

# Dosage de l'azote et validité des résultats

Autor(en): **Collet, Gérald**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **73 (1963)**

PDF erstellt am: **20.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-51563>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# Dosage de l'azote et validité des résultats

Par *Gérald Collet*

Laboratoire de Physiologie végétale  
(Université de Lausanne)

Manuscrit reçu le 14 mai 1963

## Avant-propos

Au cours de l'analyse biochimique d'un matériel biologique certaines précautions doivent être prises, sous peine d'obtenir des résultats ne correspondant plus aux caractéristiques du matériel vivant. En particulier pour le dosage des composés azotés, des conditions très strictes seront établies depuis l'instant de la récolte du matériel jusqu'au moment où les éléments recherchés sont définitivement stabilisés.

Divers chercheurs, soucieux de ce problème, ont reconnu les inconvénients et les avantages de la dessiccation du matériel biologique, et plus précisément de chaque méthode de séchage (Moyse, 1946, 1950; Albaum, 1952; Benson, 1955). En ce qui concerne les composés azotés, Pucher et coll. (1935) constatent une perte de 20 % dans la teneur en azote de la glutamine séchée pendant deux heures et demie à la température de 85°–86 °C. Vickery et coll. (1935) proposent alors un séchage pendant 90 min dans un courant d'air, à la température de 68°–69 °C. Une température supérieure à 100 °C est évidemment à proscrire (Moyse, 1946). Indépendamment de cette perte en azote sous forme d' $\text{NH}_3$  en milieu basique et provenant d'acides aminés (spécialement la glutamine), Reifer et Melville (1949) notent que l'azote peut quitter directement les acides aminés libres ou faisant partie des protéines, sans qu'il y ait nécessairement destruction du squelette carboné.

Lorsqu'il s'agit de déterminer séparément les teneurs en azote protéinique et en azote soluble, il faut veiller à ce qu'aucun système enzymatique n'entraîne de protéolyse, ce qui fausserait l'indice protéolytique (Collet, 1962). Champigny (1960) élude le problème en déterminant le poids sec après un séchage à 80 °C d'une partie de son matériel, tandis qu'elle fixe par le méthanol (90 %) bouillant pendant 15 min le matériel qui lui servira à déterminer les divers types d'azote. Cette technique exige beaucoup de matériel, ce qui n'est pas toujours possible lorsqu'on utilise certains tests biologiques, comme par exemple les tests « racines » (Pilet, 1958; Pilet, Kobr et Siegenthaler, 1960), les tests « tiges » (Pilet et Collet, 1959),

les tests «coléoptiles» (Pilet et Dubouchet, 1962), etc. D'autre part il peut être utile de stocker le matériel avant de l'analyser.

Nous nous proposons dans cette étude de comparer la valeur de trois méthodes de dessiccation.

### Matériel et méthode

Nous avons utilisés des racines entières de haricot et de lentille de divers âges physiologiques et cultivées à l'obscurité, ainsi que des segments de tige de haricot provenant de plantules cultivées à la lumière. Des dosages antérieurs d'azote (Collet, 1962) effectués sur des cotylédons ont montré des résultats identiques à ceux présentés plus bas.

Trois techniques de séchage sont employées :

#### 1. *La lyophilisation (L)*

Sitôt le matériel coupé, il est refroidi dans des tubes métalliques qui serviront à la lyophilisation et qui baignent dans de l'alcool à  $-50^{\circ}\text{C}$ . Ces tubes sont maintenus dans un support adéquat et contenus dans un vase Dewar. Lorsque la température s'élève au-dessus de  $-33^{\circ}\text{C}$ , on renouvelle la source de froid. La congélation immédiate bloque toute réaction métabolique. Une fois les segments congelés, ils sont pesés (détermination du poids frais PF) et lyophilisés pendant 12 h. On détermine alors le poids sec (PS) et la teneur en eau rapportée au PF (TE r). Cette dernière valeur est un contrôle du degré de dessiccation du matériel biologique.

