUS R. A. and KATZ J. J., 1964. Effect of deuterium oxide on the growth of peppermint (*Mentha piperita* L.). I. Morphological study. *J. Pharm. Sci.*, **53**, n° 1, 79-83.
- BRAY G. A., 1960. A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.*, **1**, n° 45, 279-285.
- BRODSKY A. E., 1958. Recherches sur le mécanisme des réactions chimiques par les méthodes isotopiques. *J. Chim., Phys., Phys.-chim. biol. Fr.*, 26-52.
- BRUNO G. A. and CHRISTIAN J. E., 1961. Determination of carbon-14 in aqueous bicarbonate solutions by liquid scintillation counting techniques. *Anal. Chem.*, **33**, 1216-1218.
- CLINE J. F., 1953. Absorption and metabolism of tritium oxide and tritium gas by bean plants. *Plant Physiol.*, **28**, 717-723.
- COSTES C., 1960. Absorption et utilisation de l'énergie lumineuse par les végétaux cultivés dans les conditions naturelles. Mise au point. *Ann. Physiol. vég.*, **3**, 175-229.
- COSTES C., 1963. Métabolisme de la lutéine et de la violaxanthine dans les chloroplastes. *C. R. Acad. Sci.*, **256**, 5656-5659.
- COSTES C., 1964. Rôles du géranylgeraniol et du géranyllinalool dans la biosynthèse des caroténoïdes et du phytol des feuilles vertes. Abstracts. *VIIth International Congress of biochemistry*, New York, tome 7, 569.
- CRAIG F. N. and TRELEASE S. F., 1937. Photosynthesis of *Chlorella* in heavy water. *Amer. J. Bot.*, **24**, 232.
- CURRY J. and TRELEASE S. F., 1935. Influence of deuterium oxide on the rate of photosynthesis. *Science*, **82**, 18.
- DABOLL H. F., CRESPI H. L. et KATZ J. J., 1962. Mass cultivation of algae in pure heavy water. *Biotechnol. Bioeng.*, **4**, 281-297.
- DAVIDSON J. D. et FEIGELSON P., 1957. Practical aspects of internal-sample liquid-scintillation counting. *Intern. J. Appl. Rad. Isot.*, **2**, 1-18.
- McFARLANE A. S. and MURRAY K., 1963. ¹⁴C and ³H specific activities by bomb combustion and scintillation counting (bomb combustion of ¹⁴C and ³H). *Anal. Biochem.*, **6**, n° 3, 284-286.
- GAGE R. S. et ARONOFF S., 1960. Translocation. III. Experiments with ¹⁴C, ³⁶Cl and ³H. *Plant Physiol.*, **35**, 53-64.
- GEIGER J. W. et WRIGHT L. D., 1960. Techniques de comptage par scintillation avec bandes de papier-chromatogramme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2**, 282.
- GLASCOCK R. F., 1956. Quelques applications récentes du tritium dans les recherches biologiques. Actes de la conférence internationale sur l'utilisation de l'énergie atomique à des fins pacifiques. *AJCONF. 8/12/P/456*, séance 16 C, 457-462.
- HODGES T. K. and VAADIA Y., 1964. Uptake and transport of radiochloride and tritiated water by various zones of onion roots of different chloride status. *Plant Physiol.*, **39**, n° 1, 104-108.
- HÜBNER G., 1960. Zum Wassertransport in *Vicia faba*. *Flora*, **148**, n° 4, 549-594.
- JACOBSON H. I., GUPTA G. N., FERNANDEZ C., HENNIX S. and JENSEN E. V., 1960. Determination of tritium in biological material. *Arch. Biochem. Biophys.*, **86**, n° 1, 89-93.
- JAMVILOV F. D. et EFREMOV Jv. J. A., 1962. Étude de l'échange d'eau dans les plantes au moyen de l'eau lourde (D₂O). *Fiz. Rast.*, **9**, n° 4, 438-445.
- KATZ J. J., CRESPI H. L., FINKEL A. J., 1958. The biology of deuterium. *Proc. 2nd Internation. Conf. Peaceful uses Atomic Energy*, **25**, 173-180.
- KELLY R. G., PEETS E. A., GORDON S. and BUYSKE D. A., 1961. Determination of ¹⁴C and ³H in biological samples by SCHÖNIGER combustion and liquid scintillation techniques. *Anal. Biochem.*, **2**, n° 3, 267-273.
- KERR V. N., HAYES F. N. and OTT D. G., 1957. The quenching of liquid scintillator solutions by organic compounds. *Internation. J. Appl. Rad. Isot.*, **1**, 284-288.
- MOSES V. and CALVIN M., 1959. Photosynthesis studies with tritiated water. *Bioch. Biophys. Acta*, **33**, 297-312.
- PENG C. T., 1960. Quenching of fluorescence in liquid scintillation counting of labeled organic compounds. *Anal. Chem.*, **32**, 1292-1296.
- PINTER K. G., HAMILTON J. G. and O'NEAL MILLER, 1963. Liquid scintillation counting with glass fiber paper. *Anal. Biochem.*, **5**, 458-463.
- PRATT R., 1937. Growth of *Erysiphe* germ tubes in deuterium oxide after exposure to water. *Amer. J. Bot.*, **24**, 76-82.
- PRATT R., CRAIG F. N. and TRELEASE S. F., 1937. Influence of deuterium oxide on photochemical and dark reactions of photosynthesis. *Science*, **85**, n° 1, 271-273.
- PRATT R. and TRELEASE S. F., 1938. Influence of deuterium oxide on photosynthesis in flashing and in continuous light. *Amer. J. Bot.*, **25**, 133-139.

