

ETUDE DE LA REPARTITION HISTOLOGIQUE DES NUCLEOPROTEINES

DANS LE GRAIN DE BLE

Rapport de stage effectué au Laboratoire d'Etudes des Blés
de l'Institut National de la Recherche Agronomique
16 rue Nicolas FORTIN. PARIS 13°.

D.E.A. de PHYSIOLOGIE VEGETALE APPLIQUEE
A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

Jean-Claude AUTRAN

Octobre 1969.

À mes parents, témoignage
de ma reconnaissance

À ma femme et mon fils
témoignage de mon affection.

Jean-Claude Autran



ETUDE DE LA REPARTITION HISTOLOGIQUE DES NUCLEOPROTEINES

DANS LE GRAIN DE BLE

Rapport de stage effectué au Laboratoire d'Etudes des Blés
de l'Institut National de la Recherche Agronomique
16 rue Nicolas FORTIN. PARIS 13°.

D.E.A. de PHYSIOLOGIE VEGETALE APPLIQUEE
A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS.

Jean-Claude AUTRAN

Octobre 1969.

SOMMAIRE

	page
AVANT - PROPOS	1
INTRODUCTION	2
PLAN	4
I - APERCU DES TRAVAUX ANTERIEURS	5
II - EXTRACTION QUANTITATIVE DES ACIDES NUCLEIQUES A PARTIR DU MATERIEL BRUT ET A PARTIR DE PREPARA- TIONS PROTEIQUES.	
A) Méthodes d'extraction des acides nucléiques	8
1) Préparation des tissus	8
2) Extraction des acides nucléiques	9
B) Adaptation des méthodes classiques de dosage des acides nucléiques aux tissus végétaux et en par- ticulier aux graines de céréales	II
C) Travaux personnels d'extraction des acides nuclé- iques à partir du grain de blé, des produits de sa mouture et des préparations protéiques	I2
1) Matériel étudié	12
2) Préparation préalable du matériel	14
3) Extraction des acides nucléiques	20
III - METHODES DE DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES. RESULTATS OBTENUS POUR LE GRAIN DE BLE ET LES PRODUITS DE SA MOUTURE	25
A) Méthodes analytiques utilisables	25
1) Dosage du phosphore	25
2) Dosage de l'azote	26
3) Dosage du ribose	26
4) Dosage du désoxyribose	27
5) Dosage des bases puriques et pyrimidiques	27
6) Mesures spectrophotométriques	27
B) Application de ces méthodes	28
1) Dosage du phosphore	28
2) Dosage de l'azote	35

3) Dosage du ribose et de l'ARN	37
4) Dosage du désoxyribose et de l'ADN	37
5) Dosage des bases puriques et pyrimidiques ...	39
6) Détermination par spectrophotométrie UV	39
C) Résultats des déterminations d'acides nucléiques	42
1) Méthode adoptée	42
2) Résultats obtenus	42
3) Conclusions sur les déterminations d'acides nucléiques	47
IV - EXTRACTION DES NUCLEOPROTEINES	
A) But de cette opération	48
B) Matériel d'étude et méthodes expérimentales	48
C) Résultats obtenus	52
1) Extractions du type global	52
2) Extractions du type sélectif - exhaustif	55
D) Discussion	60
1) Méthodes expérimentales	60
2) Résultats	63
E) Conclusion générale	63
V - PROJETS DE RECHERCHES	65
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	69

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

<u>Tableaux :</u>	page
1 - Importance des différentes formes de phosphore dans le grain de blé et les produits de sa mouture	3I
2 - Composition phosphorée du blé et des produits de sa mouture ..	33
3 - Estimation du phosphore nucléique	34
4 - Répartition de l'azote total au cours des traitements de délipidation et d'extractions perchloriques	36
5 - Teneur en ADN des différents produits analysés	38
6 - Teneur en ARN des différents produits analysés	43
7 - Quantités estimées d'ARN et d'ADN dans le grain de blé et dans les produits de sa mouture	45
8 - Importance relative de l'ARN et de l'ADN dans les différents produits de mouture, rapportée au grain de blé	46
9 - Composition protéique du blé CAPPELLE et des produits de sa mouture	56
10 - Teneur en phosphore total des différentes préparations protéiques	57
11 - Composition phosphorée des différentes préparations protéiques	59
12 - Composition en acides nucléiques des préparations protéiques lyophilisées	61

Figures :

1 - Spectre UV d'ARN de levure	I 27-28
1 bis - Dosage de l'ADN par spectrophotométrie. Courbe d'étalonnage à partir d'un ADN de thymus	27-28
1 ter - Origine histologique des différentes formes de phosphore du grain de blé	33-34
2 - Dosage de l'ADN selon la méthode de DISCHE-BURTON. spectre de la coloration	38-39
3 - Spectres UV d'extraits perchloriques de blé (0° C et 90° C) ..	40-4I
4 - Spectres UV d'extraits à 0° C des 4 produits de mouture	40-4I
5 - Spectres UV d'extraits à 90° C des 4 produits de mouture	40-4I
6 - Schéma du protocole expérimental de dosage des A.N.	4I-42
7 - Teneur en acides nucléiques des 4 produits de mouture	45-46
8 - Composition protéique du blé et des produits de sa mouture ..	56-57
9 - Teneurs en acides nucléiques des préparations protéiques	6I-62

AVANT - PROPOS

=====

Ce rapport résume les travaux de laboratoire effectués au cours de l'année 1968-69, en vue de l'obtention du Diplôme d'Etudes Approfondies de Physiologie Végétale Appliquée, dirigé par M. le Professeur ULRICH à la Faculté des Sciences de Paris.

Le stage, précédé d'une étude bibliographique a eu lieu au Laboratoire d'Etudes de la Qualité des Blés de l'I.N.R.A., sous la direction de M. BOURDET à qui j'exprime ma vive reconnaissance pour les précieux conseils qu'il n'a cessé de me prodiguer au cours de mon travail.

J'adresse également mes remerciements à Mlle GOBIN, ainsi qu'à Mme GUILLEMOT et à Mlle CLAUX pour leur collaboration technique.

INTRODUCTION

=====

Le but du travail qui nous a été proposé est d'arriver à une meilleure connaissance des acides nucléiques et des nucléoprotéines dans le grain de blé, en particulier dans ses différentes régions histologiques.

Cette étude est loin d'avoir été menée à son terme durant le stage effectué, de sorte que notre rapport ne présente que la première phase de la réalisation de ce travail complexe.

En particulier, si le sujet proposé est proche de la physiologie végétale, la phase préparatoire, seule abordée ici, demeure assez éloignée de cette matière scientifique. Par contre, la poursuite du travail pourra se faire sur le plan de la physiologie végétale. Mais d'autres voies de continuation, telles la génétique, la sélection variétale, la biochimie en vue d'applications de technologie agricole et alimentaires, pourraient être envisagées.

CADRE GENERAL DES RECHERCHES AUXQUELLES NOUS AVONS PARTICIPE

Notre laboratoire étudie la qualité des blés et cherche à relier celle-ci aux propriétés physico-chimiques de certains de leurs constituants biochimiques.

Or, les aptitudes technologiques des blés et de leurs produits de mouture, conditionnées pour une large part par leur teneur en protéines, dépendent aussi d'un facteur qualité, plus ou moins associé aux particularités génétiques des blés.

Ce facteur qualité, appelé parfois force des blés, dont l'origine se trouve dans les propriétés des protéines, peut être apprécié par des tests physiques ou chimiques. Mais de tels tests ne permettent pas d'atteindre les facteurs intimes qui régissent la qualité protéique. Pour tenter d'éclaircir ce problème, il semble donc nécessaire de mener une étude bio-physico-chimique plus fondamentale.

Au cours de ces dernières années, les travaux de BOURDET et FEILLET (1964, 1965, 1967, 1968) ont permis de mettre au point un protocole expérimental d'étude, qui rend compte de la constitution protéique des farines, grâce aux propriétés de solubilité, aux comportements électrophorétiques et chromatographiques des protéines. Ces travaux

se sont efforcés de relier la constitution protéique des farines, en particulier le groupe des albumines-globulines, aux particularités génétiques des blés mis en oeuvre.

ESPRIT DANS LEQUEL NOTRE ETUDE A ETE CONDUITE

Le présent travail est fondé sur l'idée suivante: puisque les acides nucléiques renferment le code génétique et jouent un rôle fondamental dans la synthèse protéique, on peut penser qu'ils ne sont pas étrangers aux particularités génétiques des blés. Cependant, ni les teneurs en acides nucléiques totaux, ni les valeurs des rapports ARN/ADN, (BOURDET et HERARD 1959, 1960; MIHALLOVIC et al. 1963, 1964) ne se sont révélées comme des critères significatifs d'une variété de blé.

Aussi, la présente étude a-t-elle été orientée, non plus vers les acides nucléiques seuls, mais aussi vers les protéines qui leur sont associées, telles des histones dont on présume le rôle dans la régulation des gènes.

Alors que les travaux de BOURDET et FEILLET rendent compte de la constitution protéique des farines, grâce aux propriétés de solubilité, le but final de cette étude est de mettre en évidence la constitution nucléoprotéique des blés et de leurs produits de mouture (farines, sons, remoulages, germes), ce qui - faute de travailler sur les différentes régions du grain obtenues par dissection - devrait donner une idée de la répartition histologique des composés nucléiques dans le grain, et de relier, si possible, cette constitution nucléoprotéique des blés avec leurs particularités génétiques.

L'état actuel de notre travail nous permettra seulement d'aborder la répartition des nucléoprotéines dans les différents produits de mouture du blé, grâce au dosage des acides nucléiques, et sur les problèmes posés par leur application aux matériels biologiques tels que le grain de blé et ses produits de mouture, ainsi qu'aux préparations protéiques lyophilisées. Nous étudierons enfin les possibilités d'extraction des nucléoprotéines du blé, à l'aide de solvants non dénaturants.

Voici d'ailleurs le détail du plan suivi:

.../

/⁺ Nous insisterons particulièrement sur les méthodes de détermination des acides nucléiques...

P L A N

- I - Aperçu des travaux antérieurs.

- II - Extraction quantitative des acides nucléiques à partir du matériel biologique brut et à partir de préparations nucléoprotéiques plus ou moins purifiées.

- III - Méthodes de dosage des acides nucléiques et résultats obtenus chez le grain de blé et ses produits de mouture.

- IV - Extraction de nucléoprotéines non dénaturées à partir du matériel biologique. Application au grain de blé.

- V - Conclusions.

- VI - Programme des recherches envisagées.

I - APERCU DES TRAVAUX ANTERIEURS

HISTORIQUE

Il y a 100 ans, exactement, MIESCHER isola pour la première fois isola une "nucléine" à partir des noyaux de cellules de pus.

Depuis ce temps, les connaissances précises sur les composés nucléiques ont évolué avec une relative lenteur et ce n'est que depuis peu d'années que quelques conceptions solides ont pu être dégagées.

Durant un siècle, on s'est surtout attaché à découvrir et à mieux connaître ces composés nucléiques, par exemple:

- leur répartition dans la cellule vivante
- leur rôle (synthèse protéique, code génétique)
- leur structure moléculaire.

Comme il a été montré que des composés nucléiques semblables existaient dans tous les tissus vivants, cette étude a pu se concentrer sur les organes et les cellules qui en sont riches ou sur ceux dont l'extraction est facile. C'est pourquoi la majorité des recherches ont porté sur des matériels biologiques tels que:

- le thymus de veau
- les levures
- les spermatozoïdes de poissons
- les tumeurs,... etc...

Cette étude a donc d'abord été menée moins pour les tissus vivants eux-mêmes que pour les composés nucléiques que l'on en a extrait.

En conséquence, la plupart des méthodes d'étude (extraction, dosage, isolement) des acides nucléiques ont été établies à partir de quelques tissus et très généralement, à partir de tissus animaux ou de microorganismes.

Mais les chercheurs ne se sont consacrés à l'étude des composés nucléiques de végétaux supérieurs que beaucoup plus rarement, et si l'on compte quelques travaux concernant des organes riches en acides nucléiques, ou bien à métabolisme intense: OSBORNE et HARRIS (1902), LEVENE et LAFORGE (1910); CLARKE et SCHRYVER (1917), LUSENA (1951) sur le germe de blé, TSO, BONNER et VINOGRAD (1956) sur la plantule du pois, LYTTLETON (1960) sur la feuille de trèfle, OOTA et OSAWA (1954), sur la plantule du haricot, CHERRY (1963) sur la germination de l'arachide, etc..., il en est autrement quant aux organes à métabolisme ralenti comme les tissus de réserve et en particulier les graines de céréales.

Ces dernières, très étudiées pour leur composition protéique depuis les travaux historiques d'OSBORNE (1910), ne l'ont été que beaucoup plus tard (à l'exception de leur embryon), au point de vue de leurs acides nucléiques.

MASONI (1915), puis GEOFFROY (1939), donnent des teneurs du grain de blé en phosphore nucléoprotéique. TAKASUGI (1942), puis KONDO et MORITA (1954) affirment que la glutéline de riz est une nucléoprotéine.

MATSUSHITA (1958), confirmant la présence d'acides nucléiques dans les graines de céréales, selon des teneurs variant comme la richesse en protéines, pense qu'il ne faut plus considérer les protéines des graines uniquement comme des substances de réserve. Au contraire, la présence d'acides nucléiques, mis en réserve en vue de la germination, ou accumulés avec les nucléoprotéines auxquelles ils appartiennent au cours de la maturation, oblige à reconsidérer les propriétés et les fonctions des protéines des graines. AYRAPAA (1957) découvre que la fraction soluble dans les solutions salines, mais insoluble dans l'eau (fraction globuline) de la graine d'orge, est particulièrement riche en acides nucléiques. BOURDET et HERARD (1959, 1960) étudient l'évolution des acides nucléiques au cours de la maturation du grain de blé ainsi que la présence des deux types d'acides nucléiques, fortement fixés à des molécules protéiques de caractère basique, dans le gluten. Ils suggèrent que le rapport ARN/ADN du gluten, pourrait constituer un caractère variétal.

JENNINGS et MORTON (1962) étudient séparément l'évolution des acides nucléiques au cours du développement du grain de blé, dans l'endosperme et dans le péricarpe. MIHAILOVIC et al. (1963, 1964) dosent les deux types d'acides nucléiques dans le grain de blé et dans le gluten au cours de la maturation. Ils ne pensent pas que le rapport ARN/ADN puisse constituer un caractère variétal.

BOURDET (1965), FEILLET (1965), BOURDET et FEILLET (1967), au cours d'études sur les constituants phosphorés du blé et de la farine de blé, confirment la richesse en acides nucléiques (10% environ) de la fraction globuline de la farine de blé. Ils montrent qu'ainsi cette fraction renferme la majorité des acides nucléiques de la farine, le reste étant contenu principalement dans la fraction gluténine. Soulignant également l'importance des acides aminés basiques dans les globulines, ils suggèrent que celles-ci pourraient s'apparenter à des histones végétales.

Après ce bref rappel historique et cet aperçu des travaux antérieurs, il convient de souligner la pauvreté de la littérature concernant les composés nucléiques des graines de céréales et des tissus

végétaux, en général.

A côté d'innombrables travaux relatifs aux tissus animaux et aux microorganismes, on constate un retard important dans les méthodes d'investigations et dans les résultats, en ce qui concerne les végétaux, retard particulièrement accusé pour les tissus de réserve.

On peut par exemple remarquer que, parmi les trois plus importantes méthodes de dosage des acides nucléiques, deux ont été établies en 1945 pour des tissus animaux: celle de SCHNEIDER, pour le thymus, le foie de rat et les poumons de souris, et celle de SCHMIDT-THANNHAUSER, pour le thymus, le pancréas, le foie, la rate, le cerveau, les oeufs, ... Ce n'est qu'en 1949 que OGUR et ROSEN mirent au point une méthode de dosage des acides nucléiques de tissus végétaux. Encore ne fut-elle établie que pour les méristèmes de racines de maïs et n'est-elle applicable qu'à un nombre restreint de tissus végétaux (KLEIN et al. 1953).

*Bla bla bla
Dummes*

Cela signifie que la plupart des travaux sur végétaux doivent faire appel à des méthodes prévues pour tissus animaux, et doivent généralement les modifier profondément pour les adapter à leur propre cas.

De même, il est fréquent que des découvertes ayant eu lieu chez des animaux ou des microorganismes soient extrapolées ou généralisées aux végétaux avec seulement des fondements expérimentaux faibles.

De même, enfin, les ouvrages généraux et les plus importantes revues concernant les composés nucléiques sont axés sur les tissus animaux. C'est le cas, par exemple, de la très belle revue de HUTCHINSON et MUNRO (1961) sur le dosage des acides nucléiques et de celle de DESVEAUX-CHABROL (1968) sur la biologie des histones.

Peut-être ce décalage évident entre animaux et végétaux peut-il s'expliquer par de plus grandes difficultés d'études du matériel végétal, lequel contient d'importantes quantités de substances (Cellulose, pentosanes, amidon, protéines de réserve..) dont l'insolubilité gêne tout travail de recherche.

II - EXTRACTION QUANTITATIVE DES ACIDES NUCLEIQUES
A PARTIR DU MATERIEL BIOLOGIQUE BRUT ET A PARTIR
DE PREPARATIONS PROTEIQUES.

Après avoir exposé les principales méthodes connues d'extraction des acides nucléiques, nous étudierons les possibilités de leur application à notre matériel végétal, ce que nous illustrerons par quelques résultats.

A - METHODES D'EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES

1 - Préparation préalable des tissus:

Cette phase a pour but de faciliter l'extraction ainsi que d'éliminer des substances pouvant interférer ultérieurement au cours des réactions de dosage.

a) Broyage des tissus:

La plupart des auteurs conseillent un broyage des tissus suffisant pour accroître la surface des particules en contact avec le liquide d'extraction. Mais cette opération ne doit être ni trop poussée ni trop prolongée afin d'éviter toute dégradation mécanique ou chimique (contact avec le métal des broyeurs) des macromolécules.

Pour freiner les dégradations enzymatiques, il convient de broyer à basse température (glace fondante ou parfois azote liquide) bien que certains auteurs opèrent dans l'alcool bouillant ou encore dans des solutions concentrées d'urée.

b) Extraction des composés acido-solubles à froid:

Une rapide extraction du tissu avec un acide dilué est habituellement pratiquée en vue d'éliminer:

- le phosphate inorganique et les formes de phosphore organique (telles que le phosphore phytique) pouvant interférer dans le dosage du phosphore nucléique;
- les sucres simples et les polysaccharides qui pourraient gêner les réactions de dosage de l'ARN par l'intermédiaire du ribose;
- les nucléotides dont la présence modifierait les valeurs trouvées en acides nucléiques.

Pour cette extraction, on utilise fréquemment l'acide trichloracétique 5% ou 10% qui, à 0°C a le mérite de réduire l'hydrolyse acide des acides nucléiques tout en favorisant la précipitation des protéines.

L'acide perchlorique 0,2N environ est également employé.

Mais selon le tissu étudié, il faut trouver un compromis entre une extraction incomplète des composés acido-solubles et une extraction trop vigoureuse qui peut dégrader et éliminer une partie des acides nucléiques.

c) Délipidation:

Comme la détermination des acides nucléiques fait souvent appel au dosage du phosphore nucléaire, il est nécessaire d'éliminer préalablement le phosphore lipidique. Aussi pratique-t-on une délipidation à l'aide d'un mélange de deux solvants, à tendances respectivement polaire et apolaire, comme les mélanges éthanol-éther, chloroforme-méthanol, etc...

Ce traitement, à la température d'ébullition, permet d'éliminer les lipides simples ainsi que la majeure partie des phospho-lipides.

2 - Extraction des acides nucléiques

A partir du résidu d'extraction des phospholipides et des composés acido-solubles à froid, il s'agit d'extraire les acides nucléiques.

Il semble impossible de recueillir quantitativement les acides nucléiques sans les dégrader. Aussi, pour extraire d'un tissu la totalité de ses acides nucléiques, on est obligé d'utiliser un traitement assez brutal qui dénature fortement les macro-molécules.