#### 2. *Le séchage à l'étuve (E)*

Le matériel est récolté rapidement et distribué dans des flacons à peser. La détermination du PF se fait immédiatement après la récolte, puis les flacons sont disposés ouverts dans une étuve dont la température varie entre  $65$  et  $70^{\circ}\text{C}$ . Il est important de ne pas dépasser cette température de  $70^{\circ}\text{C}$  pour éviter des pertes importantes d'azote soluble. Après 48 h, le séchage est achevé (PS et TE r).

#### 3. *Le séchage au dessiccateur à vide (V)*

La troisième méthode de séchage comprend une période de 60 min à l'étuve à  $80^{\circ}\text{C}$  sitôt le matériel récolté et pesé, suivie d'un stage d'au moins 72 h au dessiccateur à vide (Moïse, 1946).

Dans les trois cas, le matériel peut être conservé dans un excicateur contenant du  $\text{CaCl}_2$  et de l'azote à basse pression.

*Analyse de l'azote protéinique (Np) et de l'azote soluble (Ns)*

Après broyage du matériel sec et séparation de l'azote protéinique (Np) et de l'azote soluble (Ns) par l'acide trichloracétique à 10% (30 min à 45 °C, puis une nuit à la température du laboratoire), nous minéralisons les composés quaternaires dans des matras de Kjeldahl jusqu'à complète décoloration (catalyseur au Se et CuSO<sub>4</sub>), puis nous distillons l'NH<sub>3</sub> formé au moyen de l'appareil de Parnas-Wagner (Collet, 1962; Siegenthaler, 1963).

Au cours de ces essais, pour faciliter la comparaison, lorsque les TE<sub>r</sub> des lots homologues mais séchés différemment sont trop dissemblables, nous avons corrigé le PS des tissus lyophilisés par rapport à celui des tissus séchés à l'étuve (v. tableau).

Tableau

Rôle de la technique de séchage de racines du *Phaseolus* et du *Lens* (lyophilisation (L) et étuve (E) réglée à 65°-70 °C) dans la conservation des teneurs en azote ( $\gamma$ ) rapportées à trois critères de référence: l'unité individuelle (seg) et les unités pondérales (PF et PS)

	Phaseolus						Lens	
	L	E	L	E	L	E	L	E
Nombre	20	20	76	72	36	35	120	160
Lg mm	10	10	27	27	40	40	20	20
PF/seg	31,1	27,3	80,3	86,5	78,4	89,2	12,6	12,4
PS/seg	6,7	5,6	11,5	11,4	9,7	9,4	2,1	2,0
TE <sub>r</sub>	78,4	78,3	80,1	86,1	85,6	86,8	82,4	83,7
$\gamma$ Np/seg	240,3	198,2	306,3	293,2	242,0	234,2	48,1	42,6
$\gamma$ Np/PF	77,3	72,6	38,2	33,9	30,9	26,4	38,2	34,4
$\gamma$ Np/PS	358,6	336,0	286,3	257,2	288,1	249,1	229,1	212,1
$\gamma$ Ns/seg	147,9	161,9	294,8	342,6	224,5	251,9	83,9	86,8
$\gamma$ Ns/PF	47,6	59,3	36,5	39,6	28,6	28,3	66,6	70,0
$\gamma$ Ns/PS	220,8	274,4	275,5	300,6	267,2	268,0	399,4	431,8
Ns/Np	0,6	0,8	0,9	1,1	0,9	1,0	1,7	2,0
$\gamma$ N/seg	388,2	360,1	601,1	635,8	466,5	486,1	132,0	129,4
$\gamma$ N/PF	124,8	131,9	74,9	73,5	59,5	54,6	104,8	104,4
$\gamma$ N/PS	579,4	610,4	561,8	557,9	555,3	517,1	628,5	643,9

## Résultats

Des essais préliminaires réalisés sur les parties proximales et distales des cotylédons de haricot montrent que la troisième technique de séchage, outre sa plus longue durée, provoque de trop grandes variations des teneurs en Np et en Ns par rapport à celles obtenues après lyophilisation.

