

FRACTIONNEMENT DES CONSTITUANTS PHOSPHORES

DANS LE MATERIEL VEGETAL

Séparation et méthode de dosage
utilisées au Laboratoire
de Diagnostic Foliaire de l'ORSTOM

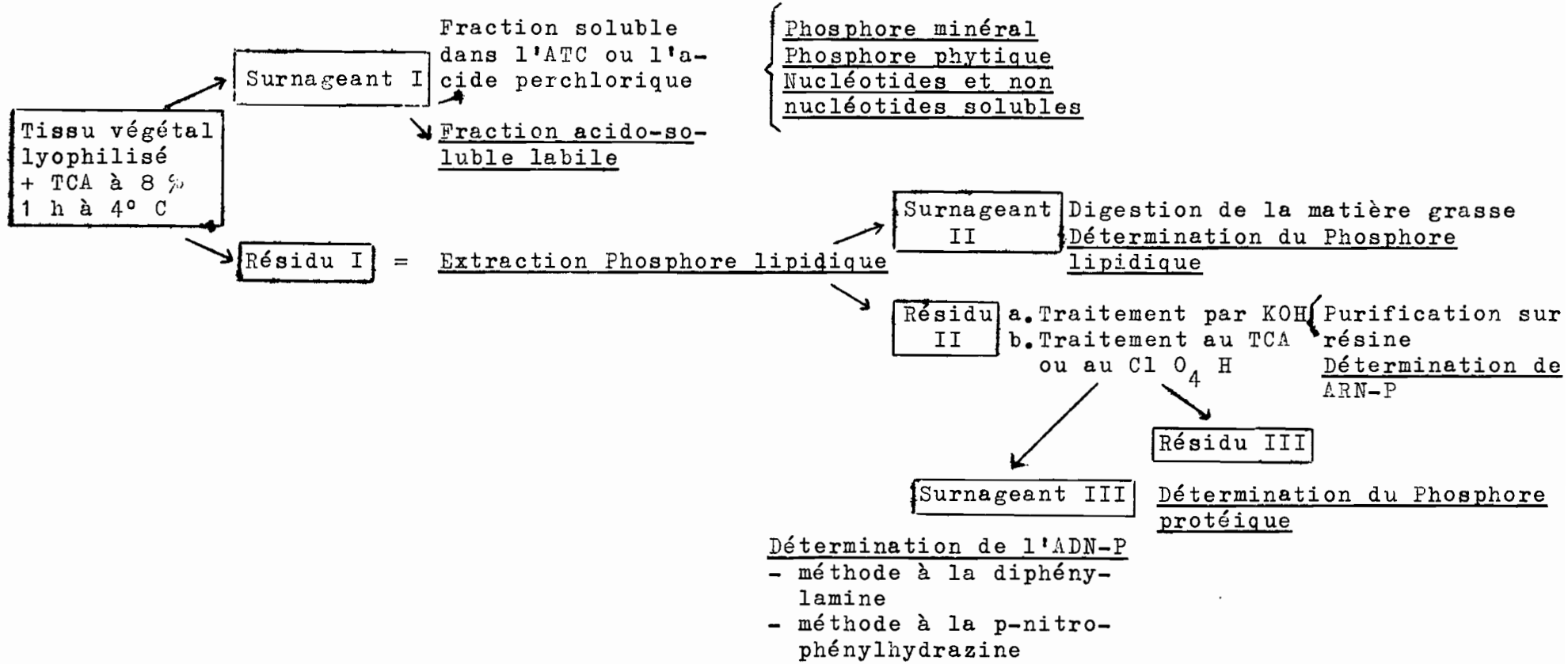
J. DIDIER DE SAINT-AMAND
L. ZUCKERMAN

ORSTOM
Décembre 1966

PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les tissus frais à analyser sont séchés à froid dans un lyophilisateur à environ $- 60^{\circ}$ C. Le matériel cryodesséché est broyé à froid puis conservé à $- 10^{\circ}$ C.

SCHEMA DU FRACTIONNEMENT DES CONSTITUANTS PHOSPHORES
DANS LA MATIERE VEGETALE



- METHODES ANALYTIQUES -

A. E X T R A C T I O N E T D O S A G E
D E S C O N S T I T U A N T S A C I D O - S O L U B L E S

1. EXTRACTION DE LA FRACTION ACIDO-SOLUBLE TOTALE.

La fraction acido-soluble est extraite par l'acide trichloracétique (ATC) ou l'acide perchlorique dont la concentration optimum doit être déterminée par des essais préalables.