Mais cela a peu d'importance car, en pratique ensuite, des réactions de dosage spécifique d'un élément ou d'un groupement chimique de l'acide nucléique (phosphore, ribose, désoxyribose) dont les propriétés - à l'exception du spectre UV des bases puriques et pyrimidiques - sont peu affectées par l'état de dépolymérisation de la macromolécule.

Trois méthodes principales, universellement utilisées, sont à décrire:

a) Méthode de SCHMIDT-THANNI US 2, 1945

Mis au point pour le dosage des acides nucléiques dans les tissus animaux, ce procédé utilise une incubation à 37°C durant au moins 15 heures dans NaOH 1N. Une dégradation de l'ARN en fragments acido-solubles a lieu, tandis que l'ADN, plus résistant, reste sous forme polymérisée.

L'acidification du milieu, à la fin de l'incubation, amène donc la précipitation de l'ADN, tandis que les oligonucléotides de l'ARN demeurent dans le surnageant.

Cette méthode permet donc, en principe, non seulement une ex-

traction quantitative des acides nucléiques, mais encore leur séparation complète en ARN et ADN. L'ARN peut alors être dosé dans le surnageant et l'ADN, dans le résidu, après solubilisation, selon les méthodes colorimétriques ou spectrophotométriques qui seront l'objet du chapitre III.

b) Méthode de SCHNEIDER, 1945

Egalement mise au point pour des tissus animaux, cette méthode ne permet pas la séparation des deux types d'acides nucléiques. Elle aboutit seulement à une extraction globale, à l'aide d'un traitement par l'acide trichloracétique à 90°C pendant 10 mn., du fait que cet acide peut solubiliser les acides nucléiques tout en étant un agent précipitant des protéines.

Sur l'extrait obtenu, on peut alors pratiquer des réactions de dosage spécifique de l'ARN et de l'ADN.

c) Méthode de OGUR et ROSEN, 1949

C'est le premier procédé imaginé pour la détermination des acides nucléiques dans les tissus végétaux. Mais nous verrons que s'il est efficace, pour des tissus jeunes (plantules, méristèmes ...), il est inutilisable dans de nombreux cas.

Son principe repose sur une solubilisation préférentielle de l'ARN en milieu perchlorique 1N à 4°C pendant 18 heures et sur l'extraction consécutive de l'ADN par l'acide perchlorique 0,5 N à 70°C pendant deux fois 20 mn.

On peut ainsi, dans les meilleurs cas, aboutir à une extraction séparée de l'ARN et de l'ADN respectivement à froid et à chaud.

d) Autres procédés:

Ils sont moins connus, mais leur principe doit être signalé. Ainsi, JORPES (1934), JAVILLIER et al. (1931) utilisent des extractions à l'aide du NaCl 10% à l'ébullition.

MORTON et al. (1958) combinent l'extraction de l'ARN par l'acide perchlorique froid et celle de l'ADN par NaCl 10% à chaud.

SOLOMON (1957) pratique une extraction au phénol tandis que JERVELL et al. (1958) dosent l'ARN et l'ADN par l'intermédiaire de l'uracile et de la thymine séparées par chromatographie sur papier.

AUBEL-SADRON (1960, 1961) et EBEL (1961) précipitent sélectivement les acides nucléiques à l'aide de sels d'ammonium quaternaire, comme le bromure de cetyl-triméthyl ammonium (CETAVLON).

B - ADAPTATION DES METHODES CLASSIQUES DE DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES AUX TISSUS VEGETAUX ET EN PARTICULIER AUX GRAINES DE CEREALES

Nous venons de décrire les principales méthodes sous leur forme ordinaire. Il va de soi que, si ces procédés conviennent avec les tissus pour lesquels on les a établis, ils ont dû être adaptés et parfois complètement transformés pour permettre le dosage dans d'autres matériels biologiques. HUTCHINSON & MUNRO (1961) ont d'ailleurs regroupé dans une même revue toutes ces méthodes en donnant le détail des conditions opératoires utilisées par les auteurs.

Après examen de la littérature, il semble que le dosage des acides nucléiques ne pose pas de grands problèmes pour la plupart des tissus animaux. Par contre, les travaux relatifs au secteur végétal notent généralement la difficulté et parfois l'impossibilité de mettre au point des méthodes correctes.

Ainsi, HOLDGATE & GOODWIN (1965), dans une revue des méthodes d'extraction des acides nucléiques végétaux, concluent qu'aucun des trois procédés classiques n'est satisfaisant.

INGLE (1963) pense que la méthode de SCHMIDT-THANHAUSER est la seule utilisable pour le matériel végétal. Ce procédé est en effet employé par de nombreux chercheurs, tels que RÖTTGER & al. (1962) sur des feuilles de tabac, NIEMAN & al. (1963) sur des feuilles de haricot, de radis et de vigne, BROWN et al. (1963) sur des feuilles de Prunus, GUINN (1966) pour des feuilles et des racines de coton, etc...

WHEELER & BOULTER (1967) sur des graines de fèves et SMILLIE & KROTKOV (1960) avec Euglena et Chlorella, utilisent une méthode dérivée de celle de SCHMIDT-THANHAUSER en employant KOH 0,3 N au lieu de NaOH 1N.

Considérant que les autres procédés étaient inutilisables, MARTIN & MORTON (1956) ainsi que JENNINGS & MORTON (1964) extraient les acides nucléiques du grain de blé au cours de maturation par KCl 10% à 100°C. Par contre, BOURDET & HERARD (1959) travaillant sur le même matériel trouvent cette méthode inefficace.

MARKOWSKI & MADEJ (1968) extraient les acides nucléiques de l'embryon de blé par NaCl 10% à 100°C et séparent l'ADN de l'ARN selon le procédé SCHMIDT-THANHAUSER.

Quelques auteurs séparent les acides nucléiques végétaux selon la méthode OGUR & ROSEN: WOODSTOCK & SKOOG (1960) sur des racines de maïs, LEDOUX & al. (1962) sur des plantules d'orge, GALITZ & HOWELL (1960) sur de jeunes graines de soja, LAVIE (1968) sur de la moelle de tabac. KLEIN & al. (1963) critiquent cette méthode et ne lui trouvent que des applications très limitées.

Enfin, la méthode de SCHNEIDER, bien que conçue pour des tissus animaux se trouve employée par CHERRY (1962, 1963) pour des cotylédons d'arachide, ainsi que par HALL et HODGES (1966) sur des graines d'avoine.

On trouve encore cette dernière méthode dans plusieurs travaux mais il faut signaler qu'il s'agit alors d'une transformation de celle de OGUR et ROSEN. En effet, de nombreux chercheurs du secteur végétal ayant échoué dans la séparation des acides nucléiques, selon ce dernier procédé, ils ont supprimé la première série d'extractions (à 0°C) et ont dosé les acides nucléiques totaux dans le seul extrait à chaud (70° ou 90°C).

Cette adaptation a été suivie en particulier par la plupart de ceux qui ont travaillé sur les graines de céréales. C'est le cas de BOURDET et HERARD (1959) pour le grain de blé en cours de maturation, puis de BOURDET et FEILLET (1965, 1967) pour les farines, et de MIHALOVIC et al (1963, 1964) pour le grain de blé mûr.

Il apparait donc que les tissus végétaux posent des problèmes différents de ceux des tissus animaux, probablement à cause des nombreux composés organiques entraînés avec les acides nucléiques au cours des opérations d'extraction et interférant ensuite dans les réactions de dosage.

Avec les tissus de réserve, les difficultés s'accusent à cause de l'importance accrue des composés insolubles (amidon, pentosanes insolubles, protéines de réserve). Les méthodes d'extraction ont dû ainsi s'adapter à chaque cas particulier, de sorte que les propriétés physico-chimiques mises en jeu n'ont parfois qu'un rapport éloigné avec celles que les procédés initiaux invoquaient.

C - TRAVAUX PERSONNELS D'EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES A PARTIR DU GRAIN DE BLE, DES PRODUITS DE SA MOUTURE ET DES PREPARATIONS PROTEIQUES

1 - Matériel étudié:

a) Grain de blé:

Nous avons travaillé sur un blé tendre (*Triticum vulgare*), de variété CAPPELLE, récolté à La Minière (Versailles) en 1966.

Voici quelques caractéristiques de ce blé:

- teneur en protides: 12,15%
- teneur en phosphore: 426 mg p.100 g
- humidité: 12,5%

b) Produits de mouture du blé:

Après passage dans un moulin expérimental des Grands Moulins de Paris, le blé CAPPELLE a été fractionné en quatre catégories de produits

différent par la taille de leurs particules:

- la farine, fraction la plus fine, qui représente essentiellement les parties centrales du grain;
- les "remoulages blancs" et les "remoulages bis", contenant des particules plus grosses, riches en matières cellulosiques provenant des parois cellulaires et en fragments de l'assise protéique.
- les "gros sons" correspondant aux enveloppes du grain dégagées de l'amanche farineuse.

Dans ce diagramme de mouture, les germes ne sont pas séparés. Ils se retrouvent à la fois dans les remoulages blancs et les remoulages bis.

Les valeurs données di-dessous pourront nous renseigner sur la composition biochimique de ces produits et sur l'importance relative de chaque fraction, dans le grain total.

	% du grain	Teneur en		Teneur en	
		N	P	N	P
		(en mg p.100 g m.s.)		(en mg p.100 g de blé m.s.)	
Blé	100	2130	426	-	-
Farine	78,3	1905	111	1493	87
Remoulages blancs	1,6	3080	752	49	12
Remoulages bis	5,8	3160	1255	183	73
Gros sons	14,3	2860	1933	409	276

L'analyse de ces produits de la mouture du blé nous permet donc, faute de travailler sur les régions histologiques obtenues par dissection, d'avoir une idée grossière de la répartition des composés biochimiques dans les différentes parties du grain.

c) Préparations protéiques:

Le chapitre IV expose nos travaux d'extraction des nucléoprotéines à partir du matériel végétal. Sur les préparations protéiques obtenues après dialyse et lyophilisation, nous avons pratiqué des déterminations d'acides nucléiques. Il va de soi que ce matériel, déjà quelque peu purifié, est infiniment plus facile à analyser que les tissus bruts présentés ci-dessus.

2 - Préparation préalable du matériel en vue de l'extraction des acides nucléiques

a) Broyage:

Avant toute extraction, les grains de blé ont été réduits en fines particules (dans un broyeur à marteaux CULATTI type DFH 48) recueillies après passage dans un tamis de mailles de 0,7 mm. Cette opération amenant un refus des plus grosses particules (fragments de sons), on récupère ces dernières et on les incorpore au tamisat afin que celui-ci conserve la même composition que le blé initial.

A l'exception des "gros sons" qui ont dû subir le même broyage, les produits de mouture, jugés suffisamment fins, ont été analysés tel quels.

Sans cette opération de broyage, qui augmente considérablement les surfaces en contact avec les solvants, l'extraction ne serait pas quantitative. Cependant, il convient de signaler les défauts qu'elle présente.

Le broyage opère une certaine séparation entre les petites particules et les plus grosses que le tamis refuse. La récupération de ces dernières doit donc être très soignée. Dans le cas contraire, la composition du blé broyé est différente de celle du blé de départ, en particulier à cause de la perte d'une partie des sons. Comme ces particules contiennent la majeure partie du phosphore du grain, tout manque de soin au broyage se traduit par une baisse du taux du phosphore total dosé dans le blé broyé.

Ainsi nous avons obtenu des teneurs en phosphore allant de 414 à 480 mg/100 g de blé, selon la manière de conduire ce simple broyage.

D'autre part, un broyage trop prolongé provoque un certain échauffement pouvant amener une altération des macromolécules. Ce risque peut cependant être évité en pratiquant l'opération en présence de morceaux de carboglace.

Enfin, le broyage modifie la structure physique du matériel végétal et, en particulier, entraîne des pertes d'eau, de sorte que, pour connaître l'humidité du produit broyé, il faut attendre le rétablissement de l'équilibre avec l'atmosphère, ce qui peut demander quelques jours.

b) Délipidation:

Lorsque le dosage des acides nucléiques ne fait pas intervenir le phosphore nucléique, cette opération est inutile (SCHNEIDER, 1945). Comme ce n'est pas notre cas, nous avons dû généralement éliminer les phospholipides.

- Méthodes utilisées

Nous avons employé le mélange éthanol-éther (3/1) à l'ébullition directement dans le tube d'extraction. Pour obtenir des quantités plus importantes de produits délipidés, nous avons pratiqué aussi la délipidation dans l'appareil BBS (14 h. par l'éther et 8 h. par l'éthanol).

Par ailleurs, pour vérifier l'efficacité de l'opération, nous avons aussi délipidé par le butanol à froid, lequel est apparu comme le meilleur agent de délipidation des farines (BOURDET et FEILLET 1966).

- Résultats:

Selon le procédé, l'efficacité d'extraction du phosphore lipidique est très différente: ainsi, pour le blé CAPPELLE nous obtenons:

- par le butanol:	18,0 mg	de P-lipidique	pour 100 g	m.s. de blé
- par éthanol-éther:	14,3 mg	"	"	"
- par BBS:	9,5 mg	"	"	"

D'autre part, pour des raisons à déterminer, nous avons eu des difficultés à obtenir des valeurs reproductibles dans les produits de mouture. Les résultats restent encore à préciser, mais les ordres de grandeur du P-lipidique (par extraction au BBS) sont les suivants:

	mg de P-lipidique p.100 g de produit	mg de P-lipidique p.100 g de blé
Farine (78,3% du blé)	8,2	6,4
Remoulages blancs (1,6%)	18,8	0,3
Remoulages bis (5,8%)	25,0	1,4
Gros sons (14,3%)	31,2	4,4

Signalons au passage l'importance du P-lipidique par rapport au phosphore total, pour chacun de ces produits:

	P-total (mg p.100 g)	P-lipidique (mg p.100 g)	% P-lipidique par rapport à P-total
Blé	426	9,5	2,2%
Farine	111	8,2	7,4
Remoulages blancs	752	18,8	2,5
Remoulages bis	1255	25,0	2,0
Gros sons	1933	31,2	1,6

Le P-lipidique représente donc environ 2% du P-total, sauf dans la farine où ce rapport s'élève à 7,4%, et cela bien que la farine soit la fraction la plus pauvre en P-lipidique.

L'explication est que les remoulages et les sons, bien que riches en P-lipidique, contiennent beaucoup de P-phytique et de P-nucléique tandis que la farine en est relativement pauvre.

- Discussion

Il semble que le procédé de délipidation par le butanol à froid soit le plus efficace. Mais encore faudrait-il montrer qu'il n'extrait que du P-lipidique. D'autre part, par suite de la difficulté à évaporer le butanol dans le résidu délipidé, l'extraction des acides nucléiques ne peut se faire sur ce même matériel. Ce procédé n'a donc qu'une valeur de témoin.

La solution consiste donc, soit à délipider par le mélange éthanol-éther, facile à évaporer et à poursuivre les extractions sur le même matériel, soit à préparer des quantités importantes de produit délipidé, dans l'appareil BBS par exemple. Cependant, les résultats diffèrent selon le procédé. Il est possible que tout le phosphore extrait ne soit pas lipidique, car les spectres UV des extraits par l'éthanol en particulier, présentent parfois des maxima d'absorption vers 270 nm. N'ayant pu identifier d'acide nucléique dans ces extraits (car l'éther et l'éthanol modifient la réaction colorimétrique), il nous est cependant difficile de nous prononcer encore.

Si la délipidation préalable n'est pas pratiquée, nous avons observé que la valeur du phosphore présent dans le résidu après extraction des acides nucléiques s'accroît alors d'une quantité d'environ 10 à 14 mg p.100 g de blé, c'est-à-dire du même ordre que la teneur en P-lipidique.

Ce résultat montre que, dans une première approximation, on pourrait éviter l'opération de délipidation préalable, du fait que la majeure partie du P-lipidique ne semble pas être extraite avec les acides nucléiques. Il faudrait cependant essayer d'identifier le P-lipidique dans le résidu final, et cela pour tous les produits différents étudiés, ce qui n'a pas encore été réalisé.

Enfin, nous avons constaté que la délipidation modifiait nettement la structure physico-chimique des produits analysés. En effet, l'extrait par l'éther ou l'éthanol contient, à côté des lipides, bien d'autres constituants: 1,5 à 2% de l'azote total du blé ou de la farine s'y trouvent. Pensant que cet azote ne pouvait pas être uniquement phospholipidique (choline), BOURDET et HERARD (1960) ont suggéré que la délipidation entraînait des constituants de nature protéique, ce qu'ils ont confirmé en identifiant les 17 acides aminés dans l'extrait de gluten de blé par l'éthanol.

Il apparaît donc que l'élimination préalable des phospholipides souvent justifiée, entraîne parfois des inconvénients, lesquels seraient à considérer si, dans notre cas, l'identification d'acides nucléiques dans les extraits par l'éther ou l'éthanol se confirmait.

c) Extraction des composés acido-solubles à 0°C:

- Méthodes

Les différents agents d'extraction utilisés sont:

- l'acide perchlorique 0,25 N (OGUR et ROSEN 1949)
- l'acide trichloracétique 10% (SCHNEIDER 1945)

Nous avons aussi employé l'acide perchlorique 0,5 N et l'acide trichloracétique 5%.

Les conditions d'extraction sont les suivantes:

- les trois extraits sont réunis et amenés à 50 ml.
- après chaque extraction, le surnageant est séparé par décantation après centrifugation à 0°C dans un centrifugeur JOUAN G 60, à 3600 g ou dans un MSE HIGH SPEED 18, à 10.000 g.

- Résultats

Au point de vue des quantités de phosphore acido-soluble extrait à 0°C, les résultats sont pratiquement indépendants de l'acide utilisé comme le montre le tableau suivant:

		: P extrait	: % du P total
		-----	-----
3 extractions à 0°C par:	{ ATC 10%	: 368 mg p.100g blé	: 86,2%
	{ ATC 5%	: 372 mg " " "	: 87,6%
	{ HClO ₄ 0,25 N	: 362 mg " " "	: 85,3%
	{ HClO ₄ 0,5 N	: 375 mg " " "	: 87,8%

De même, les résultats ne laissent apparaître aucune différence significative lorsqu'on pratique des extractions de 15, 10 ou 5 mn.

Les chiffres montrent donc que la plus grande partie du phosphore du blé est extractible à 0°C par les acides dilués ci-dessus. La littérature affirme que ce phosphore correspond à des formes minérales et organiques. Ainsi BOURDET et HERARD (1959) ont identifié, dans ces extraits acides à 0°C de blé, du phosphore minéral (orthophosphate), du phosphore labile (provenant des groupements phosphoriques de cofacteurs d'enzymes), du phosphore phytique (inositol-phosphates), ce dernier étant, de loin, le plus important dans le blé.

Dans les produits de mouture du blé, voici l'importance du phosphore acido-soluble à 0°C:

	Avec l'acide perchlorique			Avec l'acide trichloracétique		
	mg p.100 g	% du P	tt ¹	mg p.100 g	% du P	tt ¹
Farine	61	54,7		66	59,3	
Remoulages blancs	647	86,0		642	85,2	
Remoulages bis	1103	87,3		1138	88,2	
Gros sons	1813	95,1		1900	95,4	

Il apparait que le P-acido-soluble est la forme prédominante dans les enveloppes du grain. Par contre, dans l'amande farineuse, cette forme ne représente plus qu'environ la moitié du P-total.

- Discussion:

Dans tous les cas, les différences observées entre les valeurs obtenues par les différents acides utilisés, sont relativement faibles et généralement de l'ordre de grandeur de l'incertitude sur le résultat. On ne peut donc pas trouver de différences significatives.

Nous n'avons pas effectué de dosage spécifique pour identifier par exemple le P-minéral ou le P-phytique dans les extraits. Cependant, nous avons étudié leur spectre UV et nous avons toujours trouvé une absorption nette à 260-265 mn, ce qui caractérise les acides nucléiques et les nucléotides.

Cependant, vu l'importance de cette absorption UV, nous avons dû penser que, à côté des nucléotides que l'extraction acide élimine, devaient se trouver aussi des acides nucléiques. Cela a été confirmé par le fait qu'après dialyse prolongée de l'extrait acide, donc élimination des nucléotides, on pouvait encore identifier des acides nucléiques.