PROCKOP D. J. in water. *Sol.*

REITZ O. und nismen. *Nat.*

RIESKE J. S., I chloroplasts. **97**, 100-106.

RITTENBERG D. 318-323.

ROUCAYROL J. mince avec u

RUBEN S., RA of photosynt

SCHRAM E. an anthracene p

SCHRAM E. an Elsevier Mon

SIMON H., 196 n° 14, 481-48

SIMON H., 196 n° 5, 360-366

SIMON H. und *Z. Naturforsch.*

SIMON H., DO *Z. Naturforsch.*

VAADIA Y. an **16**, n° 2, 44

VARTAPETIAN de l'eau lour

VARTAPETIAN *Rasten.*, **7**, n

VARTAPETIAN and vaporou

VASIL'VA N. n° 4, 401-40

VIALARD R., et Cie édit.,

VISHNIAC W., (1961). *Mech*

WANG C. H. matogramme

WEINBERGER *noidosa* cells

WEINBERGER *rella pyrenoi*

WERBIN H., in body fluid

WILZBACH K. Corp., U. S.

WILZBACH K. *Chem. Soc.*,

- Science, **110**, 14-16.
 es in algae grown in
- terium oxide on the
ci., **53**, n° 1, 79-83.
 s in a liquid scintilla-
- méthodes isotopiques.
- dicarbonate solutions
- bean plants. *Plant*
- tivés dans les condi-
- lastes. *C. R. Acad.*
- des caroténoïdes et
 New York, tome 7,
- ter. *Amer. J. Bot.*,
- synthesis. *Science*,
- heavy water. *Bio-*
- scintillation counting.
- ombustion and scin-
 -286.
- nd ^3H . *Plant Phys-*
- c bandes de papier-
- s biologiques. Actes
 ifiques. *AJCONF*.
- water by various
60. Détermination
- antes au moyen de
- d *Internation. Conf.*
- of ^{14}C and ^3H in
l. Biochem., **2**, n° 3,
- solutions by organic
- Biophys. Acta*, **33**,
- organic compounds.
- counting with glass
- to water. *Amer.*
- photochemical and
- s in flashing and in
- PROCKOP D. J. and EBERT P. S., 1963. A simple method for differential assay of tritium and carbon-14 in water. Soluble biological materials. *Anal. Biochem.*, **6**, n° 3, 263-271.
- REITZ O. und BONHOEFFER K. F., 1934. Über den Einbau von schweren Wasserstoff in wachende Organismen. *Naturwissenschaften*, **22**, 744.
- RIESKE J. S., LUMRY R. and SPIKES J. D., 1962. The mechanism of the photochemical activity of isolated chloroplasts. VI-Effects of heavy water on the kinetics of the Hill reaction. *Arch. Biochem. Biophys.*, **97**, 100-106.
- RITTENBERG D., 1963. The effect of isotopic substitution on the living cell. *J. Chimie Physique*, **60**, n° 1-2, 318-323.
- ROUCAYROL J. C. TAILLANDIER P., 1963. Détection des activités β sur un chromatogramme en couche mince avec un scintillateur gélifiable. *C. R. Acad. Sci. Fr.*, **256**, 4653.
- RUBEN S., RANDALL M., KAMEN M. and HYDE J. L., 1941. Heavy oxygen as a tracer in the study of photosynthesis. *J. Amer. Chem. Soc.*, **63**, 877-879.
- SCHRAM E. and LOMBAERT R., 1962. Determination of tritium and carbon-14 in aqueous solution with anthracene powder. *Anal. Biochem.*, **3**, n° 1, 68-74.