La concentration de l'ATC, adoptée dans le cas de tissus chlorophylliens et radiculaires de Cotonnier est de 8 %. Une concentration supérieure de l'ordre de 12 à 15 % par exemple, risquerait d'entraîner dans la fraction soluble, une partie des ribonucléotides.

Une concentration plus faible, de l'ordre de 5 %, peut aboutir à un entraînement incomplet des composants acido-solubles.

L'extraction est opérée sur des fractions de 500 mg de poudre végétale, lyophilisée, que l'on introduit dans de petites capsules de porcelaine, en présence de 20 ml environ d'ATC à 8 %, moulu. L'ensemble est conservé à 0-4°C pendant une heure, et remué de temps à autre. Le contenu des capsules est ensuite transféré quantitativement dans des tubes de centrifugeur, en utilisant de petits volumes d'ATC à 8 %, froid. Centrifuger puis traiter par deux fois les résidus par de l'ATC à 8 % dans les mêmes conditions.

Les surnatants sont réunis, puis l'on amène à un volume déterminé (50 ou 100 ml) avec de l'ATC de même concentration.

Le résidu est conservé pour la détermination du phosphore lipidique (cf. paragraphe "phosphore lipidique").

2. SEPARATION DE LA FRACTION ACIDO-SOLUBLE TOTALE APRES DIGESTION.

Prélever une partie aliquote (5 à 15 ml) de l'extrait trichloracétique dans un matras contenant une bille de verre. Couvrir d'un petit entonnoir. Ajouter 1 ml d'acide sulfurique.

Digestion : Chauffer très lentement pour évaporer la plus grande partie possible de l'Acide trichloracétique : la matière organique se consume. Le chauffer jusqu'à obtention d'une solution homogène et poursuivre l'opération jusqu'à ce que la solution prenne une coloration légèrement plus claire. Ajouter alors, avec précaution, une goutte d'acide nitrique, de sorte qu'elle coule le long de la paroi du matras. Continuer à chauffer en évitant continuellement une surchauffe. Ajouter une nouvelle goutte de NO_3H . Chauffer doucement jusqu'à ce que le liquide soit décoloré ou qu'il présente seulement une teinte jaune paille. Poursuivre le chauffage une minute encore. Refroidir. Ajouter un peu d'eau distillée et porter à ébullition 2 ou 3 minutes pour chasser les vapeurs. Transvaser en fiole de 25 ml et amener à ce volume en rinçant le matras avec de l'eau distillée.

3. DOSAGE DU PHOSPHORE ACIDO-SOLUBLE
METHODE GENERALE DE DOSAGE

a. R é a c t i f s

1. Mélange Alcool-Benzène.

Mélanger au moment de l'emploi des volumes égaux d'Alcool isobutylique et de Benzène, pour analyses.

2. Solution Molybdique.

Dissoudre 50 g de molybdate d'ammonium dans 400 ml d'acide sulfurique à 10 N. Amener à 1 litre avec de l'eau distillée. Garder en bouteille paraffinée. Préparer au moment de l'emploi.

3. Solution de Chlorure stanneux.

Dissoudre 10 g de $\text{Sn Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 25 ml de HCl concentré et garder dans un flacon brun. A partir de cette solution, préparer au moment de l'emploi une solution diluée en amenant 1 ml à 200 ml avec du $\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}$. Ce réactif ne reste pas stable plus d'un jour.

4. Mélange Acide sulfurique-Ethanol.

Mélanger à 980 ml d'ethanol à 99,5 % et 20 ml de SO_4H_2 concentré (vérifier la réaction par rapport à la stabilité de la couleur bleue du molybdate. L'instabilité peut être due à quelque contamination de l'alcool. Il faut alors essayer de modifier la quantité d'alcool ou refaire le mélange).

5. Réactif Silico-tungstique.

Il est utilisé pour la défécation dans le dosage du phosphore minéral libre.

Dissoudre 5,7 g de silicate de sodium $9 \text{ H}_2\text{O}$, et 79,4 g de tungstate de sodium $2 \text{ H}_2\text{O}$, dans 500 ml d'eau distillée. Ajouter 15 ml de SO_4H_2 concentré. Faire bouillir pendant 5 heures. Refroidir et amener à 1 litre.

6. Solution-étalon de P.

Préparer une solution-étalon à 1 mg de P/ml à partir de $\text{PO}_4 \text{ H}_2\text{K}$ (séché à 110° C) pour analyses (4,3936 g x facteur de pureté, amené à 1 litre).

b. M é t h o d e

Le dosage est effectué sur une partie aliquote de l'extrait trichloracétique, après digestion.