En admettant que ce procédé de dialyse permette une conclusion exacte et que le traitement acide à froid ne dégrade pas les acides nucléiques (l'ARN en particulier), nous avons évalué à en moyenne 50% la part des nucléotides dans l'absorption nucléique. Ce n'est qu'un ordre de grandeur, car nous avons conscience du manque de probité du procédé. Aussi nous proposons-nous d'approfondir cette question par la suite.

Les acides nucléiques du grain de blé auraient donc des propriétés différentes de celles des autres tissus végétaux au point de vue de leur extractibilité. En effet, la plupart des auteurs ayant utilisé ce traitement acide à froid, n'ont jamais signalé que des acides nucléiques pouvaient être ainsi entraînés avec les nucléotides. Nous

avons cependant tenu compte de ce fait par la suite.

Pour limiter cette élimination d'acides nucléiques, on pourrait penser à utiliser des acides plus dilués. Nous nous proposons d'utiliser ce moyen. Il faut cependant signaler que la température doit être maintenue à 0°C tant au cours de l'extraction que pendant les centrifugations. Si la température s'élève, on note une plus grande quantité de composés nucléiques dans l'extrait. Ainsi, à 0°C, dans les conditions décrites, environ 10% des acides nucléiques totaux (cette valeur comprenant les nucléotides) sont extraits. A 20°C, on atteint 20 à 25% des acides nucléiques totaux.

Enfin, nous avons essayé de montrer que trois extractions suffisaient pour éliminer la totalité du phosphore acido-soluble à 0°C. Nous avons dosé le phosphore entraîné dans chacune d'elles

	Quantité de P	% du P acido-soluble total
Extraction n°1	331 mg p.100 g	90,2%
" n°2	20 mg "	5,4%
" n°3	11,2 mg "	3,1%
" n°4	4,1 mg "	1,1%
" n°5	1,5 mg "	0,4%
" n°6	1,0 mg "	0,3%

La première extraction élimine donc 90% du P acido-soluble total et les trois premières réunies en contiennent plus de 98%.

Mais, ayant parallèlement étudié le spectre UV de chaque extrait, nous avons constaté que tous contenaient des acides nucléiques et que le phosphore des derniers extraits était uniquement du P-nucléique. Aussi convient-il de se limiter à trois extractions car cela suffit à éliminer tout le phosphore du type phytique, minéral ... Les extractions suivantes ne serviraient qu'à encore éliminer du P-nucléique.

d) Ordre des opérations:

Un grand nombre de travaux opèrent la délipidation après extraction des composés acido-solubles. Quelques-uns, comme OGUR et ROSEN (1950) inversent les deux opérations.

Nous avons essayé les deux systèmes et nous avons décidé pour la suite de toujours pratiquer la délipidation en premier lieu. En effet, dans le cas contraire, après extraction des composés acido-solubles, on obtient un résidu encore imbibé d'acide. Lorsqu'on délipide, on porte à 75 ou 80°C ce résidu en présence d'éther ou d'éthanol-éther. Or, l'acide restant va, à cette température, provoquer une hydrolyse et l'extrait contenant les lipides entraînera aussi de nombreux composés,

comme du P non lipidique, ainsi que le montrent ces résultats:

	<u>P "lipidique" dosé</u>
Délipidation en premier lieu	14,3 mg p.100 g de blé
" " second lieu	27,0 mg " " " " "

Une autre solution consiste à séparer l'extraction acide de la délipidation par plusieurs lavages à l'eau en vue d'éliminer l'acide. C'est ce qu'on a utilisé BOURDET & HERARD (1959) pour le grain de blé. Mais nous avons préféré délipider en premier lieu, bien que, cette opération modifiant les structures du matériel, le taux de P acido-soluble éliminé ensuite ne soit pas le même que dans le cas où l'on inverse les deux opérations.

3 - Extraction des acides nucléiques

Les trois méthodes classiques décrites plus haut ont été appliquées à notre matériel végétal. Nous allons ici donner les résultats de ces travaux, critiquer les procédés utilisés et essayer d'indiquer la manière suivant laquelle on pourrait les adapter.

a) Essais d'application des méthodes classiques:

- Méthode de SCHMIDT-THANNAUSER

Plusieurs auteurs travaillant sur les graines de céréales ont constaté l'impossibilité d'utiliser cette méthode (MATSUSHITA 1958, MIHAILOVIC et al. 1964) à cause de la teneur en amidon du matériel. BOURDET et HERARD (1959) précisent que l'addition de soude 1 N au blé broyé, détermine la formation d'un gel épais brunissant rapidement. Les mêmes auteurs travaillant sur le gluten de blé (1960), signalent l'inefficacité du procédé, cette fois à cause de la richesse en protéines du matériel.

Nous avons pu vérifier que l'application directe de la méthode c'est-à-dire avec 20 cc de NaOH 1 N pour 1 g de blé ou de farine aboutissait à un gel, brun, compact et inutilisable.

Un autre essai a été tenté avec des dilutions de 50 et même de 100, pour du blé, de la farine ou des sons. Nous avons obtenu des extraits de viscosité très élevée (de l'ordre de plusieurs dizaines de poises), dont l'étude serait difficilement concevable.

Il semble donc que la méthode de SCHMIDT-THANNAUSER ne convienne pas du tout aux déterminations d'acides nucléiques dans les graines amylacées, par suite de la gélification de l'amidon et des autres polyholosides en milieu fortement basique.

On pourrait cependant essayer de nouveau, en utilisant une base plus diluée comme NaOH N/10 ou N/20, ce qui éviterait peut-être la formation de gel, mais rien ne prouve que tous les acides nucléiques seraient alors extraits.

L'application du procédé SCHMIDT-TEANHAUSER n'a pas encore été tentée pour les préparations lyophilisées de nucléoprotéines. Il semble cependant que les conditions seraient meilleures pour l'emploi de cette méthode.

- Méthode de SCHNEIDER:

Dans la méthode originale, l'auteur prétend extraire la totalité des acides nucléiques en un seul traitement par l'acide trichloracétique 5% à 90°C. Travaillant sur le grain de blé en cours de maturation, BOURDET et HERARD (1959) utilisent deux extractions de 10 cc d'acide 5% à 90°C, pour 1 g de substance sèche.

Dans notre cas, pour le grain de blé mûr et ses produits de mouture (délipidés), nous avons constaté qu'il fallait quatre extractions de ce type pour obtenir les acides nucléiques, le cinquième extrait n'en contenant que des traces.

En utilisant l'acide perchlorique 0,5 N à 90°C au lieu de trichloracétique, l'efficacité est accrue, car trois extractions suffisent pour atteindre le même résultat.

Exemple: Quantités d'ADN obtenues dans des extractions successives:

	Par APC 0,5 N		Par ATC 5%	
	mg p.100 g blé	%	mg p.100 g blé	%
N°1	85,4	88	54,2	55,8
N°2	10,0	10,3	27,3	28,3
N°3	1,7	1,7	10,3	10,5
N°4	tr.	-	5,4	5,4
N°5	-	-	tr.	-

Généralement pour tous les produits de mouture, trois extractions par l'ATC 5% donnaient toujours moins d'acide nucléique que le PCA 0,5 N dans les mêmes conditions.

Bien qu'inefficace, le procédé est cependant parfaitement applicable selon ses conditions originales, aux préparations protéiques lyophilisées. En revanche, avec du matériel brut comme le grain de blé, on ne peut même pas conserver les conditions initiales de OGUR et ROSEN. En effet, ceux-ci préconisaient des extractions à 70°C par l'acide perchlorique 0,5 N. Or, une telle opération nous conduisait, à cause de la richesse en amidon du matériel, à la formation d'un gel à partir duquel on ne pouvait plus séparer de surnageant après centrifugation.

BOURDET et HERARD, ayant constaté ce phénomène, ont alors abandonné l'acide perchlorique au profit du trichloracétique, qui ne provoque pas cette gélification, à 90°C, se rapprochant ainsi de la technique de SCHNEIDER. De même, la plupart des auteurs travaillant sur les graines de céréales ont renoncé à pratiquer l'extraction à 0°C et ont essayé de doser spécifiquement les deux types d'acides nucléiques sur le seul extrait à chaud. Cela revenait donc aussi à employer la méthode de SCHNEIDER.

b) Conclusions sur les moyens d'extraire les acides nucléiques à partir du matériel végétal étudié:

La solubilisation simultanée des deux types d'acides nucléiques dans les extraits acides à 0°C et la richesse en amidon du matériel gênent considérablement l'extraction séparée de l'ARN et de l'ADN. La seule méthode utilisable semble alors être celle de OGUR et ROSEN simplifiée (une seule série d'extractions à chaud par PCA 0,5 N), ce qui revient approximativement à employer la technique de SCHNEIDER (une seule série d'extractions à chaud par TCA 5%).

Mais si l'extraction à 70°C est praticable avec du matériel purifié, elle ne l'est pas dans les tissus riches en amidon pour lesquels les auteurs ont dû adopter l'acide trichloracétique à 90°C. Nous avons cependant remarqué que si l'acide perchlorique donne un gel en présence d'amidon, à 70°C, en revanche il n'en donne pas à 90°C, de sorte qu'à cette température, on a le choix entre les deux types d'acides.

Ceux-ci ont cependant tous deux des avantages et des inconvénients. Nous donnons ci-dessous la liste de ceux que nous avons constaté le plus souvent:

<u>ACIDE PERCHLORIQUE</u>	<u>ACIDE TRICHLORACETIQUE</u>
Très efficace pour extraire quantitativement les acides nucléiques (3 traitements suffisent).	Moins efficace (4 traitements sont nécessaires).
Absorbe très peu dans l'UV. Les déterminations spectrophotométriques sont praticables.	Absorbe fortement dans l'UV en deçà de 265 nm. Les déterminations spectrophotométriques sont souvent impossibles dans la zone d'absorption nucléaire.

ACIDE PERCHLORIQUE

A 90°C, dissout la quasi totalité de l'amidon, ce qui augmente la turbidité des extraits et entraîne des précipités lors d'une conservation au delà de quelques heures.

ACIDE TRICHLORACETIQUE

Dissout peu d'amidon et présente donc un degré moindre les défauts de l'acide perchlorique.

Ne semble pas agir sur l'aspect physique de l'amidon lors des traitements à 0°C, de sorte que au cours des traitements à chaud, le résidu est net et la décantation est facile.

Ssemblerait agir sur l'aspect de l'amidon lors des extractions à 0°C, de sorte que à 90°C, peu d'amidon est dissous même par l'acide perchlorique, le résidu est gonflé et gélifié, la décantation est imparfaite.

Une partie du matériel à extraire est mal mouillée de sorte que de nombreuses particules ne sont pas centrifugées et restent à la surface du liquide. Pour éviter cela, on peut employer un agent tensio-actif (alcool amylique ou octylique) mais une interférence dans les réactions colorimétriques est alors à craindre.

N'a jamais présenté cet inconvénient.

Pas de défaut correspondant.

Au cours des dosages d'ADN, les extraits trichloracétiques ont parfois tendance à brunir en contact avec le réactif de BURTON.

Compte tenu de ces considérations d'ordre pratique, nous avons longtemps hésité entre ces deux agents d'extraction. Finalement, nous avons penché pour l'acide perchlorique, avec les conditions suivantes:

- 3 extractions à 0°C par l'acide 0,25 N (15 ml/1g MS de produit) durant 3 x 15 minutes,
- 3 extractions à 90°C par l'acide 0,5 N (15 ml/1g. MS de produit) durant 3 x 15 minutes.

La première série d'extractions élimine en particulier les formes acido-solubles de phosphore. Nous verrons que la détermination des acides nucléiques et des nucléotides extraits peut se faire par

spectrophotométrie.

La deuxième série extrait les acides nucléiques qu'il est possible de doser alors grâce au phosphore, étant donné que les autres formes de phosphore ont été, en principe, éliminées à 0°C.

Sur chacun des deux extraits, on pratique aussi des déterminations de l'ADN, le seul des deux acides nucléiques pouvant être dosé spécifiquement.

III - METHODES DE DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES
RESULTATS OBTENUS POUR LE GRAIN DE BLE
ET LES PRODUITS DE SA MOUTURE

Le problème est le suivant: possédant un extrait quantitatif d'acides nucléiques, il s'agit d'en déterminer la teneur exacte. Pour cela, il convient de faire appel aux principales propriétés physico-chimiques des acides nucléiques, par exemple:

- la détermination d'un élément chimique de l'acide nucléique: phosphore ou azote. Compte tenu que l'ADN et l'ARN contiennent environ 9,7% de phosphore et 16% d'azote, un dosage spécifique du P ou du N nucléique permet de déduire les quantités d'acides nucléiques présentes.
- la détermination d'un groupement chimique tel que le ribose, le désoxyribose, les bases puriques ou pyrimidiques. Mais comme les réactions de dosage ne font généralement pas intervenir la totalité des groupements de l'acide nucléique, il est nécessaire de pratiquer aussi la réaction sur un acide nucléique étalon.
- les mesures par spectrophotométrie UV, grâce à l'absorption vers 260 nm des bases puriques et pyrimidiques, mais également par l'intermédiaire d'un étalon.

A - METHODES ANALYTIQUES UTILISABLES

1 - Dosage du Phosphore

Il s'effectue en deux temps: la minéralisation, dont le but est de transformer les formes de P organiques en P minéral, puis le dosage colorimétrique, généralement fondé sur la réduction de l'acide phosphomolybdique.

De nombreuses méthodes ont été proposées. Les plus couramment utilisées sont celles de FISKE et SUBBAROW (1925), (parfois en tenant compte de la modification de KING-1932), de ALLEN (1940) et de BRIGGS (1922). C'est cette dernière méthode que nous utilisons, après adaptation de MACHEBOEUF et DELSAL (1943), pour les dosages colorimétriques. Par contre, les minéralisations ont été effectuées selon le procédé de THIVOLLE. (1944).

a) Principe de la réaction

En présence de molybdate d'ammonium en solution sulfurique, les orthophosphates provoquent l'apparition d'acide phosphomolybdique, lequel peut être réduit, avec formation d'une coloration bleue, par l'hydroquinone en présence de sulfite de sodium. L'intensité de la coloration suit la loi de BEER pour des quantités de P allant de 5 à 50 gamma dans 10 ml.

b) Pratique du dosage

Comme une minéralisation sulfurique ou sulfo-nitrique risque d'amener des pertes en phosphore si on cherche à évaporer tout l'acide sulfurique, ou de modifier la coloration bleue si des traces d'acide demeurent, nous avons adopté la minéralisation nitrique avec catalyseur (nitrate de zinc) selon le procédé de THIVOLLE (1944).

Cette minéralisation est pratiquée dans des matras KJELDAHL jusqu'à disparition de toute coloration brune du résidu et jusqu'à évaporation totale de l'acide nitrique. Après dissolution, les phosphates sont transvasés dans une fiole jaugée à partir de laquelle on prélève des parties aliquotes pour le dosage colorimétrique.

Celui-ci débute par une hydrolyse des pyro et des métaphosphates en orthophosphates, seuls à donner la coloration bleue. Après addition des réactifs d'orthophosphate, on laisse la coloration se développer 30 minutes. L'intensité de la coloration (mesurée dans le procédé initial à l'électrophotomètre de Meunier, écran orangé) est déterminée actuellement au spectrophotomètre électronique Jobin et Yvon, à 700 nm.

La réaction est très sensible et permet donc l'appréciation de quantités de 5 à 50 gamma de phosphore dans les produits de minéralisation nitro-zincique de matières organiques.

2 - Dosage de l'azote

Nous le pratiquons selon la technique KJELDAHL, c'est à dire par minéralisation sulfurique (avec catalyseur $K_2SO_4 - CuSO_4$: 10/1) puis distillation de l'ammoniac avec l'appareil de PARNAS et WAGNER. La précision du procédé est très bonne mais sa pratique est relativement longue.

Nous avons aussi tenté d'évaluer les teneurs en protéines par les méthodes de FOLIN (LOWRY et al. 1951) et du biuret (GORNALL et al. 1949). Mais il faut alors opérer parallèlement avec une protéine témoin car les résultats obtenus dépendent (par l'intermédiaire du nombre de liaisons peptidiques) de l'état de dégradation de la macromolécule protéique.

3 - Dosage du Ribose

Il se pratique généralement suivant la réaction de BIAL, c'est à dire la transformation des pentoses en furfural, en milieu acide concentré, accompagnée d'une coloration en présence d'orcinol (MEJBAUM 1939). L'intensité de la coloration traduisant la teneur en pentoses, il est possible de doser ainsi l'ARN, à condition que le milieu ne contienne pas d'autre pentose que le ribose de l'ARN.

Cependant, une partie seulement du ribose de l'ARN réagit (il s'agit vraisemblablement du ribose purique, car le ribose pyrimidique

/+ (acide sulfomolybdique, sulfite de sodium; hydroquinone)
à la solution...

est beaucoup moins labile. Aussi doit-on utiliser de l'ARN et non du ribose pour étalonner la coloration.

D'autre part, le désoxyribose interfère dans cette réaction. Il faut donc corriger les valeurs trouvées en fonction des quantités présentes d'ADN.

4 - Dosage du désoxyribose

Bien que de nombreuses méthodes aient été mises au point, comme celles de CERIOTTI (1952) par l'indole, de WEBB et LEVY (1958) par la p-nitrophénylhydrazine, la plus communément utilisée est celle de DISCHE (1930) par la diphénylamine, plus récemment améliorée par addition d'acétaldéhyde (BURTON, 1956). C'est cette dernière méthode que nous avons utilisée dans tous les cas.

Son principe repose sur le développement d'une réaction colorée à partir du désoxyribose en présence de diphénylamine. DISCHE utilisait un traitement de 10 mn à 100°C. BURTON a considérablement accru la sensibilité de la réaction en introduisant de très faibles quantités d'acétaldéhyde. Mais la coloration se développe alors à 30°C environ, durant 16 à 20 heures.

Les produits de la réaction, donnant lieu à la coloration bleue que l'on apprécie au spectrophotomètre à 600 nm, sont encore mal connus. De plus, seule une proportion de 46 à 48% du désoxyribose de l'ADN réagit. En conséquence, la coloration doit être étalonnée avec de l'ADN pur et non avec du désoxyribose.

Cette réaction, d'un emploi très simple, est très sensible. Elle permet de doser des quantités de l'ordre de 2 à 40 gamma d'ADN.

5 - Détermination des bases puriques et pyrimidiques

Comme la thymine et l'uracile sont respectivement spécifiques de l'ADN et de l'ARN, un dosage de ces bases permet de connaître les teneurs en acides nucléiques correspondants. Nous n'avons pas encore pratiqué cette opération. Nous pensons le faire ultérieurement avec l'une des méthodes suivantes: JERVELL et al. (1958), DUTTA (1959) ou McDONALD (1954), lesquelles utilisent des combinaisons de la chromatographie sur papier et d'échange d'ions.

6 - Mesures spectrophotométriques

L'absorption des composés nucléiques à 260 nm, due aux bases puriques et pyrimidiques, permet des déterminations quantitatives, à condition que le spectre UV ne soit pas contaminé par des composés non nucléiques (comme les protéines qui absorbent vers 280 nm). Comme le spectre UV est rarement identique à celui d'un acide nucléique pur, de nombreux auteurs comptent, pour l'absorption due uniquement aux acides nu-

Densité optique

SPECTRE U.V.