Ainsi pour l'Np (respectivement pour l'Ns) rapporté au PS de la zone proximale, nous avons les variations suivantes exprimées en pour-cent par rapport aux résultats de la lyophilisation :

E/L	V/L
—22 % (+6 %)	—51 % (+22 %)

Quelques substances pures (Alanine, Ac. glutamique, Arginine, Asparagine) ont subi les mêmes traitements et le dosage de l'azote restant confirme pleinement ces résultats. Aussi pour les tissus radiculaires et caulinaires, nous abandonnons la technique de séchage dans un dessiccateur à vide après fixation à 80 °C pendant 60 min.

Les deux autres méthodes de séchage fournissent les résultats reportés dans le tableau et la figure.

Le tableau permet de relever les faits suivants sur les racines du *Lens*.

1. De manière générale, les tissus lyophilisés (L) présentent une teneur plus élevée en Np et une teneur plus basse en Ns que ceux séchés à l'étuve (E).

2. La teneur en azote total (N) rapporté au poids frais ou au poids sec est équivalente, aux erreurs d'expériences près, pour les deux modes de séchage (L et E). En d'autres termes, le manque d'Np en E correspond au surplus d'Ns.

Une conséquence importante de ces variations est la dépendance de l'indice protéolytique (Ns/Np; Collet, 1962) des conditions de séchage.

En conclusion, il est évident que le surplus d'Ns provient de la transformation de l'Np. En considérant les conditions mêmes de la récolte et du séchage, il n'est pas exclu que cette transformation soit de nature enzymatique.

Sur des racines de *Phaseolus*, nous retrouvons les mêmes faits et conclusions. Nous pouvons dire par conséquent, que pour un même âge physiologique (déterminé par des considérations biométriques, physiologiques et anatomiques; Pilet, 1961; Collet, 1962), les variations respectives d'Np et d'Ns dépendent des conditions de séchage et non du matériel.