Dans les conditions de concentrations indiquées plus haut (soit 500mg de matière végétale lyophilisée ramenée à 100 ml dont 15 ml subissent la digestion et sont ensuite ramenés à 25 ml), on prélève 1 ml que l'on introduit dans un tube à essais de 25 x 200 mm. Ajouter de l'eau distillée pour un volume de 15 ml, puis 25 ml exactement mesurés de la solution Alcool-Benzène (1). Mettre ensuite 5 ml de Réactif molybdique (2). Boucher et agiter aussitôt vigoureusement 30 secondes. Laisser les deux phases liquides se séparer. Préparer dans un bécher 15 ml du mélange Acide sulfurique-Ethanol (4). Pipeter dans les tubes 10 ml de la phase supérieure organique et les

introduire dans une fiole de 25 ml. Ajouter avec la même pipette qui se trouve ainsi rincée, 10 ml du mélange acide sulfurique-éthanol, puis 1 ml de la solution diluée de Chlorure stanneux (3). Ajuster les fioles à 25 ml avec le mélange Acide sulfurique-Ethanol. La coloration bleue obtenue est stable plusieurs heures. Attendre une dizaine de minutes pour colorimétrer à 700 m μ (filtre rouge - cellule 90 R pour le photomètre Eppendorf). Faire un blanc. Régler le zéro à partir du mélange Alcool-Acide sulfurique.

Calcul :

$$\frac{\text{mg P/ml} \times 25 \times 100}{\text{prise} \times 0,5} = \text{mg P acido-soluble/g de matière sèche}$$

Calculer la concentration en P en se rapportant à une solution-étalon de P (6) dont on détermine les densités optiques pour quelques points de gamme .

4. DOSAGE DES FRACTIONS DE L'ENSEMBLE ACIDO-SOLUBLE.

. Phosphore minéral

Le phosphore minéral libre est déterminé à partir de l'extrait trichloracétique, sur une partie aliquote de l'ordre de 1 ml pour les conditions de dilution indiquées plus haut. Le dosage s'effectue directement sans digestion suivant la méthode indiquée P.5.

Le réactif silico-tungstique intervient éventuellement pour la précipitation des protéines, si le milieu en comporte de façon notable. On l'introduit alors, après l'addition du mélange alcool isobutylique-Benzène. Puis on poursuit par l'addition du réactif molybdique, etc ...

. Phosphore phytique

a. R é a c t i f s

1. Solution de chlorure ferrique.

Dissoudre 15 g de $Fe Cl_3 \cdot 6H_2O$ dans de l'HCl normal. Amener à 1 litre avec HCl N.

2. ClH, 0,6 % comportant du sulfate de sodium.

Dissoudre 100 g de sulfate de sodium anhydre dans environ 500 ml d'eau. Ajouter 14,5 ml de HCl concentré. Amener à 1 litre avec de l'eau distillée.

3. Na OH N/10.

4. Na OH N.

5. Phénolphtaléine.

Solution à 1 % dans l'éthanol à 95%.

b. Méthode de dosage

Une partie de l'extrait acido-soluble dans ATC est neutralisée par de la soude N/10 en utilisant la phénolphthaléine comme indicateur et ensuite légèrement acidifiée. On amène à 50 ml avec de l'eau distillée.

Introduire une prise de 20 ml de cet extrait dans des tubes centrifuges de 50 ml. Ajouter 5 ml de la solution de chlorure ferrique, en faisant tourner le tube pendant l'opération.

Disposer les tubes dans un bain-marie bouillant avec un petit agitateur. Chauffer 15 minutes en agitant de temps en temps pour aider la floculation du Phytate ferrique. Refroidir ensuite les tubes environ 20 minutes et rincer les agitateurs avec un peu de HCl à 0,6 %.

Centrifuger 20 minutes à une vitesse supérieure à 2000 tours/minute. Jeter le liquide surnageant et laver le précipité à la pipette avec 5 cc d'HCl à 0,6 % versés à la pipette, pour le remettre en suspension. Rincer les parois du tube avec 2 cc d'HCl à 0,6 %. Centrifuger 20 minutes à nouveau et décanter le surnageant.

Mettre le précipité en suspension dans 5 ml d'eau bouillante. Ajouter 2 ml de NaOH et chauffer 15 minutes au bain-marie bouillant, en agitant de temps en temps. Filtrer la solution encore chaude sur filtre sans cendre dans un ballon de 100 ml.