D'ARN DE LEVURE

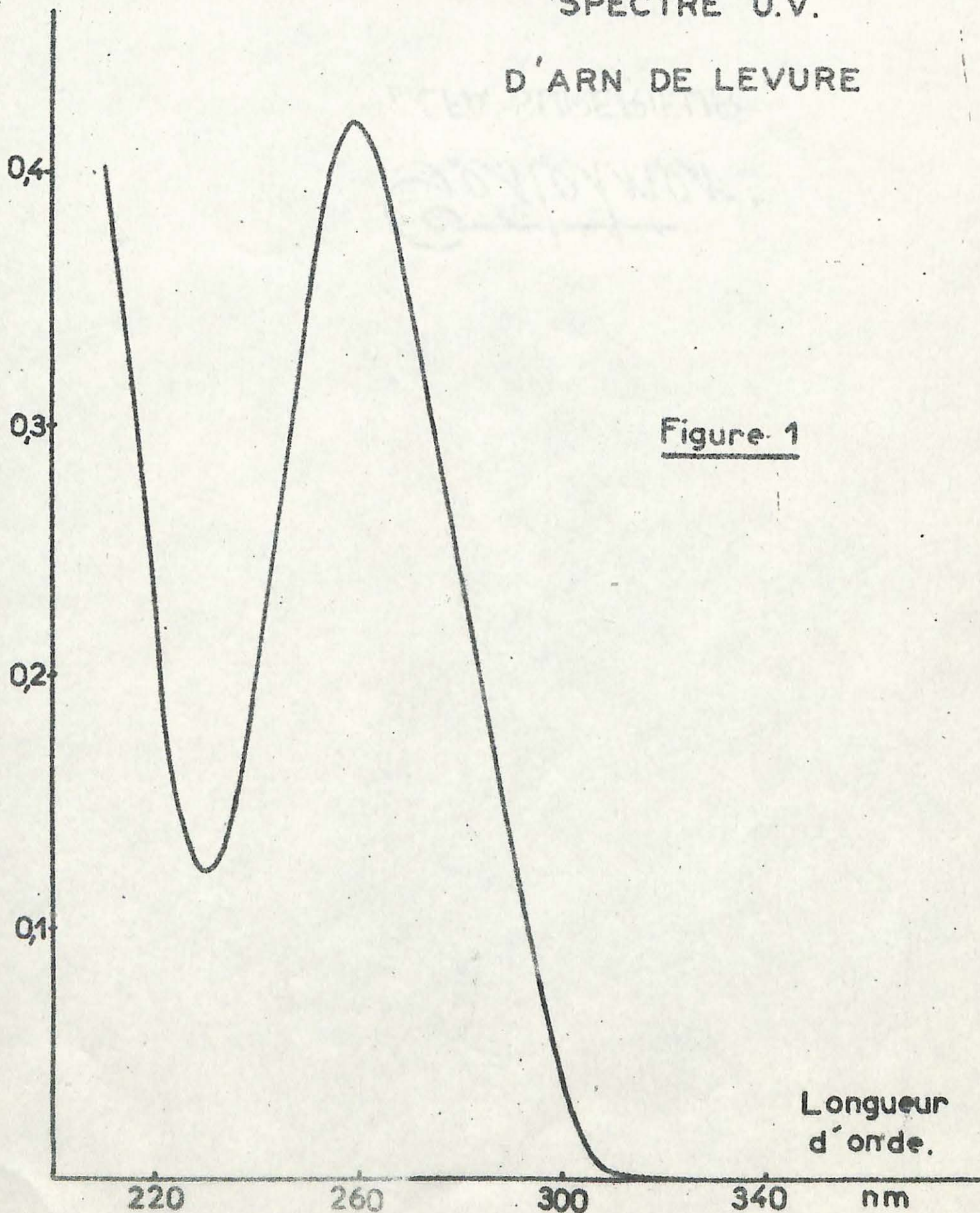


Figure 1

Longueur
d'onde.

220

260

300

340

nm

Densité optique
à 265 nm

DOSAGE DE L'ADN
PAR SPECTROPHOTOMETRIE

Courbe d'étalonnage à partir
d'un ADN de thymus

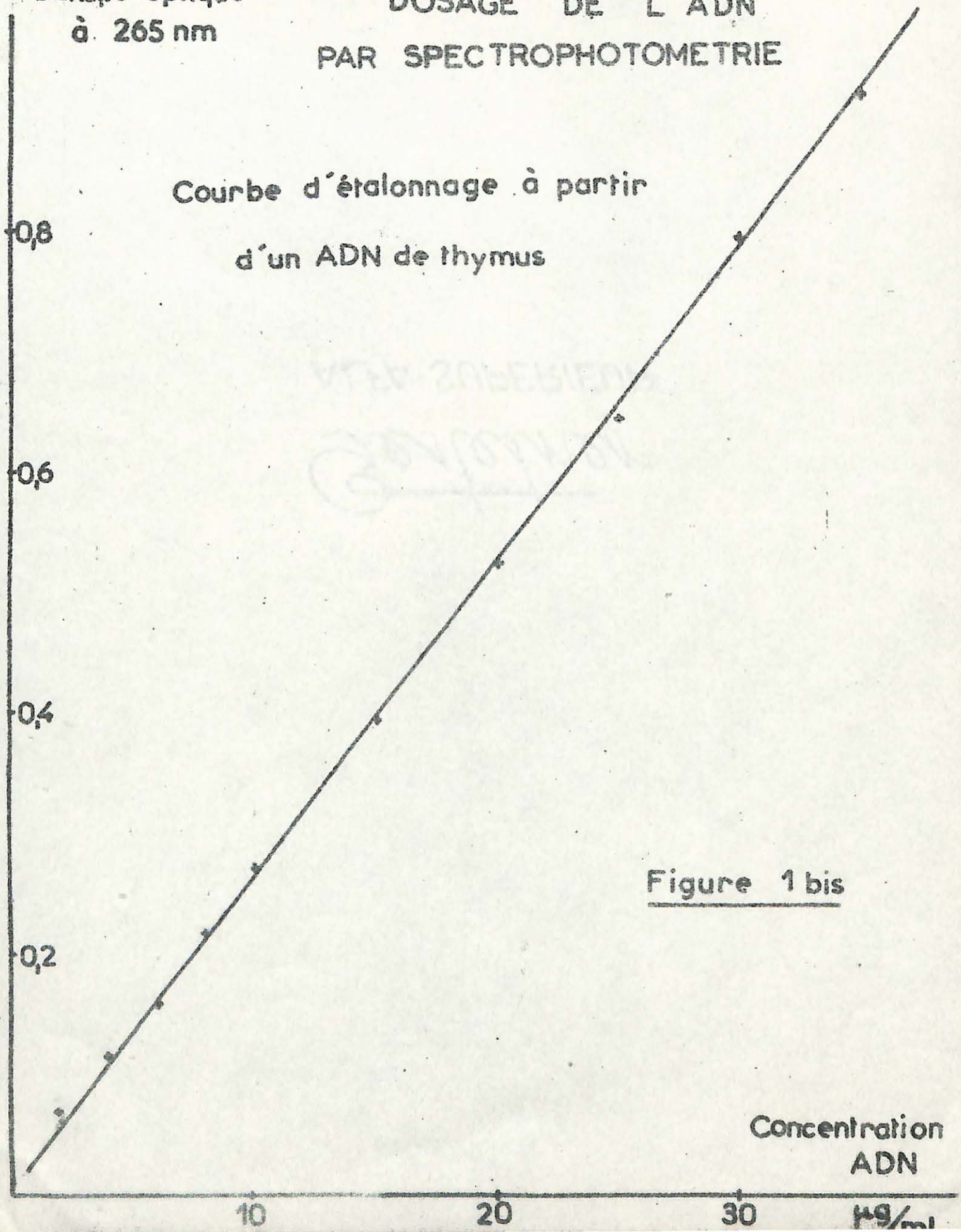


Figure 1 bis

Concentration
ADN

10

20

30

40 µg/ml

cléiques, la différence entre les densités optiques à 260 et à 290 nm. Les teneurs en acides nucléiques sont connues en comparant l'absorption mesurée à une droite d'étalonnage tracée à partir d'un ARN ou d'un ADN purifié.

B - APPLICATION DE CES METHODES

Nous allons étudier ici les problèmes qui surgissent lors de l'application des procédés de dosage à notre matériel végétal. Cela nous permettra d'apporter quelques critiques à ces méthodes et de signaler aussi les solutions que nous avons cru bon d'adopter dans certains cas.

1 - Dosage du phosphore dans les extraits contenant les acides nucléiques ainsi que dans le matériel végétal brut:

Nous nous proposons de doser les acides nucléiques dans les extraits perchloriques à 0°C, le dosage du P ne nous renseigne pas du tout sur la présence d'acide nucléique, car cette extraction a pour but d'éliminer les formes de P non nucléiques. Nous avons cependant toujours effectué cette détermination, d'une part pour connaître la proportion de P acido-soluble, d'autre part en vue de vérifier à la fin des opérations si le bilan du phosphore est bien quantitatif.

Par contre, dans les extraits perchloriques à 90°C, le P-nucléique est, en principe, la seule forme présente, d'où l'intérêt du dosage. Enfin, nous avons toujours constaté que le résidu après extraction des acides nucléiques contenait encore du phosphore. Ce P-résiduel a été signalé dans les travaux de BOURDET et HERARD (1959), HALL et HODGES (1966) sur l'avoine et de BOURDET et FEILLET (1967) sur les farines. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que ce phosphore pourrait être soit protéique, soit glucidique (P lié à l'amidon).

a) Difficultés rencontrées dans la détermination du P-nucléique

Lors de l'analyse des préparations protéiques lyophilisées, les dosages de phosphore nucléique n'ont pas occasionné de problème particulier et les résultats obtenus ne semblent pas être douteux car ils coïncident avec les valeurs trouvées par spectrophotométrie UV.

Par contre, dans les extraits perchloriques à 90°C des blés et des produits de mouture, les teneurs en P "nucléique" nous sont apparues anormalement élevées, en particulier dans les produits riches en amidon tels que la farine, où les valeurs d'acides nucléiques calculées d'après l'absorption UV (non corrigée) à 260 nm.

Afin de mieux comprendre ce problème, ainsi d'ailleurs que celui du P-résiduel, nous avons émis l'hypothèse qu'une partie du P extrait par l'acide perchlorique à 90°C pourrait avoir l'amidon pour origine. On sait, en effet, que l'amidon de blé, même purifié et délipidé, contient encore 0,04% environ de phosphore. Mais on ignore encore la nature exacte de ce phosphore.

/+ et à 90° C. Dans l'extrait à 0° C,...

/x le P atteignent environ le double de celles obtenues d'après...

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons soumis de l'amidon de blé délipidé aux mêmes extractions perchloriques à 0°C et à 90°C. Nous avons alors trouvé que 15% environ du phosphore présent initialement dans l'amidon étaient extraits à 0°C, 75% en moyenne se retrouvaient dans l'extrait à 90°C; 10% enfin demeuraient dans le résidu final. Comme le blé contient 64 à 68% d'amidon, et si cet amidon renferme environ 0,04% de P non lipidique, on peut imaginer que les 3/4 environ de ce P vont être entraînés par l'acide perchlorique à 90°C et vont interférer avec le P-nucléique. Or, l'erreur entraînée est considérable car le calcul montre que le "P-glucidique" extrait à 90°C représenterait environ 20 mg de P pour 100 g de blé, c'est à dire 40% environ du phosphore total de l'extrait à 90°C.

On aurait pu penser qu'une partie, au moins, de cette forme indéterminée de phosphore de l'amidon est d'origine nucléique. On sait en effet que, lors de la biosynthèse des grains d'amidon, on trouve des acides nucléiques dans les plastides. Mais l'examen du spectre UV de l'extrait contenant du P-glucidique ne montre pas de véritable absorption du type nucléique. 3% tout au plus du P total de l'amidon de blé analysé serait, d'après nous, d'origine nucléique ou nucléotidique.

D'autre part, la présence de P-résiduel, même à partir d'amidon pur, pourrait s'expliquer de deux manières:

- ou bien le P de l'amidon est si fortement lié que 3 extractions perchloriques ne suffisent pas pour l'éliminer en totalité. Ce phénomène pourrait alors se produire également dans les blés et farines, ce qui expliquerait l'origine du P-résiduel dans ces produits, d'autant plus que les quantités de "P-résiduel" d'un amidon sont du même ordre que celles d'un blé (compte tenu de la teneur du blé en amidon).
- ou bien s'agit-il d'un résidu de P-lipidique que l'opération de délipidation préalable n'a pas éliminé (nous avons en effet signalé son imperfection dans certains cas). Bien que pour les matériels non délipidés, le P-résiduel soit plus élevé que pour les autres, il ne semble pas que cette explication soit la seule, car les valeurs de P-résiduel sont parfois très élevées (30% du P total) dans des produits riches en amidon comme certaines farines américaines (BOURDET et FEILLET, 1967).

Nous avons constaté également une différence d'action sur l'aspect physique de l'amidon entre les acides perchloriques et trichloracétique: le premier forme un gel à 70°C avec les produits amyliques, mais n'en forme plus à 90°C par le fait qu'à cette température, il dégrade l'amidon au point d'en dissoudre la quasi totalité. En revanche, l'acide trichloracétique à 90°C provoque un léger gonflement de l'amidon mais ne semble pas en dissoudre de quantités notables. Ces faits, constatés de visu, ont permis à BOURDET et HERARD (1959) de penser que par l'emploi d'acide trichloracétique, on ne risquait pas d'entraîner de P glucidique, lequel devait alors demeurer dans le rési-

du d'extraction. Pour notre part, nous avons constaté que, dans notre matériel, il en allait différemment car, même l'acide trichloracétique qui, apparemment dégrade peu l'amidon, entraîne à 90°C également 75% environ du P total de cet amidon.

Nous avons alors essayé d'extraire les acides nucléiques à une température inférieure au point de gélification de l'amidon, pensant ainsi éviter l'interférence de son phosphore. Mais, en dehors du fait qu'à cette température il est quasiment impossible d'extraire quantitativement les acides nucléiques, même à 55°C, plus de 20% de P glucidique sont déjà extraits.

Les recherches sont donc encore à poursuivre dans ce sens en vue de mieux préciser les faits, de déterminer la nature de cette forme de phosphore et de trouver un moyen analytique pour la séparer de la forme nucléique. Dans l'état actuel de notre travail, l'interférence du "P glucidique" (ce terme étant bien entendu la conséquence de notre hypothèse) semble donc difficile à éviter.

b) Solution proposée

Dans ces conditions, il ne semble pas possible d'obtenir des valeurs précises de P-nucléique par l'intermédiaire des dosages de phosphore. Il faudrait en effet doser l'amidon dans chacun des produits, l'extraire quantitativement, doser le P non nucléique qui lui est lié et retrancher cette valeur du P total dosé à 90°C, méthode qui serait donc très complexe.

Jusqu'à ce jour, nous avons pu seulement évaluer les teneurs approximatives en amidon des différents produits analysés et nous en avons déduit les quantités théoriques de P glucidique susceptibles d'interférer avec le P-nucléique. Ce moyen est évidemment très criticable car, hormis l'incertitude sur les valeurs estimées, on pourrait concevoir que l'amidon présent au centre du grain et celui qui reste accroché aux particules de sons, sont biologiquement et chimiquement différents et n'ont probablement pas la même teneur en phosphore.

Dans l'attente d'améliorations de cette détermination d'acides nucléiques, nous ne pouvons proposer qu'une simple estimation en retranchant des valeurs du dosage dans l'extrait à 90°C, les valeurs calculées théoriquement, de P non nucléique. La correction est évidemment faible pour les sons qui ne contiennent que 13% environ d'amidon et pour lesquels le P-glucidique est négligeable devant les autres formes de phosphore. Mais dans la farine, qui contient environ 77% d'amidon, le P-glucidique représenterait 20% du P total (17% seulement pour le P-nucléique).

c) Résultats et discussions

Le tableau 1 exprime les quantités des différentes formes de P dans le blé et les produits de mouture, ainsi que les pourcentages de ces formes par rapport au P total.

Tableau 1 - IMPORTANCE DES DIFFERENTES FORMES DE PHOSPHORE
DANS LE BLE ET LES PRODUITS DE SA MOUTURE

	Blé	Farine	Remoulages blancs	Remoulages Bis	Gros Sons
en mg de P/100 g MS de produit	100 %	78,3%	1,6%	5,8%	14,3%
P total	426	111	752	1255	1933
P acido-soluble à 0°C	375	61	647	1103	1813
P extractible à 90°C (glucidique + nucléique)	53	42	99	153	89
P lipidique	9	8	18	25	31
P résiduel	7	7	8	6	2
Total ...	444	118	775	1287	1936
en % par rapport au P total					
P acido-soluble à 0°C	88,0%	54,7	86,0	87,3	95,1
P extractible à 90°C	12,4	37,8	13,1	12,1	4,7
P lipidique	2,2	7,4	2,5	2,0	1,6
P résiduel	1,6	6,9	1,0	0,5	0,1
Total ...	104,2%	106,8%	102,6%	101,9%	101,5%

Il apparait que les produits de mouture les plus riches en P sont ceux qui correspondent à la périphérie du grain. L'amande farineuse est beaucoup plus pauvre.

Lorsqu'on exprime ces valeurs par rapport au P total de chaque produit, on constate que la forme acido-soluble à 0°C (essentiellement P-phytique) domine dans tous les cas mais qu'elle est relativement faible dans le centre du grain et très importante dans les enveloppes (95% du P total des sons). La forme de P extrait à 90°C qui représente les P nucléique et glucidique prend des valeurs élevées dans la farine, vraisemblablement à cause de la richesse en amidon de ce produit. Enfin on constate que la teneur en P-résiduel croît parallèlement à la teneur en amidon des produits.

En calculant parallèlement le P total et les valeurs du P dans chaque catégorie (lipidique, acido-soluble, nucléique + glucidique, résiduel), on constate que le bilan des extractions est quantitatif, aux erreurs expérimentales près.

Le tableau 2 exprime les mêmes résultats en tenant compte de l'importance par rapport au grain entier, de chaque fraction de mouture. Ces résultats figurent à la fois en valeur absolue (mg de P pour 100 g de blé sec) et en valeur relative (% du P total du grain). Dans ce dernier cas, nous n'avons inscrit que les valeurs non négligeables afin de mieux faire apparaître l'origine histologique de chacune des formes biochimiques de phosphore.

On remarque donc que le P total du grain est constitué, pour 61%, du P acido-soluble des sons, essentiellement de nature phytique.

Le tableau 3, contrairement aux tableaux 1 et 2 où ne figurent que des valeurs obtenues par dosage, donne un exemple des calculs d'estimation du P-nucléique. D'après les % estimés d'amidon dans les différents produits (d'après BECHTEL et al. 1964), nous avons calculé le P-glucidique correspondant (0,04%) puis le P-glucidique supposé extrait à 90°C (75% du total) et, retranchant ces valeurs du P total dosé à 90°C, nous avons trouvé le P-nucléique.

Le même tableau donne les résultats en tenant compte de l'importance relative de chaque fraction, c'est à dire en % du grain entier.

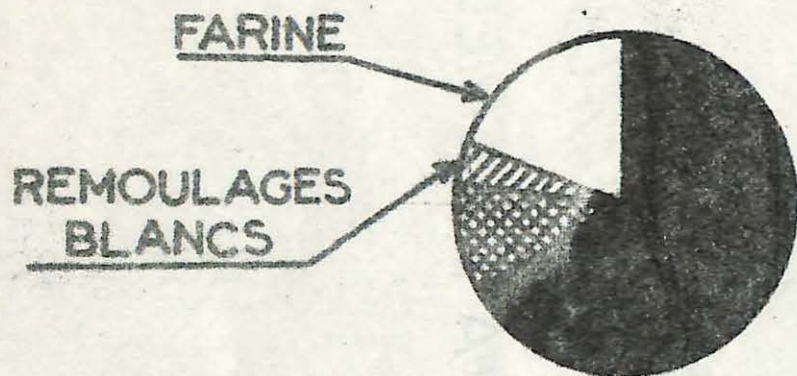
Il apparait que, malgré la faible teneur des parties centrales du grain en phosphore nucléique, c'est la farine qui en apporte le plus, et cela à cause de son importance pondérale.

Tableau 2 : COMPOSITION PHOSPHOREE DU BLE ET DES PRODUITS DE SA MOUTURE.