- SCHRAM E. and LOMBAERT R., 1963. *Organic scintillation detectors counting of low energy beta emitters.* Elsevier Monographs, physics section, Elsevier Publishing Company. Amsterdam, London, New York.
- SIMON H., 1961. Le travail avec le tritium en chimie organique et en biochimie. *Angew. Chem.*, **73**, n° 14, 481-487.
- SIMON H., 1963. Die Tritium-Verteilung in Zuckern nach Wilzbach-Markierung. *Z. Naturforsch.*, **18 b**, n° 5, 360-366.
- SIMON H. und TREBST A., 1961. Über den Einbau von Tritium in einige Zucker bei der Photosynthese. *Z. Naturforsch.*, **16**, n° 4, 285-287.
- SIMON H., DORRER H. D. und TREBST A., 1964. Photosyntheseversuche in Tritiumwasser mit *Chlorella*. *Z. Naturforsch.*, **19b**, 734-744.
- VAADIA Y. and WAISEL Y., 1963. Water absorption by the aerial organs of plants. *Physiol. Plantar.*, **16**, n° 2, 44-51.
- VARTAPETIAN B. B., 1960 a. Recherches ultérieures sur le métabolisme hydrique de la plante au moyen de l'eau lourde H_2^{18}O . *Fiz. Rast.*, **7**, n° 4, 395-397.
- VARTAPETIAN B. B., 1960 b. Participation de H_2^{18}O au métabolisme des tissus photosynthétisants. *Fiz. Rasten.*, **7**, n° 4, 414-418.
- VARTAPETIAN B. B. and KURSANOV A. L., 1961. Exchange of water between plant tissues and liquid and vaporous water of the environment. *Fiz. Rast.*, **8**, n° 5, 569-575.
- VASIL'eva N. G. et BURKINA Z. S., 1960. Le régime hydrique des organites cellulaires. *Fiz. Rast.*, **7**, n° 4, 401-406.
- VIALARD R., 1956. *Le tritium. Nouveau Traité de Chimie minérale* sous la direction de P. PASCAL, Masson et Cie édit., Paris, t. I, 911-940.
- VISHNIAC W., 1963. Path of hydrogen in photosynthesis. *Proc. of the Vth Internation. Congr. of Biochem.* (1961). Mechanism of photosynthesis. VI, 251-252.
- WANG C. H. et JONES D. E., 1959. Technique pour la mesure de la radioactivité sur sections de chromatogrammes en cellulose plongés dans un liquide scintillant. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1**, 203.
- WEINBERGER D. and PORTER J. W., 1953. Incorporation of tritium oxyde into growing *Chlorella pyrenoidosa* cells. *Science*, **117**, 636-638.
- WEINBERGER D. and PORTER J. W., 1954. Metabolism of hydrogen isotopes by rapidly growing *Chlorella pyrenoidosa* cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, **50**, 160-168.
- WERBIN H., CHAIKOFF I. L. and IMADA M. L., 1959. Rapid sensitive method for determining H^3 water in body fluids by liquid scintillation spectrometry. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **102**, n° 1, 8-12.
- WILZBACH K. E., 1957 a. Proceedings of the symposium on tritium in tracer applications. Tiré de Nuclear Corp., U. S. A., New York.
- WILZBACH K. E., 1957 b. Tritium labeling by exposure of organic compounds to tritium gas. *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 1013.