Laver le tube plusieurs fois avec quelques ml d'eau distillée bouillante et verser les eaux de lavage sur le filtre.

Le phosphore sera dosé sur une partie aliquote de cette solution, après la digestion indiquée page 4.

. Nucléotides et non nucléotides solubles.

a. R é a c t i f s

KOH 5 N.

Diéthyléther ($\text{CH}_3 \text{ CH}_2 \text{ OCH}_2 \text{ CH}_3$).

Acide formique 4 N.

Solution de formiate d'ammonium 0,8 M.

Dowex 1 x 4 (formiate).

b. M é t h o d e d e d o s a g e

Il est préférable pour utiliser cette méthode de travailler sur des solutions extraites par l'acide perchlorique, de préférence à des solutions extraites par l'acide trichloracétique.

L'extrait acide est purifié par trois extractions successives au diéthyléther à raison de 5 volumes d'éther pour un volume d'extrait. Il est ensuite neutralisé par KOH 5 N puis concentré sous pression réduite à 35° C.

Après refroidissement, l'acide perchlorique est séparé par centrifugation et le surnageant est passé sur une colonne de résine Dowex 1 x 4.

Les dimensions optimum pour la colonne sont les suivantes : hauteur : 10 cm - diamètre 1 cm.

Laver la colonne à l'eau pour éluer les nucléotides avec 70 ml d'acide formique contenant du formiate d' NH_4 (0,8 M).

Le calcul de la teneur du liquide d'élution en nucléotides

solubles indiqué par INGLE J. (Plant Physiology, 1964, vol. 39, n° 5, pp. 735-740) correspond à la formule : densité optique à 260 m μ x 14.

. Fraction acido-soluble labile

Cette fraction est généralement rapportée, à partir de l'ensemble acido-soluble, à la quantité de Phosphore dosée après une hydrolyse de 7 minutes, dont on soustrait la quantité de Phosphore minéral déterminée selon la méthode indiquée ci-dessus.

La quantité P (₇ minutes) - P minéral = P labile, permet d'estimer le Phosphore ayant pour origine le groupement phosphorique terminal de la Carboxylase et ceux des nucléosides di et triphosphate.

D o s a g e

Prélever dans un tube une partie aliquote de l'extrait soluble dans l'acide trichloracétique. Ajouter une quantité égale de HCl 2N et chauffer au bain-marie à 100° de sorte que le liquide soit à ébullition exactement 7 minutes.

Doser ensuite le Phosphore suivant la méthode indiquée p.5.

B. D E T E R M I N A T I O N
D U P H O S P H O R E L I P I D I Q U E

a. R é a c t i f s.

Ethanol à 95°.

Mélange méthanol-chloroforme 1-1 en volume.

Mélange éthanol-éther éthylique 2-1 en volume.

b. M é t h o d e.

Le résidu demeurant après l'élimination de l'acide trichloracétique qui comporte les fractions solubles, est transféré dans un tube centrifugeur avec 15 ml environ d'alcool éthylique à 95°.

Bien mélanger et laisser reposer environ 30 minutes puis centrifuger. Décanter le liquide surnageant sur une fiole à distiller, en prenant soin de n'entraîner aucune particule du culot. Ajouter environ 15 ml d'alcool éthylique à 95° et faire bouillir avec précaution 30 secondes dans un bain-marie. Centrifuger une nouvelle fois. Réunir les surnageants. Répéter l'extraction avec le mélange d'éthanol-éther, 30 secondes, puis avec le mélange de méthanol-chloroforme, 30 secondes. Réunir tous les surnageants. Distiller les solvants, puis entraîner la matière grasse restant, dans un matras avec un peu d'alcool à 95°. Eliminer la plus grande partie de l'alcool, par ébullition, sous hotte. Laver le résidu avec l'éther et sécher sous vide ou à l'air pour obtenir une poudre sèche sur laquelle on pourra prélever des quantités exactement pesées.

Effectuer une digestion suivant la méthode ci-après.

Digestion - Méthode générale.

Cette méthode est valable pour la détermination du Phosphore lipidique et pour celle du Phosphore total.

1. Introduire une bille de verre dans le matras contenant une quantité d'échantillon connue. Couvrir avec un petit entonnoir.

2. Ajouter 3 ml d'acide sulfurique. Chauffer avec précaution jusqu'à ce que la matière organique se consume, et que l'on obtienne une solution homogène. Continuer le chauffage jusqu'à ce que la solution homogène prenne une coloration légèrement plus claire.