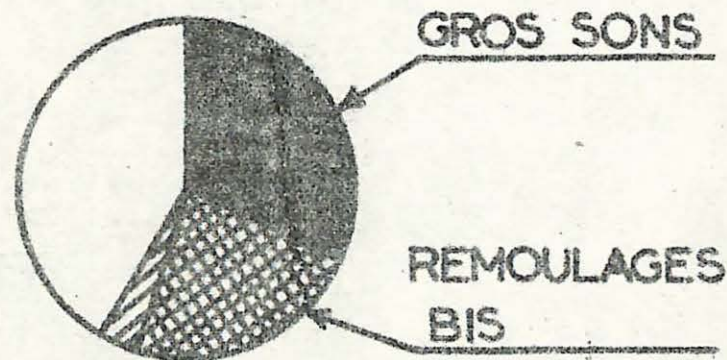
	Farine	Remoulages blancs	Remoulages bis	Gros Sons
P total	87	12,2	73	276
P lipidique	6,3	0,3	1,4	4,4
P à 0°C	48	10,4	64	260
P à 90°C	33	1,6	8,9	12,7
P résiduel	5,5	0,1	0,3	0,3
Total	92,8	12,4	74,6	277,4
En ramenant au % par rapport au grain entier:				
P total	20,4	3,5	17,0	64,7
P à 0°C	11,0	2,4	15,0	61,0
P à 90°C	7,7	-	2,1	3,3
P résiduel	1,3	-	-	-
P lipidique	1,5	-	-	1,0

« ORIGINE HISTOLOGIQUE »
DES DIFFÉRENTES FORMES DE PHOSPHORE DU
GRAIN DE BLÉ

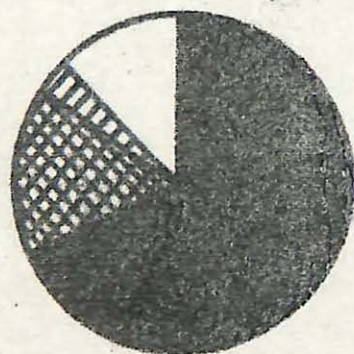
Figure 1 ter



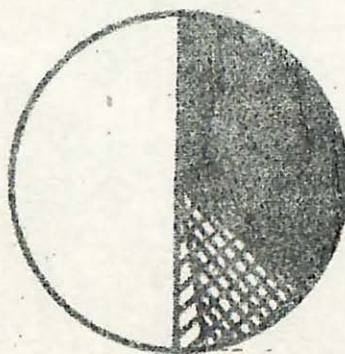
P-TOTAL



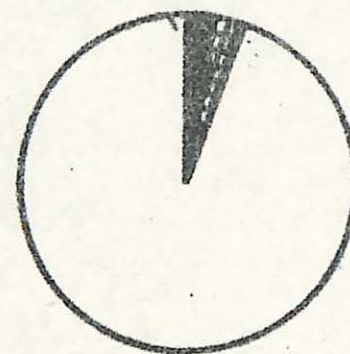
P-NUCLÉIQUE



P-PHYTIQUE



P-LIPIDIQUE



P-GLUCIDIQUE (?)

ESTIMATION DU PHOSPHORE NUCLEIQUETableau 3

mg. de P / 100 g. de produit m.s.	Blé	Farine	Remoulages blancs	Remoulages bis	Gros Sons
P total 90°C	53	42	99	153	89
% d'amidon estimés d'a- près BECHTEL	64	77	22	22	13
P "glucidique" sur la base de 0,04%	25	31	9	9	5,2
P "glucidique" extrait à 90°C sur la base de 75% du P "glucidique" total	19	23	7	7	4
P nucléique	34	19	92	126	85

Tenant compte de l'importance des différentes fractions;

mg. de P / 100 g. de blé m.s.	Blé	Farine	Remoulages blancs	Remoulages bis	Gros Sons
P total 90°C	53	32	1,6	8	12
% d'amidon/blé	64	60	0,3	1,3	1,8
P "glucidique"	25	24	0,1	0,5	0,7
P "glucidique" à 90°C	19	18	0,1	0,3	0,5
P nucléique	34	15	1,5	8,5	12

2 - Dosage de l'azote

La détermination des acides nucléiques par l'intermédiaire de l'azote est impossible dans le matériel étudié à cause de la présence des protéines qui apportent de grandes quantités d'azote.

Ainsi, si l'on considère (comme nous le signalerons plus loin) que 100 g de blé contiennent environ 400 mg d'acides nucléiques, cela correspond à 65 mg d'azote nucléique. Or, ce même blé a une teneur en azote protéique de 2130 mg p.100 g.. L'azote nucléique ne représente donc que les 3% de l'azote total du grain. En conséquence, même en séparant au mieux les deux formes d'azote, la moindre interférence des protéines se traduirait par un écart considérable sur les valeurs d'acides nucléiques.

Nous avons cependant pratiqué les dosages d'azote total dans les extraits perchloriques à 0° et 90°C, ainsi que dans les extraits de délipidation, pour vérifier si de l'azote protéique était entraîné lors de ces traitements.

Le tableau 4 donne ces résultats en mg d'N pour 100 g de produit ainsi que pour 100 g de blé (en tenant compte de l'importance relative de chaque fraction). Il apparaît que, seule, une très faible proportion d'azote total (4 à 10%) est extraite par les différents agents:

- nous avons vu plus haut que 1,5 à 2% étaient éliminés à la délipidation. Cet azote qui n'est certainement pas tout d'origine phospholipidique recouvre probablement de l'azote aminé, peptidique et peut-être protéique. (Les protéines du type prolamine, qui sont solubles dans l'éthanol dilué, pourraient être très partiellement entraînées par l'éthanol de la délipidation).
- l'extrait perchlorique à 0°C qui, sans l'opération de délipidation préalable, devrait renfermer l'azote "non protéique" (acides aminés), ne contient ici que de très faibles quantités d'azote. Les valeurs données ne sont que des ordres de grandeur car l'erreur relative sur ces nombres est importante. Cependant, ces quantités pourraient être assimilées à l'azote des acides nucléiques et des nucléotides de l'extrait à 0°C.
- l'extrait à 90°C renferme également des quantités d'azote qui sont du même ordre que celles calculées à partir des acides nucléiques présents. Il semblerait donc que ni l'extrait à froid, ni l'extrait à chaud ne contiennent des quantités notables de protéine, ce qui confirme la propriété d'agent précipitant de l'acide perchlorique.

REPARTITION DE L'AZOTE TOTAL AU COURS DES TRAITEMENTS
DE DELIPIDATION ET D'EXTRACTIONS PERCHLORIQUES

Tableau 4

mg N/100 g	Blé	Farine	Remoulages blancs	Remoulages bis	Gros Sons
N lipidique	37	26	35	37	33
N à 0°C	9	3	5	7	9
N à 90°C	96	100	231	262	133
N total	2130	1905	3080	3160	2860
En ramenant en %:					
N lipidique	1,7%	1,1%	1,1%	1,1%	1,1%
N à 0°C	0,42%	0,10%	0,16%	0,22%	0,32%
N à 90°C	4,5%	5,2%	7,5%	8,2%	4,6%

3 - Dosage du ribose et de l'ARN

Tous les auteurs qui ont travaillé sur des matériels végétaux contenant des pentosanes ont noté l'échec de cette méthode en vue de la détermination de l'ARN. En effet, par hydrolyse, les pentosanes, très importants dans le grain de blé, libèrent des pentoses, lesquels sont dosés avec le ribose dans la réaction de BIAL. Comme il ne semble pas exister de méthodes permettant de distinguer le ribose de l'ARN des autres pentoses, il semble que toutes les réactions de dosage de l'ARN fondées sur ce principe soient vouées à l'échec.

Dans ces conditions, nous n'avons pas mis ce procédé en oeuvre attendu que nous aurions obtenu des résultats en ARN anormalement élevés.

4 - Dosage du désoxyribose et de l'ADN

Nous l'avons pratiqué très couramment, dans tous les extraits contenant des acides nucléiques. Comme c'est une réaction sensible et spécifique de l'ADN (car il n'y a pratiquement pas d'autre forme de désoxyribose dans les tissus analysés), nous l'avons utilisée pour détecter la présence d'acides nucléiques et éventuellement doser l'ADN. Ce dosage s'effectue à l'aide d'une droite d'étalonnage tracée avec un ADN de thymus purifié.

Le dosage a échoué seulement dans les extraits contenant les lipides car l'éther semble donner avec le réactif de BURTON une coloration violacée qui vient donc fausser le dosage.

a) Résultats obtenus

Le tableau 5 exprime les résultats obtenus pour les déterminations d'ADN dans le blé et les produits de mouture en distinguant les fractions extraites à 0°C et à 90°C. De plus, l'ADN total a été rapporté aussi au grain entier en tenant compte des proportions relatives de chaque produit.

Il apparaît que les fractions les plus riches en ADN sont les remoulages, qui contiennent les germes. Cependant, rapportées au grain entier, ces valeurs montrent que l'ADN issu des parties centrales du grain est quantitativement le plus important.

Nous notons également que la fraction d'ADN extraite à 0°C est variable selon les produits: de 4% dans les remoulages bis, elle atteint 18% dans la farine. Nous n'avons pas expliqué cette différence.

b) Discussion

- D'après BURTON, les mesures au spectrophotomètre doivent se faire à 595 ou 600 nm. Le spectre de la coloration bleue du désoxyribose avec la diphénylamine présente en effet un maximum pour cette longueur

TENEURS EN ADN DES DIFFERENTS PRODUITS ANALYSES

Tableau 5

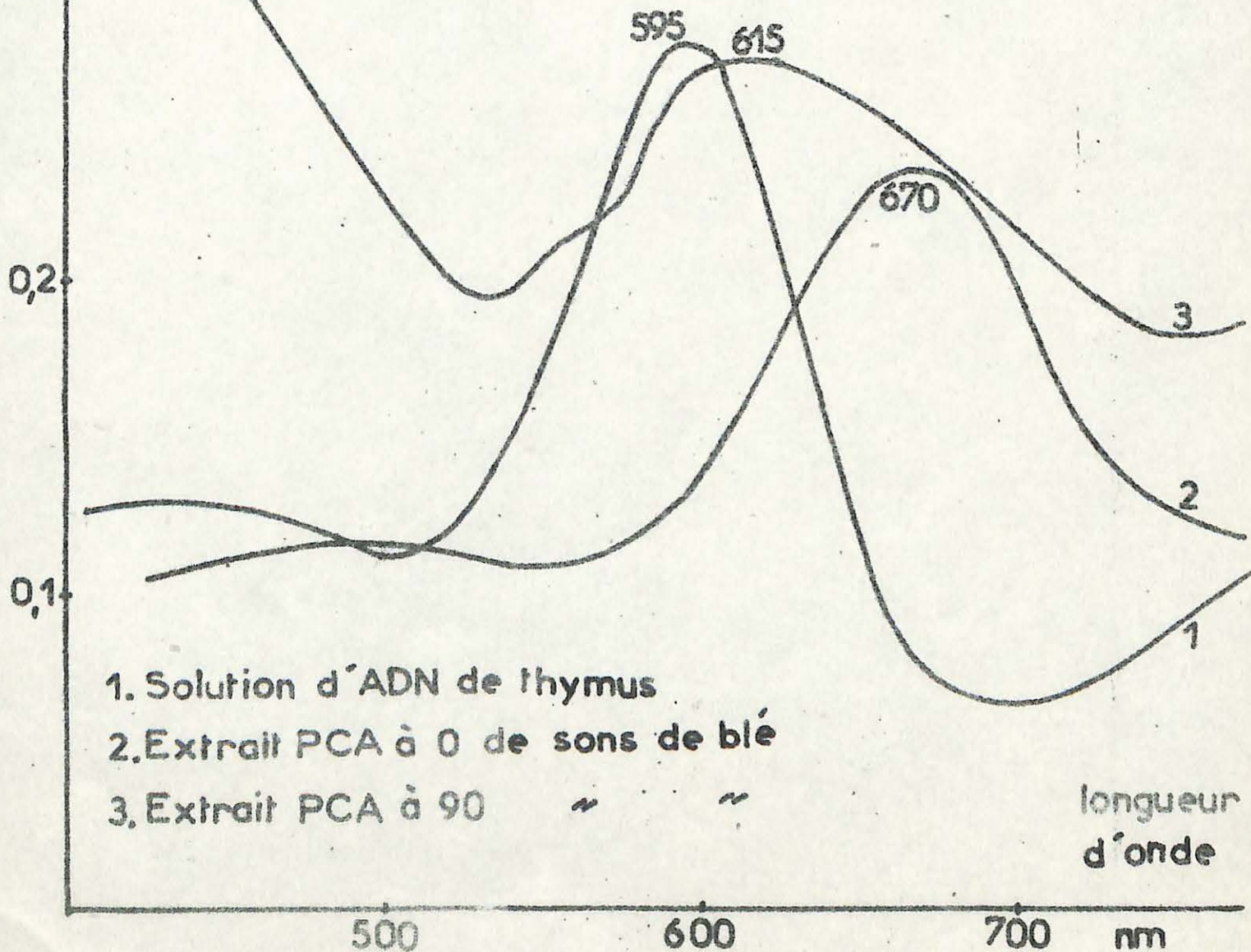
En mg p.100 g de produit	Blé	Farine	Remoulages blancs	Remoulages bis	Gros Sons
ADN 0°C	9,0	9,0	14,9	17,8	11,5
ADN 90°C	89,4	40,6	256,2	420,6	287,1
ADN total	98,4	49,6	271,1	438,4	298,7
% / grain entier					
ADN total	111,2	38,8	4,3	25,4	42,7

Densité
optique

DOSAGE DE L'ADN SELON LA METHODE DE DISCHE-BURTON

Spectre de la coloration

Figure 2



- 1. Solution d'ADN de thymus
- 2. Extrait PCA à 0 de sons de blé
- 3. Extrait PCA à 90 " "

longueur
d'onde

d'onde. Nous avons vérifié ce fait avec des solutions d'ADN purifié (figure 2). Par contre, la coloration obtenue à partir d'extraits perchloriques est parfois un peu différente. Nous avons tracé le spectre dans le cas des sons. Il apparaît que le maximum se trouve décalé vers 615 nm pour les extraits à chaud et à 670 nm pour les extraits à froid. Dans ce dernier cas, des mesures à 600 nm ne sont donc certainement pas représentatives des teneurs en ADN.

- La gamme étalon d'ADN a été faite avec une solution qui n'a pas subi de traitement à chaud. Cet étalonnage convient pour les extraits acides à froid. Pour les extraits à 90°C, les écarts ne doivent pas être très importants car BURTON pense que le traitement antérieur de l'ADN a peu d'influence sur la coloration. Il faudrait cependant le vérifier dans notre cas.

- De même, les déterminations d'ADN dans les extraits à froid ont été effectuées avec la même droite d'étalonnage. Or, dans ces extraits se trouvent des nucléotides qui ne réagissent peut-être pas comme les ADN polymérisés, d'où une nouvelle erreur dont il faudrait tenir compte. Notons cependant que l'étalonnage avec un ADN de thymus permet des mesures exactes avec l'ADN de blé car il a été montré que tous les ADN réagissent de façon identique.

5 - Dosage des bases puriques et pyrimidiques

Nous ne l'avons pas encore pratiqué. Ce sera par la suite un excellent moyen de confirmation des résultats obtenus par dosage du P ou par absorption UV à 260 nm.

6 - Détermination par spectrophotométrie UV

Nous avons étudié les spectres UV de toutes les catégories d'extraits. Cependant tous les spectres n'ont pu être utilisés en vue de déterminer les acides nucléiques.

Les extraits perchloriques à 0°C, généralement limpides, contiennent peu de corps absorbant dans l'UV à l'exception des composés nucléiques présents. Aussi leur spectre UV est-il toujours du type nucléique, avec un maximum d'absorption à 260 ou 265 nm. Comme il y a peu de corps contaminants, la valeur de l'absorption à 260-265 nm ou, du moins, la différence entre les densités optiques à 260 et 290 nm comme le préconisent de nombreux auteurs, traduit la teneur en composés nucléiques.

En revanche, les extraits à chaud sont rarement exploitables car de nombreux composés entraînés à cette température absorbent dans l'UV et masquent le spectre caractéristique des acides nucléiques.

a) Résultats obtenus

La figure 3 représente les spectres UV des extraits perchloriques à 0° et à 90°C du blé. Comme on peut le constater, on est assez éloigné du spectre de l'acide nucléique pur, même dans les extraits à 0°C. Nous avons essayé, sans succès, de déterminer l'absorption due aux composés nucléiques en corrigeant le spectre de sa turbidité, par application de la relation de RAYLEIGH, comme cela se pratique pour les spectres de protéines. Mais la présence d'une absorption parasite vers 320 nm nous en a empêché. Pour la même raison, nous avons pensé que la meilleure expression de l'absorption nucléique était $DO_{265} - DO_{295}$ et nous avons cru bon d'utiliser cette formule.

Le spectre de l'extrait à 90°C n'a rien de commun avec celui d'un acide nucléique. On y trouve des pics à 280 et à 320 nm, tandis que le pic des acides nucléiques (présents dans le milieu comme en témoigne la réaction de BURTON) est totalement masqué. Dans ces conditions, il était impossible de déduire un teneur en acide nucléique par ce procédé. Nous avons donc abandonné les mesures spectrophotométriques dans la plupart des extraits à chaud (pour le blé et ses produits de mouture), ce qui nous a contraint d'opérer les déterminations par l'intermédiaire du P nucléique (procédé dont on a ci-dessus longuement étudié les défauts).

Les seuls résultats que nous puissions donner grâce à la spectrophotométrie sont donc les teneurs en acides nucléiques et nucléotides des extraits à 0°C. Ces valeurs ont pu être obtenues par l'utilisation d'une droite d'étalonnage tracée à partir d'un ARN purifié de levure. On pourrait nous reprocher de doser les deux types d'acides nucléiques par une droite d'étalonnage d'ARN, mais il se trouve que l'ADN et l'ARN donnent pour les mêmes concentrations des absorptions très voisines. Il convient cependant de donner les résultats en "équivalents d'ARN".

La figure 4 regroupe les spectres UV des extraits à 0°C des différents produits de mouture. Leur exploitation n'est pas toujours simple mais on peut arriver à en tirer des valeurs approchées. Voici les teneurs en acides nucléiques des extraits perchloriques à 0°C:

	<u>BLE</u>	<u>FARINE</u>	<u>REMOULAGES</u> <u>BLANCS</u>	<u>REMOULAGES</u> <u>BIS</u>	<u>GROS</u> <u>SONS</u>
mg AN totaux (en ARN) p/100 g de produit	89	21	77	128	53

La figure 5 regroupe les spectres UV des extraits à 90°C. Seul celui de la farine laisse apparaître une vague absorption nucléique. La valeur de cette absorption donne une teneur d'acides nucléiques par excès mais qui est très inférieure au résultat obtenu par dosage du P. Ce fait a été pour nous la preuve qu'une forme de P non nucléique se trouvait dans les extraits perchloriques à 90°C.

SPECTRES U.V. D'EXTRAITS
PERCHLORIQUES DE BLÉ.