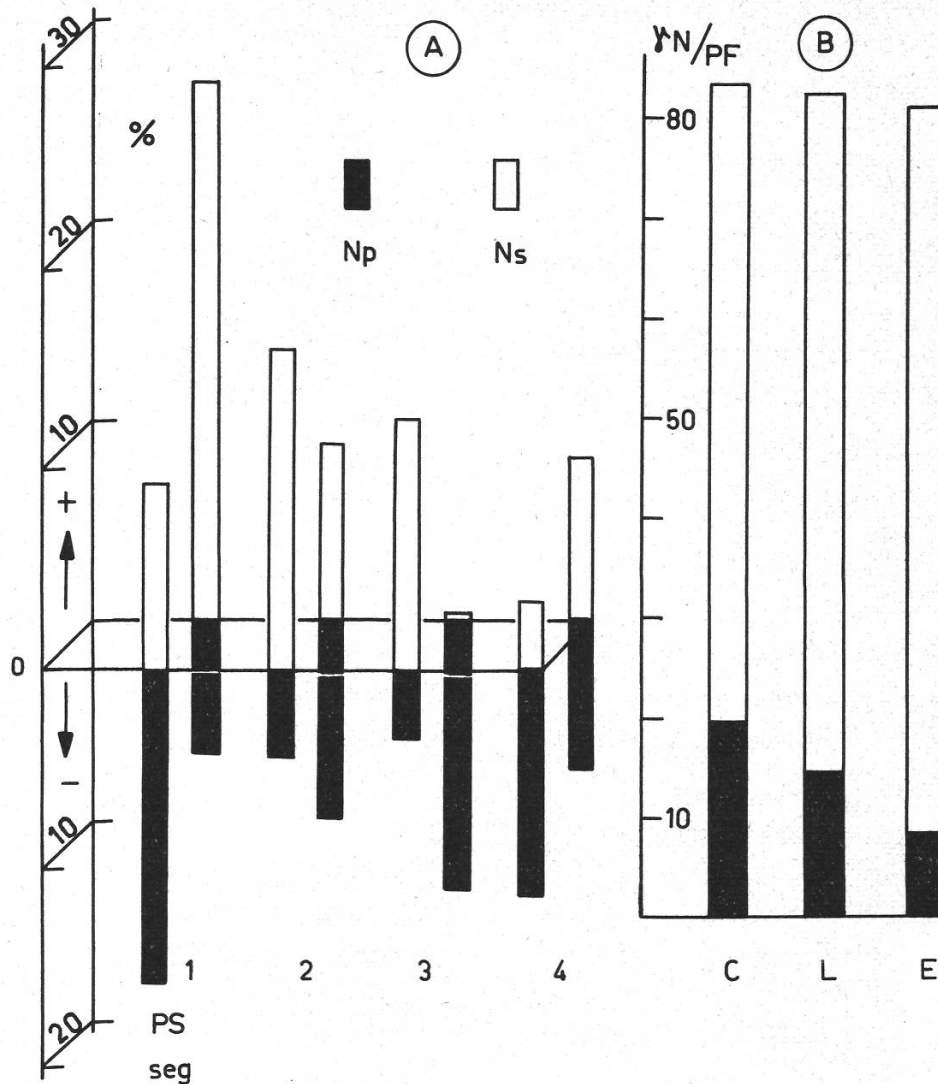


Figure A

Pertes (Np) ou gains (Ns) exprimés en pour-cent pour les tissus radiculaires séchés à l'étuve et comparés à des tissus homologues lyophilisés. Racines de *Phaseolus* respectivement de 10, 27 et 40 mm pour les groupes 1, 2, 3; racines de *Lens* de 20 mm pour le groupe 4. Deux critères de référence sont utilisés, le segment et le poids sec (seg et PS)

Figure B

Teneur en  $\gamma$  d'Np et d'Ns rapportés au PF pour des tiges de haricots congelées (C), lyophilisées (L) ou séchées à l'étuve (E)

Cependant sur des racines plus jeunes, le gain en Ns est supérieur à la perte en Np, contrairement à ce qui se produit pour des racines plus âgées. L'âge physiologique de ce matériel biologique joue donc un rôle dans les phénomènes de protéolyse.

La figure B présente les résultats obtenus sur des segments de tiges de haricot. Ceux-ci ont été analysés après simple congélation (C), après lyophilisation (L), ou après séchage à l'étuve (E). Le matériel congelé est

rapidement broyé et traité à l'acide trichloracétique. La teneur en azote total ne subit que peu de variation quel que soit le traitement. Il n'y a pratiquement pas de différence entre C et L. Par contre, l'augmentation de la quantité d'Ns au détriment de l'Np est spécialement grande lors du séchage à l'étuve. Il apparaît donc que la lyophilisation est le meilleur moyen dont nous disposons pour maintenir au cours de la dessiccation le rapport initial entre les divers types d'azote. Cette remarque justifie le choix des valeurs obtenues par cette technique comme référence pour l'étude des autres modes de séchage.

Enfin, pour ce troisième type de matériel, nous retrouvons les faits généraux dégagés lors de l'analyse des tissus radiculaires.

Dans la figure A, nous avons traduit en pour-cent les pertes d'Np et les gains d'Ns engendrés par le séchage à haute température et rapportés aux valeurs des tissus lyophilisés. Ces teneurs sont calculées sur la base du segment ou du poids sec.

### Discussion

Dans le tableau, nous constatons qu'au cours du développement des racines, les teneurs absolues en Np et en Ns augmentent d'abord puis diminuent. Il en est de même pour les composés ternaires comme le montrent les variations du poids sec, et dans les mêmes proportions. Aussi suivant le critère de référence utilisé pour exprimer les teneurs en Np ou Ns (Pilet, 1960; Pilet et Siegenthaler, 1961), les valeurs des gains ou pertes seront-elles différentes. La figure A montre une diminution des pertes d'Np/seg due au séchage en fonction de l'âge. Par rapport au poids sec, le phénomène semble inverse, mais cela est un artifice d'expression, car le rapport de l'Np à d'autres composés diminue au cours du vieillissement. La teneur en Ns, considérée en valeur absolue, ou rapportée au poids sec s'élève au début de la croissance puis s'abaisse plus tard. La comparaison des variations des teneurs en Np et en Ns (v. tableau) avec les pertes et les gains respectifs (fig. A) montrent une action différente des facteurs de dessiccation suivant l'âge physiologique du matériel. Or comme ces facteurs sont déterminés et demeurent constants, les variations enregistrées ne peuvent être dues qu'à la modification du matériel lui-même, soit de la nature des composés azotés. Ces transformations, compte tenu des résultats présentés, sont de deux ordres: qualitatif et quantitatif. De telles données corroborent les déductions de divers chercheurs (Yemm, 1956; Steward et coll., 1958; Siegenthaler, 1963), qui tendent à prouver qu'au cours de la vie d'une plante, les tissus vieux n'auraient plus les mêmes protéines que les tissus jeunes. Un point est sûr, c'est la variation de la proportion des protéines par rapport à l'ensemble des composés constitutifs de l'organisme.