3. Faire tomber sur le liquide en ébullition, une goutte d'acide nitrique.

4. Continuer à chauffer et ajouter, dès que les vapeurs blanches apparaissent, une nouvelle goutte de NO_3H .

5. Poursuivre l'oxydation progressive jusqu'à ce que le mélange de digestion prenne une teinte paille clair. Chauffer jusqu'à ce qu'il devienne presque incolore. Laisser refroidir. Le liquide devient incolore au cours du refroidissement.

6. Laver l'ouverture du matras avec un jet d'eau distillée sur l'entonnoir.

7. Reprendre l'ébullition 3 minutes de plus pour éliminer toutes traces de NO_3H .

8. Transférer après refroidissement, quantitativement en fiole jaugée de 25 ou 50 ml. Ajuster le niveau avec de l'eau distillée. Le dosage du Phosphore est réalisé suivant la méthode indiquée p. 5.

B I B L I O G R A P H I E

1. MARTIN, J.B., DOTY, D.M. - 1949.- Determination of inorganic Phosphate. *Analyt. Chemistry*, vol. 21, pp. 965-967.
2. PONS et al - 1953.- *AOAC Jour.*, vol. 36, n° 2.
3. INGLE, J., BEEVERS, L., HAGEMAN, R.H. - 1964.- *Plant Physiol.*, vol. 39, n° 5.

C. D E T E R M I N A T I O N
D U P H O S P H O R E N U C L E I Q U E

1. DETERMINATION DE L'ADN.

. Méthode de dosage par la Diphenylamine.

a. R é a c t i f s.

Diphénylamine.

Acide acétique redistillé.

Acide sulfurique concentré.

Acétaldéhyde - solution à 16 mg/litre.

Acide perchlorique à 5 %.

Soude 0.005 M.

Acide désoxyribonucléique (thymus de veau - provenance :
Mann Research Lab. inc.).

b. M é t h o d e.

Préparation de l'extrait.

Le résidu sec (II) demeurant, après l'extraction du Phosphore lipidique, est traité pendant deux périodes de 20 minutes chacune, à 70° C par de l'Acide perchlorique à 5 %. Conserver le résidu pour la détermination du Phosphore protéique.

Préparation du réactif.

Dissoudre 1,5 g de diphénylamine dans 100 ml d'acide acétique redistillé. Ajouter 1,5 ml d'acide sulfurique concentré et garder à l'obscurité.

Le réactif ne doit pas prendre une teinte bleue en reposant.

Avant l'utilisation, ajouter 0,1 ml d'acétaldehyde pour 20 ml de réactif utilisé. Mélanger 2 ml de l'extrait-acide perchlorique avec 4 ml de réactif à la diphénylamine et laisser reposer en étuve à 30° pendant 16 à 20 heures.

Effectuer une mesure de densité optique à 600 m^μ et comparer aux valeurs obtenues pour une gamme étalon. Faire un blanc.

Préparation des standards.

La solution-mère est préparée en dissolvant l'ADN dans de la soude 0,005 M, et conservé au réfrigérateur (sol. à 0,4mg d'ADN/ml).

Les standards sont obtenus en mélangeant volume à volume la solution-mère ADN et de l'acide perchlorique à 10 %, le mélange est chauffé à 70° C pendant environ 40 minutes. La conservation des standards se fait en réfrigérateur.

La gamme étalon est préparée par dilution de la solution standard avec de l'Acide perchlorique à 5 %.

. Méthode à la p-Nitrophénylhydrazine.

a. R é a c t i f s.

p-Nitrophénylhydrazine - solution à 0,5 % dans l'éthanol.
Acide trichloracétique à 5 %.
Acétate de Butyle N.
Soude 2 N.
Acide désoxyribonucléique (thymus de veau - provenance :
Mann Research Lab. inc.).

b. Méthode.

On effectue le dosage sur une partie de poids connu du résidu sec demeurant après l'extraction du Phosphore lipidique.

On opère l'hydrolyse dans des tubes centrifuges coniques de 15 ml en présence de 3 ml d'Acide trichloracétique à 5 %. L'orifice du tube est bouché par un pantin afin de limiter le plus possible les pertes par évaporation.

La suspension est chauffée pendant 30 minutes au bain-marie à 90-100°. Après refroidissement, ajouter à nouveau 3 ml d'Acide trichloracétique à 5 % et centrifuger. Le culot sera conservé pour la détermination du Phosphore protéique.