1 à 0°C

2 à 90°C

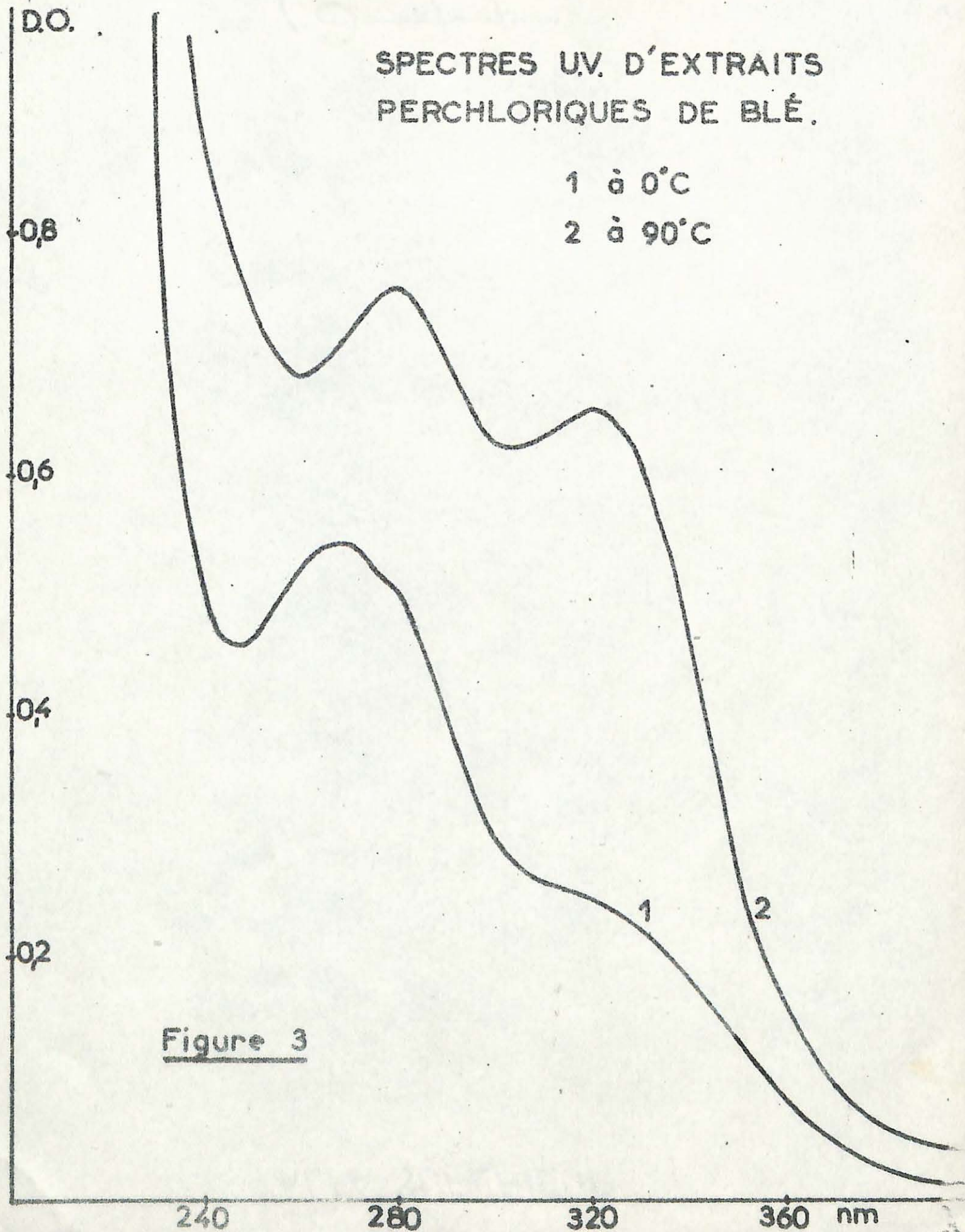


Figure 3

Densité
Optique

SPECTRES UV. D'EXTRAITS HClO_4
DE 4 PRODUITS DE LA MOUTURE
D'UN BLÉ CAPPELLE
(Extractions à 0°C)

1,00

0,75

0,50

0,25

1 - Farine

2 - Remoulages blancs

3 - Remoulages bis

4 - Gros sons

Figure 4

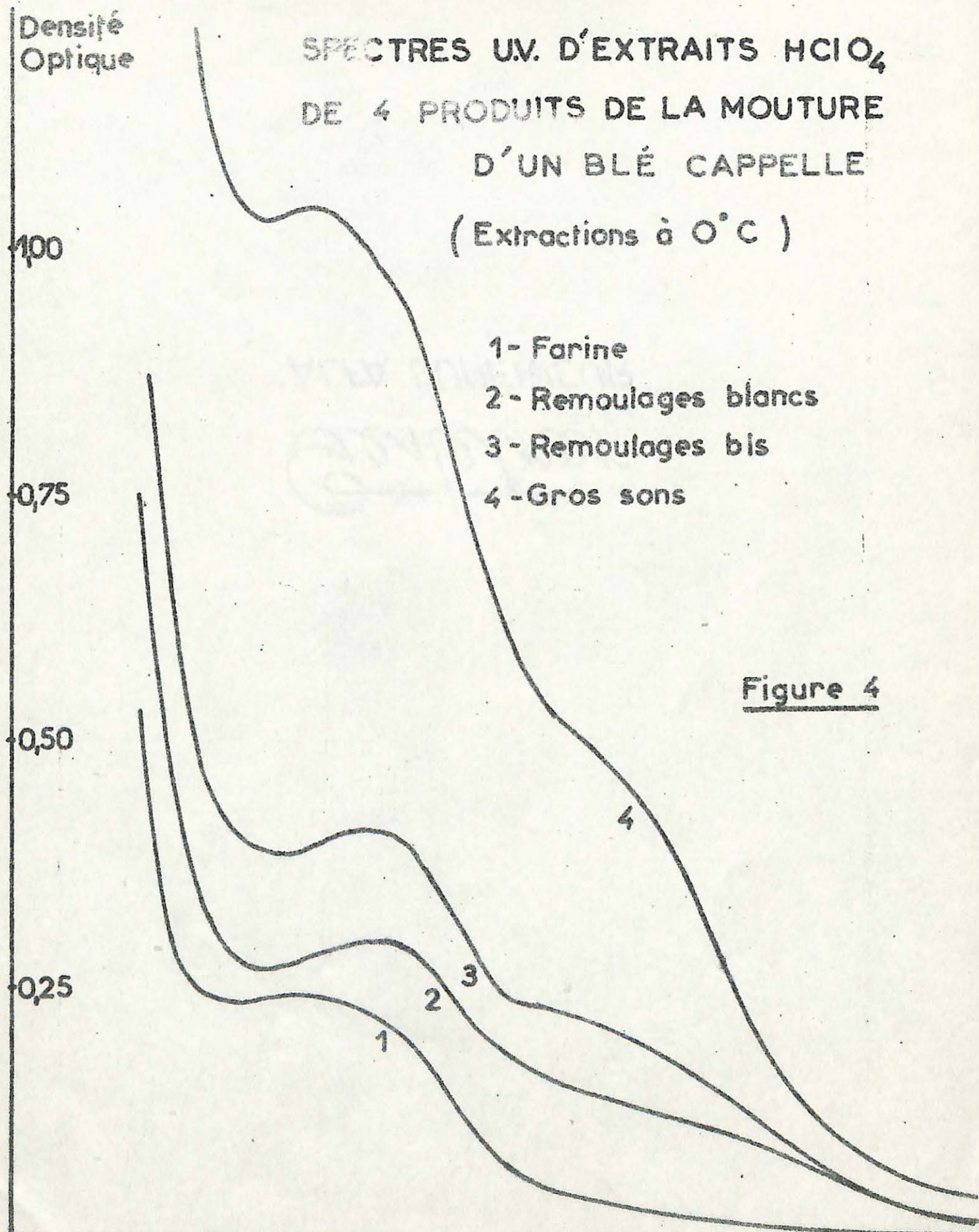
240

280

320

360 nm

λ



SPECTRES UV. D'EXTRAITS HClO_4
DE 4 PRODUITS DE LA MOUTURE
D'UN BLÉ CAPPELLE
(Extractions à 90°C)

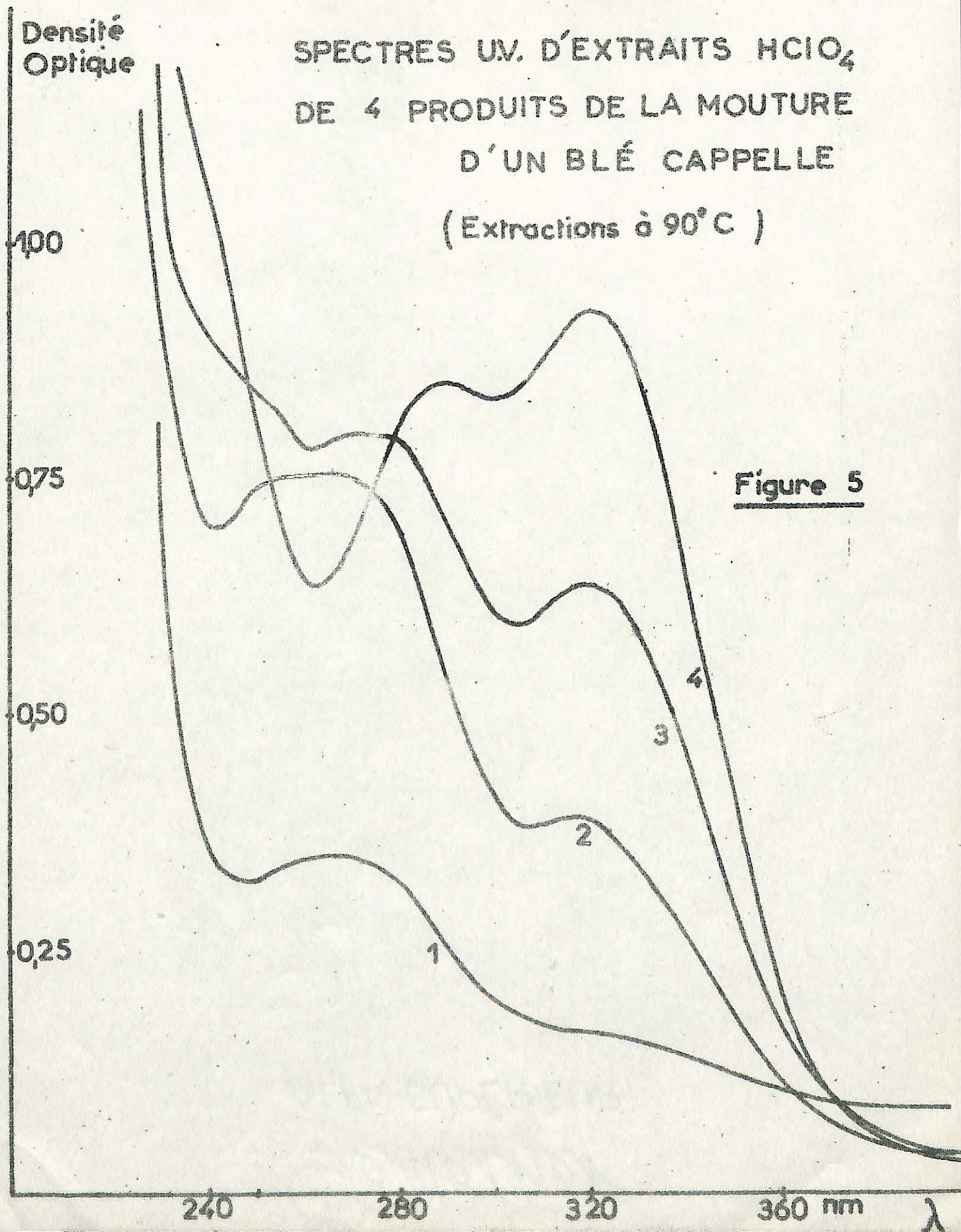


Figure 5

Les autres spectres ne nous apportent rien car l'absorption nucléique n'apparaît pas. À cause de la turbidité importante des extraits, la densité optique à 260 nm a des valeurs infiniment supérieures aux absorptions nucléiques vraies.

b) Discussion

La détermination des acides nucléiques par absorption UV à l'aide d'un étalon, telle que nous l'avons pratiquée, éveille les critiques suivantes:

- il y a une grande approximation dans les résultats, vu l'allure médiocre des spectres.
- l'ARN étalon ayant été solubilisé à froid, on ne peut l'utiliser que pour les déterminations dans les extraits à froid. En effet, le chauffage en milieu fortement acide aurait pour but de dégrader fortement les molécules d'acides nucléiques. Dans ces conditions, l'absorption UV serait différente car, à concentration égale, un acide nucléique dégradé absorbe plus qu'un acide nucléique intact (effet hyperchromique). Il faudrait donc tracer une courbe d'étalonnage avec un acide qui a subi un traitement à 90°C pour déterminer les acides nucléiques dans de tels extraits.
- la même critique peut s'appliquer aux extraits à 0°C qui contiennent des nucléotides. Les valeurs trouvées d'après l'étalonnage en ARN sont donc erronées par excès.
- les spectres de certains extraits à chaud présentent des maxima à 280 et à 320 nm. Nous nous sommes interrogés sur la nature des composés en question pensant que leur connaissance permettrait peut-être de nous suggérer le moyen de les éliminer et d'améliorer ainsi la qualité du spectre.

Le constituant responsable de l'absorption à 320 nm n'a pas été identifié. On remarque cependant qu'il apparaît très peu dans les farines, un peu dans les remoulages blancs, davantage dans les remoulages bis et devient prédominant dans les gros sons. On peut donc penser qu'il s'agit d'un corps appartenant à la périphérie du grain ou, du moins, d'un corps qui se trouve dans l'extrait acide des parties périphériques du grain (car on ignore si ce composé pré-existe dans le matériel ou s'il apparaît au cours du traitement acide à chaud).

De même, le constituant absorbant à 280 nm n'est pas connu. On aurait pu croire qu'il s'agissait de protéines, mais les dosages d'azote des extraits qui n'ont mis en évidence que des traces de protéines (insuffisantes pour une telle absorption) semblent démentir ce fait.

On peut seulement remarquer la corrélation qui existe entre l'existence des 2 pics: à 280 et à 320 nm. La figure 5 montre que, lorsqu'on considère des produits de plus en plus riches en fractions péri-

Figure 6

BLÉ BROYÉ

3 extractions de 10 mn à 0°C
par HClO₄ 0,25 N

Centrifugations à 4500 g.

Résidu.

Extrait à froid :

Dosage de l'ADN

Détermination des acides
nucléiques-totaux par
spectrophotometrie UV.

3 extractions de 15 mn à 90°C
par HClO₄ 0,5 N

Centrifugations à 4500 g.

Résidu

Extrait à chaud :

Dosage de l'ADN

Dosage du P-nucléique

SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL
DE DETERMINATION DES ACIDES NUCLEIQUES

phériques du grain, la taille des 2 pics s'accroît parallèlement.

Nous avons mis en oeuvre plusieurs moyens pour éliminer de l'extrait les corps créant des absorptions parasites:

- Nous avons laissé reposer l'extrait plusieurs jours à 0°C. Il se forme alors un dépôt important que l'on peut séparer par centrifugation. L'extrait est clarifié mais le spectre est qualitativement inchangé. Le dépôt au froid, qui contient du phosphore, même après lavage à l'eau pourrait être dû à la précipitation d'une partie de l'amidon que l'acide perchlorique a dissous à 90°C.

- En vue de limiter l'extraction de composés contaminants, nous avons pensé à lyophiliser l'extrait perchlorique pour le traiter une nouvelle fois par l'acide. Nous espérons ainsi précipiter les composés gênants au cours de ce deuxième traitement. Malheureusement, nous avons fait précéder la lyophilisation d'une dialyse au cours de laquelle -fait inattendu- la majorité des composés nucléiques a été éliminée. Cela nous a montré que l'acide perchlorique à 90°C devait dégrader très fortement les acides nucléiques puisque ceux-ci étaient, à plus de 60%, rendus dialysables.

- Nous avons essayé de pratiquer la déprotéinisation des extraits (méthode de SEVAG). Une certaine amélioration de la qualité du spectre a lieu, mais nous devons reprendre cette expérience durant un temps plus long pour pouvoir conclure à son sujet.

C - RESULTATS DES DETERMINATIONS D'ACIDES NUCLEIQUES:

1 - Méthode adoptée:

Compte tenu des constatations effectuées, le protocole choisi est le suivant:

- extractions perchloriques à 0°C sur lesquelles on dose les acides nucléiques totaux (comprenant les nucléotides) par absorption UV et l'ADN par la réaction spécifique de BURTON.
- extractions perchloriques à 90°C sur lesquelles on dose les acides nucléiques totaux d'après le P-nucléique (après correction pour le P-glucidique, s'il y a lieu) et l'ADN selon BURTON.
- dans les deux cas, l'ARN ne peut être dosé spécifiquement. Il est estimé par différence entre les acides nucléiques totaux et l'ADN.

2 - Résultats obtenus

Le tableau 6 donne les valeurs de l'ARN obtenu par différence, pour le blé et les produits de sa mouture, distingue les frac-

Tableau 6 - TENEURS en ARN DES DIFFERENTS PRODUITS ANALYSES

mg p.100 g de produits	Blé	Farine	Remoulages blancs	Remoulages bis	Gros sons
ARN 0°C	23,8	12,8	62,6	110,9	41,5
ARN 90°C	217,6	141,4	623,8	979,4	522,9
ARN total	241,4	154,2	686,4	990,3	564,4
$\%$ /grain entier					
ARN total	270,2	121,0	11,0	57,6	80,6

tions extraites à froid et à chaud, et rapporte les résultats au grain total.

Le tableau 7 exprime les quantités d'ARN et d'ADN dans les différents produits, les pourcentages correspondants ainsi que les rapports ARN/ADN.

Enfin, le tableau 8 exprime les mêmes résultats mais en tenant compte de l'importance relative de chaque fraction, c'est-à-dire en prenant pour base 100 g. de blé.

Cet ensemble de résultats appelle les interprétations suivantes:

- Les taux d'acides nucléiques que nous avons déterminés dans le blé (environ 240 mg. d'ARN et 100 mg. d'ADN pour 100 g. de blé, variété CAPPELLE) sont du même ordre que ceux signalés dans les travaux antérieurs. Ainsi, ÄYRÄPÄÄ (1957) trouve 270 mg d'acides nucléiques p. 100 g. d'orge; INGLE et al. (1965) trouve 420 mg. d'ADN et 270 mg. d'ARN dans 100g. de maïs. Nos résultats sont cependant plus faibles que ceux de BOURDET et HERARD (1959) (360 mg d'ARN et 170 mg d'ADN, pour un blé CAPPELLE).

- Les valeurs trouvées pour la farine de blé sont très voisines de celles obtenues par BOURDET et FEILLET (1967): 180 à 220 mg d'acides nucléiques pour 100g. , par MATSUSHITA (1958): 118 mg d'ARN, par JENNINGS et MORTON (1962): 150 mg d'ARN et 50 mg. d'ADN.

- Les rapports ARN/ADN sont toujours supérieurs à 1 dans les différents produits de mouture du blé CAPPELLE. Le rapport est cependant plus faible dans les régions périphériques (1,88) que dans les régions centrales (3,17), mais les produits de mouture ne donnent pas une image assez fidèle des régions histologiques du grain pour tirer de ces indications des conclusions précises.

- Il est cependant évident que les remoulages, qui contiennent les germes, sont de loin les plus riches en acides nucléiques. Les sons en sont moins riches et la farine en est beaucoup plus pauvre. Mais à cause de l'importance quantitative de l'amande du grain, la farine apporte cependant 44 % des acides nucléiques totaux, alors que les remoulages blancs et bis, dont le taux est faible dans le grain, n'en apportent respectivement que 4 % et 24 %. La question de savoir si les acides nucléiques de la farine pré-existent dans l'amande farineuse du blé ou bien s'ils doivent leur présence à des particules de germes mal séparées à la mouture a été posée quelquefois (FEILLET 1965). Nos résultats tendent à confirmer l'existence d'acides nucléiques dans les régions centrales du grain. Dans le cas contraire, il faudrait admettre que la majeure partie du germe se trouve incorporée à la farine, ce qui est peu vraisemblable. Mais nous ne pourrions donner de conclusion définitive qu'après analyse des régions du grain obtenues par dissection.