Ces faits doivent nous rendre attentifs au choix du critère de référence lorsqu'il faut comparer des données biochimiques (Pilet, 1961). Mais en plus, certains critères de référence dépendent pour leur détermination de la méthode expérimentale choisie pour les connaître. Il est donc important de s'assurer de la valeur et des limites d'une technique, et d'en tenir compte dans la discussion des résultats qu'elle fournit.

### Bibliographie

- Albaum H. G. 1952. The metabolism of phosphorylated compounds in plants An. Rev. Plant Physiol. **3**, 35.
- Benson A. A. 1955. Moderne Methoden für Pflanzenanalyse II. Springer-Verlag Berlin 113.
- Champigny M. L. 1960. L'influence de la lumière sur la genèse des acides aminés dans les feuilles de *Bryophyllum daigremontianum* Berger. Rev. gén. Bot. **67**, 65.
- Collet G. 1962. Action de l'acide gibbérellique sur la croissance et le catabolisme auxinique du *Phaseolus vulgaris* L. Imp. Favre & Favre, Lausanne.
- Moyse A. 1946. Contribution à l'étude des substances azotées chez les végétaux. Rev. gén. Bot. **54**, 477.
- 1950. Relations entre le métabolisme azoté et la respiration des feuilles détachées. Ed. Hermann & Cie, Paris.
- Pilet P. E. 1958. Etude chromatographique des facteurs de croissance radiculaire. C. R. Acad. Sc. **246**, 2399.
- 1960. Gradients de croissance et problèmes auxiniques I. Critères de référence. Bull. Soc. bot. suisse **70**, 268.
- 1961. Les phytohormones de croissance. Ed. Masson & Cie, Paris.
- Collet G. 1959. Etude de l'allongement de section d'épicotyles (Comparaison de tests auxiniques). Bull. Soc. bot. suisse **69**, 47.
- Dubouchet J. 1962. Proposition d'un test «coléoptile» (*Triticum*) pour le dosage auxinique. Rev. gén. Bot. **69**, 545.
- Kobr M., Siegenthaler P. A. 1960. Proposition d'un test «racine» (*Lens*) pour le dosage auxinique (Méthode et applications). Rev. gén. Bot. **67**, 573.
- Siegenthaler P. A. 1961. Gradients auxiniques et critères de référence. C. R. Acad. Sc. **252**, 1852.
- Pucher G. W., Vickery H. B., Leavenworth C. S. 1935. Determination of ammoniac and of amide nitrogen in plant tissue. Indust. and Eng. Chem. An. Ed. **7**, 152.
- Siegenthaler P. A. 1963. Métabolisme azoté, croissance et catabolisme auxinique des plantules du «Lens». Imp. Baud, Lausanne.
- Steward F. C., Bidwell R. G. S. 1958. Nitrogen metabolism, respiration, and growth of cultured plant tissue. J. Exp. Bot. **9**, 285.
- — Yemm E. W. 1958. Nitrogen metabolism, respiration, and growth of cultured plant tissue. J. Exp. Bot. **9**, 11.
- Thompson J. F., Pollard J. K. 1958. Contrasts in the nitrogenous composition of rapidly growing and non-growing plant tissues. J. Exp. Bot. **9**, 1.
- Vickery H. B., Pucher G. W., Clark H. E. 1935. The determination of glutamine in the presence of asparagine. Biochem. J. **29**, 2710.
- Yemm E. W. 1956. The metabolism of senescent leaves. Col. ageing Ciba **2**, 202.