Prélever 2 ml du liquide d'hydrolyse dans un tube de centrifugeur de 15 ml. Effectuer la même opération avec 2 ml de la solution standard d'ADN contenant 100 μ g d'ADN que l'on aura hydrolysé dans les mêmes conditions. (Préparer simultanément un blanc avec 4 ml d'ATC à 5 %.) À chacun des tubes, ajouter 2 ml d'acide trichloracétique à 5 % et 0,2 ml du réactif à la p-Nitrophénylhydrazine à 0,5 %, fraîchement préparé. Chauffer au bain-marie à 90-100°, en prenant soin de limiter l'évaporation, pendant 15 minutes. Après refroidissement, ajouter 10 ml d'Acétate de Butyle N dans chaque tube.

Boucher les tubes et les agiter 5 minutes, puis centrifuger pour achever la séparation des couches organiques et aqueuses. Retirer la plus grande partie de la couche organique. Pipeter ensuite 3 ml de la phase aqueuse dans une fiole jaugée de 5 ml bouchée en verre. Vérifier qu'aucune gouttelette organique n'a été entraînée. Ajouter alors, juste avant de colorimétrer, 1 ml de NaOH 2N et compléter à volume avec de l'eau distillée et agiter.

La couleur développée par l'addition de NaOH pâlit très rapidement, si bien que la lecture doit être faite dans la minute qui suit cette addition. Les densités optiques sont mesurées à 560 m μ avec un blanc d'eau distillée. Colorimétrer les standards exactement dans les mêmes conditions. (Note 1)

Préparation des solutions standards d'ADN.

Mettre dans une fiole jaugée de 50 ml, 25 mg d'ADN (Thymus de veau). Ajouter 40 ml d'Acide trichloracétique à 5 %. Couvrir et chauffer pendant 30 minutes dans un bain-marie à 90-100°. Refroidir puis amener à volume avec de l'ATC à 5 %. Des standards de concentration plus basse sont préparés par la dilution appropriée de la solution avec de l'ATC à 5 %. (Note 2)

N o t e 2 : Si la dissolution de l'ADN dans l'acide trichloracétique à 5 % n'est pas totale, on peut opérer une solution préalable dans la soude 0,005 M. A partir de cette solution, les gammes sont établies par une dilution convenable. On ajoute alors à un volume choisi de solution-mère, un volume égal d'ATC à 10 % et on chauffe 30 minutes à 90-100°.

N o t e 1 : Le temps requis pour chaque mesure à 560 m μ doit être déterminé avec précision et être toujours le même, y compris pour les standards.

B I B L I O G R A P H I E

4. BURTON, K. - 1956.- A study of the condition and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid. Bioch. J. 62, pp. 315-323.
5. WEBB, J.M., LEVY, H.B. - 1955.- A sensitive method for the determination of desoxyribonucleic acid in tissues and microorganisms. J. Biol. Chem. 213, pp. 107-117.

2. DETERMINATION DE L'ARN

Si la méthode décrite ici ne présente pas la précision de celle consistant à chromatographier les nucléotides après hydrolyse, puis à mesurer leur densité optique à 260 m μ , elle est susceptible d'être toutefois commodément utilisée dans des déterminations de routine. Il est nécessaire de disposer d'un spectrophotomètre à ultra-violet, pour des mesures de densité optique à 260 m μ .

. Dosage par spectrophotométrie dans l'ultra-violet.

a. R é a c t i f s.

KOH 0,3 N.

Cl₂ Mg 0,006 M.

Ethanol à 95 %.

Na Cl 0,01 M.

Solution HCl-NaCl-tampon (5,6 g NaCl + 20 ml HCl conc. pour 240 ml d'eau distillée).

b. M é t h o d e.

Déposer 20 mg de l'extrait sec (Résidu II) dans un tube de centrifugeur avec 1 ml de KOH 0,3 N. Laisser reposer pendant 18 heures à l'étuve à 37° C puis refroidir le tube dans de l'eau glacée. Ajouter ensuite la solution de Cl₂ Mg jusqu'à une concentration en Mg égale à 10⁻³M.

Acidifier avec de l'acide perchlorique dilué jusqu'à approximativement pH 2. Ajouter un volume d'éthanol à 95°.