Tableau 7 - QUANTITES ESTIMEES D'ARN et d'ADN DANS LE BLE ET LES PRODUITS DE MOUTURE

mg / 100 g	Blé	Farine	Remoulages bl ncs	Remoulages bis	Gros sons
ARN	241,4	154,2	686,4	990,3	564,4
ADN	98,4	49,6	271,1	438,4	298,7
A N totaux	339,8	203,8	957,5	1328,7	863,1
En % /AN totaux					
ARN	71	76	72	79	65
ADN	29	24	28	25	35
ARN/ADN	2,44	3,17	2,57	3,00	1,88

TENEURS EN ACIDES NUCLÉIQUES DES DIFFÉRENTS PRODUITS

DE LA MOUTURE DU BLÉ

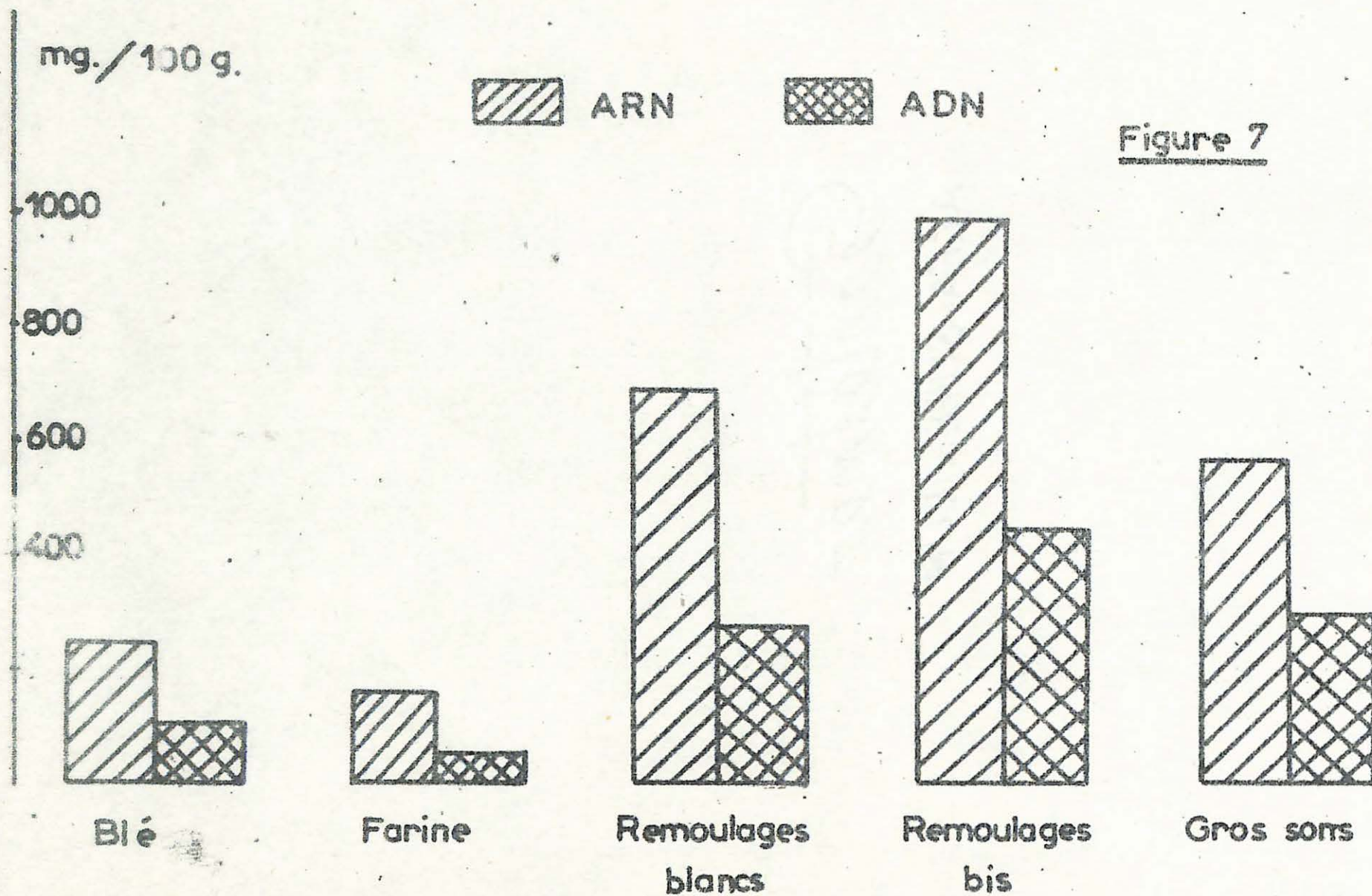


Tableau 8 - IMPORTANCE RELATIVE DE L'ARN ET DE L'ADN
DANS LES DIFFERENTS PRODUITS DE MOUTURE,
RAPPORTEE AU GRAIN DE BLE

mg / 100 g	Farine	Remoulages blancs	Remoulages bis	Gros Sons
ARN	121,0	11,0	57,6	80,6
ADN	38,8	4,8	25,4	42,7
A N totaux	159,8	15,3	83,0	123,3
=====				
.% par rapport aux acides nucléiques totaux du blé.				
ARN	35,6	3,2	17,0	23,7
ADN	8,7	1,2	7,5	12,6
A N totaux	44,3	4,4	24,3	36,3
=====				

3 - Conclusions sur les déterminations d'acides nucléiques :

Malgré le choix de méthodes disponibles, il nous a été très difficile d'en trouver une susceptible d'être appliquée à notre matériel végétal. Nous avons dû user d'artifices analytiques et encore ne pouvons-nous fournir des résultats que par l'intermédiaire d'estimations.

Si le dosage des acides nucléiques est relativement aisé dans des produits quelque peu purifiés, un matériel aussi complexe que le grain de blé mûr se prête très mal à de telles déterminations. En effet, parmi les très nombreux composés biochimiques qu'il contient, il en est toujours un certain nombre qui vient gêner toutes les opérations effectuées. Ainsi, l'emploi des procédés classiques est souvent impossible soit à cause de l'amidon, soit à cause des protéines, soit à cause du P - phytique, etc...

Cela explique les différences constatées entre les résultats obtenus par divers chercheurs. Cela explique que des procédés différents ne donnent pas les mêmes résultats. Cela souligne enfin la difficulté de l'étude de telles macromolécules dans un milieu tel que le grain de blé.

Les graines de céréales en général, constituent donc des tissus très particuliers à la fois par leur état de siccité et leur forte teneur en substances de réserve difficiles à solubiliser, autant de faits qui limitent considérablement les possibilités de leur étude.

IV - EXTRACTION DES NUCLEOPROTEINES

A) BUT DE CETTE OPERATION :

Dans la matière vivante, les acides nucléiques ne constituent pas des unités isolées mais sont normalement unis à certaines catégories de protéines pour constituer des nucléoprotéines.

Les protéines associées aux acides nucléiques sont souvent d'un type particulier telles les protamines et les histones qui ont un caractère basique nettement marqué. Mais certaines d'entre elles, beaucoup moins connues, notamment celles qui pourraient être associées à certains ARN, ne semblent pas appartenir à un type bien défini.

Dans l'ensemble, il est donc actuellement encore difficile de caractériser une nucléoprotéine au sein d'un milieu complexe, uniquement à l'aide de sa partie holoprotéique. C'est pourquoi nous avons commencé l'étude des nucléoprotéines du blé en nous intéressant à leur groupement prosthétique. L'identification et la détermination quantitative des acides nucléiques nous renseignent, en effet, immédiatement sur la présence ou l'absence de nucléoprotéines dans un tissu brut ou dans des fractions protéiques isolées.

L'extraction et le dosage des acides nucléiques, opérations auxquelles jusqu'à ce jour, nous avons consacré la majeure partie de notre temps, ne constituent donc qu'une simple approche au travail envisagé. Le but que nous poursuivons est, en effet, d'établir un inventaire des composés nucléiques du grain de blé, c'est-à-dire de donner le détail de sa constitution nucléoprotéique.

Pratiquement, cela devrait revenir à mener une étude fine des fractions contenant les nucléoprotéines du grain afin de caractériser celles-ci et de les séparer des autres protéines n'appartenant pas à des unités nucléoprotéiques. Ce travail devra vraisemblablement faire appel à des techniques de chromatographie, d'électrophorèse et même d'immuno-électrophorèse. Mais avant de soumettre les nucléoprotéines à ces techniques, il nous faut les extraire de leur milieu d'origine et même amorcer leur purification. C'est pourquoi, avant de commencer ce travail de fractionnement des protéines nucléiques, nous nous sommes posés le problème de leur extraction à l'aide de solvants respectant leur intégrité moléculaire.

B) MATERIEL D'ETUDE ET METHODES EXPERIMENTALES :

1) Matériel d'étude :

Nous avons travaillé sur le même CAPPELLE ainsi que sur les produits de mouture (farine, remoulages blancs et bis, gros sons) décrits dans le chapitre II. Parallèlement, nous avons commencé l'étude d'une fraction de germes de blés qu'un diagramme de mouture plus complexe des Grands Moulins de Paris permet de séparer.

La seule préparation subie par tous ces produits est un broyage selon les conditions décrites précédemment. Nous n'avons encore jamais pratiqué d'extraction sur du matériel délipidé.

2) Méthodes expérimentales :

a) Types de méthodes d'extraction

L'extraction pose des problèmes difficiles car, contrairement aux protéines que l'on rencontre chez de nombreux être^svivants, celles des graines se présentent dans un état natif très peu hydraté. Or, toute étude requiert d'abord leur mise en solution dans des conditions convenables, c'est-à-dire dissolution complète et obtention de solutions limpides et stables au moyen de solvants respectant, si possible, l'intégrité moléculaire.

Comme le souligne MOSSE (1968), les méthodes d'extraction offrent plusieurs alternatives : elles peuvent être partielles ou exhaustives, discontinues ou continues, globales ou sélectives. Nous avons personnellement expérimenté une méthode du type partiel, discontinu et global et une autre du type exhaustif, discontinu et sélectif et cela pour des raisons que nous exposerons.

b) Méthodes décrites dans les travaux antérieurs

Notre but étant d'étudier l'ensemble des nucléoprotéines du grain, il était logique de faire appel à des méthodes exhaustives. Nous avons donc recherché dans la littérature des exemples de tels procédés d'extraction des nucléoprotéines.

L'étude bibliographique que nous avons effectuée a mis en évidence une multitude de méthodes relatives aux tissus animaux, mais une certaine pauvreté en ce qui concerne les techniques des nucléoprotéines végétales.

La littérature fournit en particulier de nombreux exemples de méthodes d'extraction des nucléoprotéines animales telles celles du thymus de veau, du foie, du pancréas, du cerveau, des embryons de poulet, des levures, des bactéries, des virus, etc.... Très généralement, les auteurs font appel à des solutions salines. Ainsi, dans la majorité des cas, il est possible d'extraire les ribonucléoprotéines (RNP) à l'aide de solutions de NaCl 0,14 M tandis que les désoxyribonucléoprotéines (DNP) sont solubles soit dans l'eau pure, soit dans des solutions NaCl concentrées (1 M environ).

Par contre, les rares travaux relatifs aux tissus végétaux font appel à des principes très divers et utilisent des solvants de natures variées, ce qui dénote assez bien les difficultés rencontrées par rapport aux travaux concernant le secteur animal. Ainsi, OLIVERA et al. (1965) extraient des nucléohistones de plante de pois à l'aide de NaCl 0,01 M, TRIS 0,001 M tandis que IOFFE (1968) extrait des histones de mauve et de légumineuse par l'eau pure. Mc MULLEN (1959) utilise NaCl 0,5 M à 5°C ou NaCl 2M à 95°C pour extraire une RNP de latex d'hévéa. KOSHIYAMA (1965) obtient une RP de soja par précipitations acides à partir de solutions aqueuses et alcooliques.

En ce qui concerne les tissus végétaux de réserve, les travaux, encore plus rares, ne font état que de méthodes partielles d'extraction. Les auteurs renoncent à obtenir la totalité des nucléoprotéines et se consacrent généralement à l'isolement et à la purification d'une fraction dans laquelle des nucléoprotéines ont été identifiées.

Cependant, la plupart des travaux relatifs aux céréales, s'intéressent aux embryons, riches en protéines solubles et en acides nucléiques. Ainsi, IWAI (1964) isole une nucléohistone à partir d'embryon de riz par extractions NaCl différentielles (0,14 M et 1 à 1,5 M). De même, ELLIAS prépare une DNP d'embryon de seigle à l'aide de NaCl 0,14 M et 2M mais LALAND (1950) souligne la difficulté de séparer les deux types de nucléoprotéines à cause de la solubilité partielle des DNP d'embryon de seigle dans NaCl 0,14 M.

Quelques travaux de ce type signalent l'isolement de DNP ou de RNP à partir de germe de blé (LUSENA 1951, LIPSHITZ et CHARGAFF 1956), mais en ce qui concerne les graines entières ou les albumens de graines amylacées, on ne possède que des résultats très fragmentaires.

Ainsi, ÄYRÄPÄÄ (1957) et MIHAJLOVIC et al. (1963, 1964) ont remarqué qu'une certaine proportion des nucléoprotéines du grain de blé pouvait être extraite par des solutions salines. MATSUSHITA (1958) constate, après extraction de la farine de blé par différents solvants, que les acides nucléiques se retrouvent soit dans les fractions extraites par NaCl 0,9 % ou mieux NaCl 5 %, soit dans les résidus d'extraction à l'alcool 70 % (glutélines).

KONDO et MORITA (1954) pensent que la gluténine de blé non glutineux serait une nucléoprotéine contrairement à la gluténine de blé glutineux.

De même, BOURDET et FEILLET (1967) constatent qu'après fractionnement des protéines de la farine de blé selon une méthode du type OSBORNE améliorée, les acides nucléiques se retrouvent en majeure partie dans la fraction globuline (malgré la faible importance pondérale de celle-ci) et en proportion non négligeable dans la fraction gluténine. Les acides nucléiques représentant en moyenne près de 10 % du poids sec des globulines et compte tenu de la richesse en acides aminés basiques de ces protéines, BOURDET et FEILLET ont suggéré qu'elles pourraient s'apparenter à des histones végétales.

c) Recherche d'une méthode satisfaisante

Après examen de ces travaux antérieurs, en particulier ceux d'ÄYRÄPÄÄ (1957) et d'IWAI (1964), nous avons pratiqué d'abord des extractions du type global c'est-à-dire tentant d'obtenir le maximum de nucléoprotéines avec le minimum de solvants, sans chercher à les fractionner mais en vue de les soumettre à la chromatographie ou à l'électrophorèse. Nous avons constaté rapidement que ces procédés d'extractions à l'aide de solutions salines ne pouvaient permettre de mises en solution exhaustives. En effet, avec le matériel végétal étudié, dans les conditions utilisées jusqu'à ce jour, 70 % au moins des acides nucléiques demeuraient dans le résidu d'extraction.

Ignorant les mécanismes qui déterminent les propriétés de solubilité des nucléoprotéines du blé, nous avons alors provisoirement abandonné ce type d'extraction. En vue de définir des conditions plus propices, nous avons décidé de pratiquer sur le blé et ses produits de mouture, la méthode de fractionnement définie par BOURDET et FEILLET selon le principe d'OSBORNE. Ce procédé est en effet exhaustif puisqu'il aboutit à une solubilisation totale des protéines ; il est aussi sélectif puisqu'il permet, par l'emploi judicieux de plusieurs solvants, de séparer 4 catégories de protéines (albumines, globulines, gliadines, gluténines). Un dosage des acides nucléiques dans chacune de ces fractions nous permet donc de connaître grossièrement

Les propriétés de solubilité des nucléoprotéines du grain de blé ainsi que des moyens utilisables dans l'avenir, en vue de leur extraction.

d) Protocoles expérimentaux

- Extractions du type global : Nous avons mis en suspension du blé broyé, dans différents solvants (eau distillée, NaCl 1M, 2M, 0,14M) à 0° C. Après agitation manuelle ou magnétique durant 30 mn nous avons centrifugé la suspension (Centrifugeur JOUAN G 60; 0° C; 15 mn à 3600 g) et recueilli l'extrait par décantation. Pour tester l'efficacité de l'extraction, nous avons alors dosé les acides nucléiques dans l'extrait total.

Dans certains cas, nous avons opéré des extractions successives, généralement par des solvants de force ionique croissante en vue d'apprécier les possibilités maximales d'extraction des nucléoprotéines par les solutions salines.

Nous avons ainsi employé les séries de solvants suivantes:

Eau distillée - NaCl 0,14M - NaCl 1M.

NaCl 1M - NaCl 2M.- NaCl 3M.

NaCl 2M - NaCl 3M - sulfite de sodium 2M.

NaCl 0,14M - NaCl 1M - sulfite de sodium 0,5 M.

Les extraits obtenus ont été dialysés pour éliminer en particulier les sels contenus dans les solvants d'extraction, à l'aide de sacs à dialyse NOJAX de diamètre 30 mm. L'opération a lieu 3 jours contre l'eau courante, puis 2 jours contre l'eau distillée. Le contenu du sac à dialyse est alors lyophilisé entièrement (sans séparation du précipité comme cela se pratique lors du fractionnement globulines/albumines).

- Extraction du type sélectif : Il s'agit de la méthode du type OSBORNE selon le protocole défini par BOURDET et FEILLET (1965). On extrait les protéines "solubles" à l'aide d'une solution NaCl 0,5M amenée à pH 6,8 par du phosphate disodique.

Une dialyse (qui élimine aussi l'azote non protéique) amène la précipitation des globulines. Celles-ci sont donc recueillies dans le culot de centrifugation tandis que les albumines demeurent, par définition, dans le surnageant.

Le résidu d'extraction des protéines "solubles" est remis en suspension dans l'éthanol à 60 % et agité en présence de billes de verre (agitateur à secousses Griffin et George). L'extrait obtenu contient la fraction gliadine. Les protéines demeurant dans le résidu, qui correspondent aux gluténines, peuvent être solubilisées quantitativement par la monochlorhydrine du glycol (GMC).

Chaque extrait protéique est dialysé puis lyophilisé.

e) Analyse des produits lyophilisés obtenus

- Humidité : La teneur en eau est déterminée par perte de poids après un séjour de 1h 30 à l'étuve à 130° C. Cette méthode, non prévue pour des préparations lyophilisées, semble un peu brutale et donne vraisemblablement des teneurs en eau par excès, à cause du

départ de composés volatils, à cette température. Bien que l'influence sur les résultats soit faible, il faudrait procéder à un étalonnage du temps de séjour dans l'étuve en fonction d'une méthode de référence (à 55°C, sous vide).

- Teneurs en azote total et en phosphore total : Les dosages sont effectués comme nous l'avons exposé au chapitre III, pour les produits bruts. Lorsqu'on ne dispose que de faibles quantités de produits, on dose l'azote après l'humidité, sur la même préparation.

- Dosage des acides nucléiques : nous le pratiquons selon le procédé décrit au chapitre III c'est-à-dire :

. Extractions perchloriques 0,25 N à 0°C

. Extractions perchloriques 0,5 N à 70°C

L'examen du spectre UV permet de déterminer les acides nucléiques totaux dans les deux extraits. Le dosage du phosphore de l'extrait à chaud permet de confirmer la valeur obtenue par spectrophotométrie, car cet extrait ne contient, en principe, que du P nucléique.

L'ADN peut être dosé spécifiquement selon la réaction de BURTON (1956), ce qui n'est pas le cas de l'ARN, toujours à cause de la présence de pentosanes dans les extraits.

Toutes ces analyses ont été effectuées à partir de quantités de matériel lyophilisé de l'ordre de 50 à 250 mg.

C) RESULTATS OBTENUS.

I) Extractions du type global:

a) Efficacité des différents solvants utilisés:

Par dosage des acides nucléiques dans les produits obtenus par lyophilisation des extraits dialysés, nous connaissons les taux d'ARN et d'ADN dans ces différents produits. D'autre part, par pesée de chaque échantillon lyophilisé, on peut savoir à quelle proportion de produit initial il correspond, ce qui permet d'établir les résultats en mg. d'acides nucléiques extraits pour 100 g. de blé. Connaissant la teneur du blé en acides nucléiques, on a alors une idée des possibilités d'extraction globale du solvant considéré.

Voici, selon les conditions décrites, les quantités d'acides nucléiques extraites à partir de 100 g. de blé (substance sèche).

Solvant	mg. p. 100 g. blé.		% des A.N. totaux	
	ARN	ADN	ARN	ADN
Eau dist. pH 5,1	10,7	3,3	3,7 %	3,3 %
NaCl 0,14 M + citrate 0,01 M. pH 6,6	31,2	16,0	10,7	16,0
NaCl 1 M. pH 5,8	30,6	41,7	10,5	41,7
NaCl 2 M. pH 5,7	30,0	43,0	10,3	43,0

Ce tableau semble montrer des différences considérables entre les propriétés de solubilité des nucléoprotéines animales et celles du grain de blé. Alors que les RNP sont habituellement solubles vers des concentrations voisines de 0,14 M NaCl et peu solubles pour des forces ioniques très faibles ou très élevées, on constate ici apparemment un comportement semblable pour 0,14 M, 1 M et 2 M. De même, les DNP ne présentent pas de minimum de solubilité pour une force ionique de 0,14 M mais semblent avoir une extractibilité qui croît avec la concentration saline.