Laisser le mélange reposer 20 minutes à 0° puis centrifuger et décantier en conservant le surnageant. Laver le résidu avec de l'acide perchlorique à 1 %, glacé, et joindre le liquide de rinçage au surnageant. Jeter le résidu qui contient des protéines et de l'ADN. Ajuster le liquide à pH 8 avec la solution de Potasse diluée, jusqu'à formation d'un précipité qu'on sépare par centrifugation. Conserver le surnageant. Laver la précipité à l'eau froide. Joindre les rinçages au surnageant.

c. P r é p a r a t i o n d e l a r é s i n e
é c h a n g e u s e d ' i o n s

Réactifs.

Résine DOWEX 1 x 10 forme Cl^- - 200 - 400 mesh.

Colonne de 5 cm de longueur sur 0,5 cm.²

HCl N

NaOH ou NH_4OH N

Traitement.

La résine doit être traitée successivement par de l'HCl N, de l'eau distillée, de la NaOH ou de l' NH_4OH N, puis à nouveau de l'eau distillée. La résine ne doit rester que quelques instants au contact de l'HCl et de l' NH_4OH , tandis que les rinçages intermédiaires à l'eau doivent être plus prolongés et évacués avec précaution. Traiter à nouveau la résine par l'HCl N en l'agitant quelques secondes dans l'acide.

Dès que la sédimentation s'opère décantier le liquide qui entraîne les plus fines particules. Répéter plusieurs fois le lavage à l'eau distillée. Décantier.

Remettre à nouveau la résine en suspension dans l'eau et la laisser se stabiliser, par gravité. Evacuer l'eau avec précaution. Renouveler le traitement une seconde fois. Le rinçage final doit fournir un liquide neutre. Ajouter de la résine jusqu'à ce que la colonne atteigne la hauteur désirée.

d. D o s a g e .

Faire passer le liquide surnageant résultant des centrifugations, sur la résine où les nucléotides seront retenus.

Ajouter une solution de NaCl 0,01 M pour laver la colonne et jeter. Eluer les nucléotides par la solution NaCl - HCl. Prélever 40 ml d'éluat, puis des fractions successives de 5 ml jusqu'à ce que la D.O. soit nulle à 260 $m\mu$. Le blanc est mesuré sur la solution HCl - NaCl.

La teneur en ARN est estimée sur la base d'une structure tétranucléotide théorique.

$$D.O. (\text{à } 260 \text{ m}\mu) \times 32 = \% \text{ ARN/ml}$$

. Dosage de ARN par la détermination du Ribose.

Ces méthodes de dosage peuvent conduire à des résultats inexacts dans le cas où le processus de purification ne serait pas complet.

I è r e m é t h o d e

Réactif : Solution d'Orcinol à 0,4 % dans HCl 12 N comportant 0,04 % de Cl_3Fe .

Dosage : Mettre dans un tube à essais une prise de 0,2 ml de la solution à doser, dans 1 ml d'eau distillée. Ajouter 2 ml de la solution d'Orcinol, fraîchement préparée.
Agiter les tubes, les couvrir puis les laisser sur un bain-marie bouillant pendant 15 minutes. Les retirer et attendre 7 à 8 minutes avant de lire les densités optiques à 660 $m\mu$. Faire un blanc. Etalonner par les solutions standards (voir page suivante : 24).

2 è m e m é t h o d e

Réactif :

Composition des constituants

- (1) Solution aqueuse d'Orcinol à 1 % (à conserver au réfrigérateur).
- (2) HCl concentré.
- (3) Solution aqueuse de $\text{FeCl}_3, 6 \text{H}_2\text{O}$ à 10 %.

Préparation du réactif

Mélanger : 10 ml de (1).
 40 ml de (2).
 1 ml de (3).

Dosage :

A une prise de 0,2 ml de la solution à doser, ajouter 2 ml de réactif, dans des tubes à essais. Agiter, couvrir puis chauffer 8 minutes environ au bain-marie bouillant.

Laisser refroidir puis lire les densités optiques (filtre rouge). Comparer à des standards préparés comme il est indiqué ci-après.

Préparation des standards : Purification de l'ARN de levure.

On peut utiliser comme standard le d. Ribose ou l'ARN de levure (provenance : British Drughouse distribué par SEFLABO).

La levure est alors purifiée de la façon suivante :

Mettre en suspension 10 g d'ARN de levure dans 50 ml d'eau distillée. Refroidir dans un bain glacé jusqu'à environ 2°.

Ajouter lentement une solution de NaOH 5 N, jusqu'à clarification du liquide.

Veiller à ce que le mélange demeure froid et à ce que le pH ne dépasse pas 6.

Mesurer le volume, puis lui ajouter 5 fois sa valeur d'acide acétique glacial. Laisser reposer une dizaine de minutes à la température ambiante.

La levure reprecipitée par l'acide acétique est filtrée sous vide, puis lavée 2 à 3 fois à l'eau et 3 à 4 fois à l'alcool à 95°. Le précipité est remis en suspension, puis à nouveau filtré et traité une seconde fois et finalement rincé à l'éther.

Le laisser sécher ensuite à l'air.

L'hydrolyse est opérée sur cette poudre, dans des conditions identiques à celles indiquées pour l'échantillon.

On peut vérifier le coefficient de pureté de l'ARN de levure par une détermination du ribose, en utilisant pour standard du d-ribose pur. La proportion théorique de d-ribose réagissant à l'orcinol, à partir de l'ARN de levure est théoriquement d'environ 23,4 % (il s'agit essentiellement des Pentoses-purines nucléotides, soit environ la moitié des Pentoses totaux car les Pentoses-pyrimidiques nucléotides ne donnent pas de réaction à l'orcinol.)

Le calcul du pourcentage d'ARN donne :

$$\% \text{ ARN} = \frac{\text{quantité de ribose retrouvée après la purification}}{23,4} \times 100$$

Calcul du P-ARN et du P-DNA.

Le phosphore nucléique est calculé d'après les proportions théoriques de P dans chacun des acides nucléiques, soit 9,2 % dans l'ADN et 9 % dans l'ARN.

B I B L I O G R A P H I E

6. COHEN, W. - 1950.- J. Amer. Chem. Soc. 72, 1471.
7. DIENER, T.O., LASHEEN, A.M. - 1960.- The determination of nucleic Acid content and composition of fruit tree and other plant leaves. Soc. for Horticultural Science, vol. 75, pp. 195-206.
8. HURLBERT, R.B., SCHMITZ, H., BRUMM, A.F., POTTER, V.R.- 1954.- Nucleotide metabolism. J. Biol. Chem. 204, 23-39.
9. INGLE, J. - 1963.- The extraction and estimation of nucleotides and nucleic acids from plant material. Phytochemistry, Vol. a, pp. 353-370.
10. KUNITZ, M. - 1940.- J. Gen. Physiol. 24, P.31.
11. MARKHAM, R. - 1955.- Nucleic Acids. Modern methods of plant analysis. Vol. IV, P 291.
12. SMILLIE, R.M., KROTKOV, G. - 1960.- The estimation of nucleic Acids in some Algae and higher plants. Can. J. Botany, Vol. 38.
13. WEBB, J.M. - 1956.- A sensitive method for the determination of Ribonucleic acid in tissues and microorganisms. J. Biol. Chim. 221, 635-649.

I. PHOSPHORE PROTEIQUE

Le résidu demeurant après l'extraction des acides nucléiques est traité par NaOH N, pendant 30 minutes à 100° pour extraire les protéines.

. On peut déterminer sur l'extrait alcalin l'Azote total par Kjehldahl et en déduire la teneur en protéines d'après la formule :

$$\text{teneur en protéines} = \text{Azote total} \times 6,25$$

. On peut également, sur l'extrait alcalin, effectuer une colorimétrie, en utilisant le réactif au Phénol de Folin.

. On peut enfin réaliser le dosage de P sur l'extrait, après digestion (voir pages 4 et 5).

. Le traitement à la soude peut, dans certains cas, ne pas donner une extraction quantitative. On peut alors être amené à effectuer sur le résidu une minéralisation, puis le dosage du Phosphore (voir digestion p. 13 et dosage p. 5). Le dosage de l'Azote protéique peut être également fait sur une partie du résidu.

Le dosage du Phosphore total est réalisé sur la poudre végétale lyophilisée, après digestion, soit suivant la méthode indiquée ci-dessus page 5, soit selon la méthode colorimétrique au vanado-molybdate.

B I B L I O G R A P H I E

14. DIDIER DE SAINT-AMAND, J., CAS, G. - 1966.- Dosage des éléments majeurs chez les végétaux. Methodes utilisées au Laboratoire de Diagnostic Foliaire de l'ORSTOM. ORSTOM Bondy, 40 p. multig.
15. FISKE, CH., SUBBAROW, Y. - 1925.- The colorimetric determination of Phosphorous. Journal of Biochemistry, vol. 66, p. 375.
16. LOURY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FAIR, A.L., RANDALL, R.J. - 1951.- Protein measurement with Folin-phenol reagent. J. Biol.Chem., 193, pp. 265-275.