On ne pourrait donc pas, dans le blé, séparer selon les conditions expérimentales choisies, les DNP des RNP par extractions salines différentielles 0,14 M et 1M, comme cela se pratique dans de nombreux tissus. D'autre part, si on arrive à solubiliser 40 % de l'ADN du grain, il n'a pas été possible d'extraire plus de 10 % de l'ARN (en moyenne, 20 % des acides nucléiques totaux).

Les agents d'extraction utilisés ici sont ceux que la littérature décrit le plus fréquemment. Il faut constater que dans des tissus de réserve comme le grain de blé, leur application est un échec. Cependant, des conditions d'extraction meilleures doivent pouvoir être mises au point car nous verrons bientôt que l'isolement de la fraction globuline du blé suffit à extraire environ de 30 à 55 % des acides nucléiques totaux du blé. Il apparaîtrait donc qu'une extraction par NaCl 0,5 M à pH 6,8 serait beaucoup plus efficace que toutes celles décrites ci-dessus.

b) Extractions successives par des solvants de force ionique croissante :

Pour connaître la proportion maximum d'acides nucléiques totaux qu'il est possible d'extraire par des solutions salines, nous avons pensé à pratiquer plusieurs extractions successives par des solutions de force ionique croissante. Par ailleurs, nous avons employé des solutions réductrices (sulfite de sodium 0,5 M et 2 M) dans l'hypothèse où la rupture de certaines liaisons aurait permis l'extraction d'une nouvelle catégorie de nucléoprotéines.

L'expérience a été effectuée avec 4 séries de solvants, comme nous l'avons annoncé précédemment. Voici les résultats en ce qui concerne les acides nucléiques dosés dans l'extrait lyophilisé obtenu à l'aide de chacun des solvants.

- Série: Eau - NaCl 0,14 M - NaCl 1 M

	Eau	NaCl 0,14 M	NaCl 1 M	TOTAL	% A.N. ttx.
ADN	3,3	23,8	16,7	43,8	43,8 %
ARN	10,7	18,1	31,9	60,7	20,9 %
A.N. totaux	14,0	41,9	48,6	104,5	26,8 %

- Série: NaCl 0,14 M - NaCl 1 M - sulfite de Na 0,5 M.

	0,14 M	1 M	sulfite	Total	% A.N. ttx.
ADN (mg/100g de blé)	16,0	13,3	3,1	32,4	32,4 %
ARN "	31,2	36,7	8,1	76,0	26,2 %
A.N. TTX "	47,2	50,0	11,2	108,4	27,8 %

- Série: NaCl 1 M - NaCl 2 M - NaCl 3 M.

	1 M	2 M	3 M	Total	% A.N. ttx.
ADN (mg/100 g de blé)	41,7	12,9	3,3	57,9	57,9 %
ARN "	30,6	16,3	5,6	52,5	18,1 %
A.N. ttx "	72,3	29,2	8,9	110,4	28,3 %

- Série: NaCl 2 M - NaCl 3 M - sulfite de Na 2 M.

	2 M	3 M	sulfite	Total	% A.N. ttx.
ADN (mg/100 g de blé)	43,0	9,2	1,8	54,0	54,0 %
ARN "	27,0	17,7	3,7	48,4	16,7 %
A.N. ttx "	70,0	26,9	5,5	102,4	26,3 %

Dans les conditions expérimentales utilisées, nous n'avons donc pas pu solubiliser, sous forme de nucléoprotéines, plus de 30 % des acides nucléiques totaux du blé. Ce sont les solutions salines 0,14 M, 1M et 2M qui sont relativement les plus efficaces. Les solutions 3M et sulfite n'ont que de faibles rendements lorsqu'on les emploie en dernier lieu. Nous ignorons le résultat qu'elles auraient apporté si on les avait utilisées en premier lieu. Nous avons également commis l'erreur de ne pas expérimenter d'autres agents d'extraction que ceux cités couramment dans la littérature. Dans le travail que nous allons poursuivre, nous nous proposons de faire varier la concentration de façon plus systématique, en particulier entre 0,14 M et 1M NaCl, du fait que l'extraction de la fraction globuline à l'aide de NaCl 0,5 M conduit à un excellent résultat.

Il est également curieux de constater que la proportion d'ADN extrait est toujours très supérieure à celle d'ARN. Ce phénomène semble d'ailleurs assez complexe car le résultat d'une extraction dépend des traitements antérieurs. Ainsi, une extraction par NaCl 0,14 M en premier lieu entraîne environ 2/3 d'ARN pour 1/3 d'ADN. La même opération, aussitôt après extraction aqueuse entraîne cette fois davantage d'ADN que d'ARN.

Cette étude, que nous avons simplement abordée ici, demanderait donc à être approfondie afin de connaître les nombreux phénomènes impliqués dans la mise en solution des nucléoprotéines. Certains constituants jouent en effet un rôle important dans la solubilisation des protéines. Ainsi, MOSSE et BAUDET (1962, 1963, 1964), MOUREAUX (1965), ont mis en évidence des composés dialysables (phosphates minéraux et phytates) agissant sur l'extractibilité de certaines catégories de protéines.

Dans l'hypothèse où de tels phénomènes se produiraient avec les nucléoprotéines, on pourrait expliquer qu'après une première extraction (ayant pu solubiliser de petites molécules agissant sur les propriétés des protéines), la solubilisation soit alors facilitée (ou gênée) au cours des traitements suivants.

En conclusion, il semblerait que contrairement aux nucléoprotéines animales lesquelles sont extraites selon des conditions quasi universelles, les nucléoprotéines du grain de blé ne sont pas mises en solution de façon simple. Leur appartenance à un tissu de réserve très complexe en est probablement l'une des causes.

2) Extractions du type sélectif - exhaustif :

Après obtention des 4 types de fractions protéiques (albumines, globulines, gliadines, gluténines), à partir du blé et des produits de sa mouture, selon le protocole précisé par BOURDET et FBILLET (1965), nous avons procédé à des dosages d'azote, de phosphore et d'acides nucléiques. Compte tenu de l'importance quantitative de chaque fraction lyophilisée, les résultats ont pu être rapportés aux produits bruts initiaux.

a) Composition protéique des produits étudiés:

Le tableau 9 donne la répartition de l'azote dans les différentes fractions protéiques, pour chacun des produits. Cela nous permet de juger l'importance relative des différentes classes de protéines; ces valeurs nous aideront à déterminer les rapports acide nucléique/protéine dans les fractions ainsi isolées.

Les remarques suivantes se dégagent de ces résultats:

- Prédominance des protéines "insolubles" dans les régions centrales du grain (farine).
- Prédominance des protéines "solubles" et en particulier des globulines dans les fractions contenant les germes (remoulages).

b) Composition phosphorée des préparations protéiques:

Le tableau 10 exprime les quantités de phosphore total de chacune des fractions protéiques et rapporte ces mêmes valeurs aux quantités de protéines présentes. Cette dernière expression (mg. de P/100 g. de protéines) semble plus exploitable car les préparations isolées ne contiennent pas que des protéines. Leurs taux de pureté est généralement compris entre 40 et 75 %.

COMPOSITION PROTEIQUE DU BLE CAPPELLE

ET DES PRODUITS DE SA MOUTURE.

	BLE	FARINE	REMOULAGES BLANCS	REMOULAGES BIS	GROS SONS
	g. de protides p. 100 g. de produit (matière sèche)				
Protides totaux:	12,15	10,85	17,55	18,00	16,30
	Azote, mg./100 g de produit m.s.				
N total	2130	1905	3080	3155	2860
N non protéique	112	50	237	287	226
N protéique	2018	1855	2843	2868	2634
N-albumines	330	208	468	536	440
N-globulines	130	103	870	997	384
N-gliadines	813	892	795	445	535
N-gluténines	745	652	727	890	1275
	Azote, % de l'azote total.				
N non protéique	5,3	2,7	7,7	9,1	7,9
N-albumines	15,5	10,9	15,2	17,0	15,4
N-globulines	6,1	5,4	28,2	31,6	13,4
N-gliadines	38,1	46,8	25,8	14,1	18,7
N-gluténines	35,0	34,2	23,6	28,2	44,6

Tableau 9.

COMPOSITION PROTEIQUE DU BLE CAPPELLE ET DES PRODUITS DE SA MOUTURE

Albumines Globulines
Gliadines Gluténines

% de l'azote
total

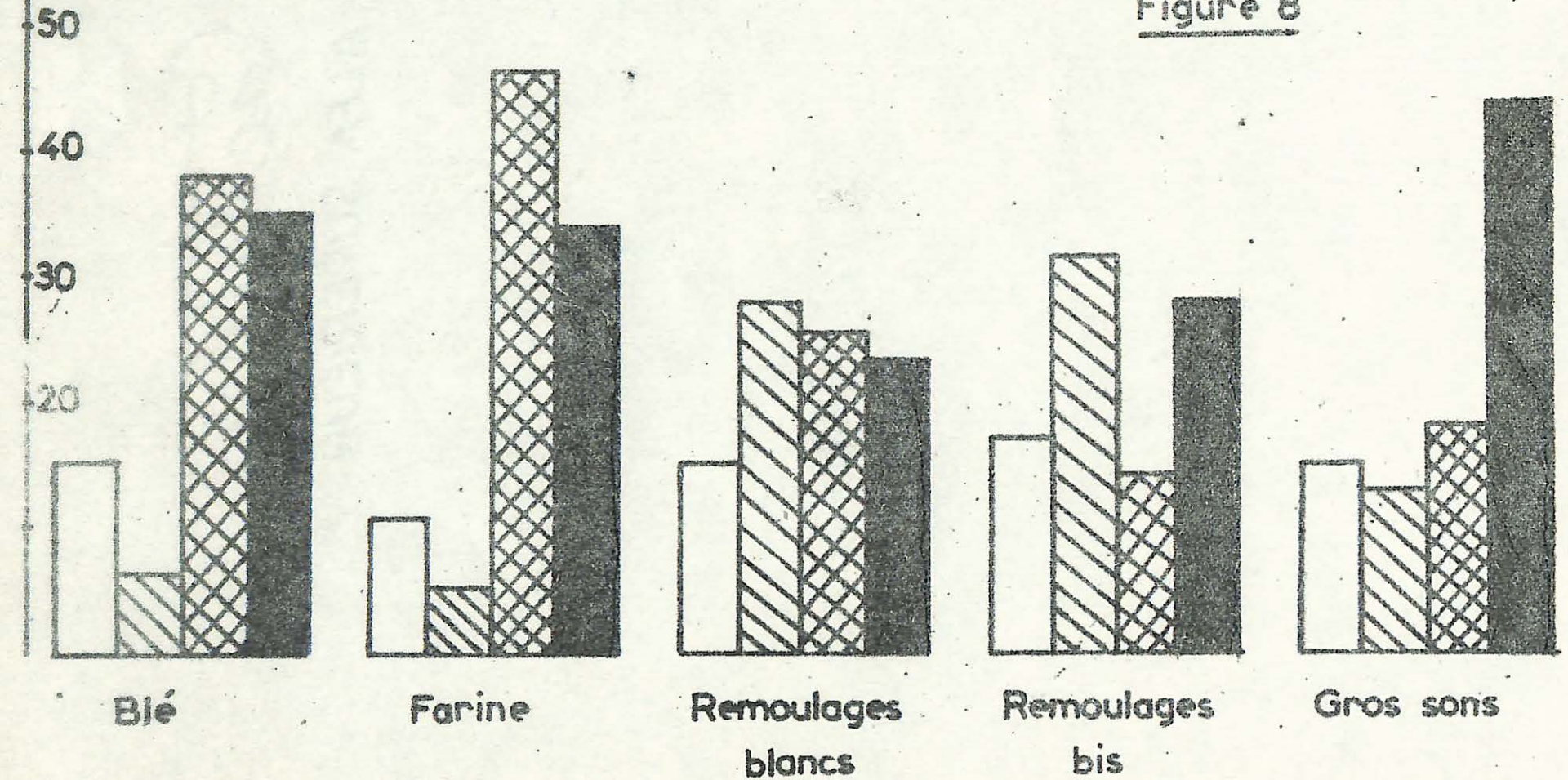


Tableau IO.

TENEURS EN PHOSPHORE TOTALDES DIFFERENTES PREPARATIONS PROTEIQUES

	Blé	Farine	Remoulages blancs	Remoulages bis	Gros sons
	en mg de P/100 g de produit m.s.				
P total	426	III	752	I255	I933
	<u>Albumines</u>				
P total	52	48	46	83	I8I
% protéines	45,0	37,9	54,9	62,0	56,3
P total (mg/ 100g prot)	II5	I27	84	I34	322
	<u>Globulines</u>				
P total	II36	I099	720	I008	907
% protéines	75,0	74,0	66,7	71,7	68,7
P total (mg/ 100g prot)	I5I6	I485	I079	I405	I320
	<u>Gliadines</u>				
P total	III	I52	I07	I77	I52
% protéines	69,5	63,0	56,6	35,2	40,9
P total (mg/ 100 g prot)	I60	I94	I36	503	372
	<u>Gluténines</u>				
P total	244	I08	346	585	766
% protéines	44,6	55,6	4I,9	22,9	33,3
P total (mg/ 100g prot.)	547	I94	827	2550	2300

Ce tableau montre avant tout la pauvreté en phosphore des albumines et des gliadines et par contre, la richesse considérable de la fraction globuline et de certaines gluténines.

Le tableau II donne le détail des différentes formes de phosphore pour chacune des fractions protéiques (en mg. de P pour 100 g. de protéines). Le P-nucléique total est calculé comme la somme du P extrait à 70° C par l'acide perchlorique et du P nucléique extrait à 0° C. (Ce dernier étant obtenu par l'intermédiaire du dosage spectrophotométrique des acides nucléiques). Le P-acido soluble à 0° C est calculé comme la différence entre le P total de l'extrait à 0° C et le P-nucléique de ce même extrait.

On note avant tout la richesse des globulines en P nucléique lequel représente 60 à 80 % de leur P total. Le P nucléique représente aussi une proportion notable dans les albumines et gliadines car celles-ci contiennent peu de P-phytique (éliminé au cours de la dialyse), mais le fait est moins important vu leur faible teneur en P total. Les gluténines de blé et de farine contiennent 40 à 50 % de P nucléique mais celles de remoulages et de sons montrent une prédominance du P acido-soluble à 0° C. Nous ignorons si ce fait est à relier avec la forte teneur des régions externes du grain en P-phytique ou bien s'il s'agit d'un manque d'efficacité de la dialyse.

Dans l'ensemble, ce sont donc les globulines qui, malgré leur faible importance pondérale (0,6 % du grain), retiennent la plus grosse part du P-nucléique total. Les gluténines en contiennent aussi une part non négligeable, mais à cause de leur importance relative (4 % du grain).

Lorsqu'on tente de rapporter les valeurs de P nucléique en pourcentage du P nucléique total du blé et des autres produits, on obtient les résultats suivants:

% du P-nucléique total.	Blé	Farine	Remoulages blancs	Remoulages bis	Gros sons
Albumines	5,0	5,8	2,0	1,0	4,2
Globulines	30,3	34,4	56,6	34,9	20,1
Gliadines	10,3	13,5	2,8	3,5	4,9
Gluténines	31,6	18,4	10,6	16,7	17,6
Total :	77,2	72,1	72,0	66,1	46,8

Il est aisé de constater que le bilan n'est pas quantitatif. Ce phénomène a été constaté dans certains travaux antérieurs où la somme des quantités d'acides nucléiques contenus dans les 4 frac-

Albumines	5,0	5,8	2,0	1,0	4,2
Globulines	30,3	34,4	56,6	34,9	20,1
Gliadines	10,3	13,5	2,8	3,5	4,9
Gluténines	31,6	18,4	10,6	16,7	17,6
<hr/>					
Total :	77,2	72,1	72,0	66,1	46,8
<hr/>					

Il est aisé de constater que le bilan n'est pas quantitatif. Ce phénomène a été constaté dans certains travaux antérieurs où la somme des quantités d'acides nucléiques contenus dans les 4 frac-

COMPOSITION PHOSPHORÉE
DES DIFFÉRENTES PRÉPARATIONS PROTÉIQUES

mg. de P pour 100g protéines:	Blé	Farine	Remoulages blancs	Remoulages bis	Gros sons
<u>Albumines</u>					
P total	115	127	84	134	322
P acido-soluble	13	tr	13	63	151
P nucléique	80	100	53	45	167
P résiduel	22	27	18	26	4
<u>Globulines</u>					
P total	1516	1485	1079	1405	1320
P acido-soluble	168	tr	122	468	402
P nucléique	1211	1329	810	842	817
P résiduel	137	154	148	95	101
<u>Gliadines</u>					
P total	160	194	136	503	372
P acido-soluble	14	30	35	290	191
P nucléique	66	56	43	187	142
P résiduel	80	108	58	26	39
<u>Gluténines</u>					
P total	547	194	827	2550	2300
P acido-soluble	273	59	561	1960	2003
P nucléique	220	103	194	450	216
P résiduel	54	32	72	140	81

Tableau II

tions protéiques de farines atteint seulement 55 à 60 % des acides nucléiques présents dans le produit brut initial.

c) Composition nucléique des fractions protéiques:

Nous avons dosé l'ADN et les acides nucléiques totaux dans chacune des fractions protéiques. Le tableau I2 donne l'ensemble de ces résultats.

Comme les valeurs de P-nucléique le montraient, nous constatons la richesse particulière des globulines en acides nucléiques. Rapportés aux protéines, les taux atteignent respectivement pour le blé et la farine II,7 et II,9 % d'acides nucléiques. Les gluténines en sont relativement riches (I,0 % dans la farine et 4,3 % dans les remoulages. Les albumines et les gliadines en sont nettement plus pauvres. Il est même vraisemblable que les faibles quantités présentes dans les albumines aient pour origine une séparation insuffisante des globulines. (FELLET 1965).

Au point de vue des rapports ARN/ADN, il semblerait que les protéines "insolubles" soient plus riches en ARN qu'en ADN tandis que les globulines (sauf celles de la farine) seraient plus riches en ADN. Bien qu'il soit prématuré de conclure après cette simple expérience (dans laquelle beaucoup d'imprécisions demeurent), le fait que les ribonucléoprotéines dominent dans les gliadines et gluténines confirmerait l'extractibilité préférentielle des ADN au cours des extractions salines.

D) DISCUSSION .

I) Méthodes expérimentales:

a) Extraction des nucléoprotéines:

Nous avons cherché à extraire le maximum de nucléoprotéines selon des conditions douces et à l'aide de solvants non dénaturants. Or, nous avons parfois employé des solutions salines 1 M, 2 M et 3 M. Il est bien connu qu'à de telles forces ioniques, il existe un risque de dissociation de la liaison acide nucléique-protéine de sorte que ces agents (surtout les solutions 2 M et 3 M) seraient à proscrire, même si leur efficacité était apparue. En effet, si les nucléoprotéines sont dissociées au cours de l'extraction, il peut y avoir réassociation au cours de la dialyse, lorsque la force ionique s'abaisse, mais selon des liaisons différentes de celles des nucléoprotéines natives. Cette dénaturation transformerait probablement les résultats obtenus par séparation chromatographique ou électrophorétique.

D'autre part, nous avons constaté l'inefficacité de toutes les solutions salines à extraire la totalité des nucléoprotéines du blé. La mise en solution exhaustive des protéines n'a pu être réalisée qu'à l'aide d'autres solvants comme l'alcool dilué ou la monochlorhydrine du glycol, dans des conditions d'agitation relativement violentes (agitateur à secousses en présence de billes de verre et parfois, appareil de dispersion Ultra-Turrax).

COMPOSITION EN ACIDES NUCLEIQUES
DES PREPARATIONS PROTEIQUES LYOPHILISEES

	Blé	Farine	Remoulages blancs	Remoulages bis	Gros sons
	mg d'acides nucléiques/100 g de produit m.s.				
ADN	98,4	49,6	271,1	438,4	298,7
ARN	241,4	154,2	686,4	990,3	564,4
A.N. totaux:	339,8	203,8	957,5	1328,7	863,1
	mg d'acides nucléiques/100 g de protéines				
	<u>Albumines</u>				
ADN	555	488	374	347	700
ARN	220	512	140	89	760
A.N. totaux:	775	1000	514	436	1460
	<u>Globulines</u>				
ADN	5620	2100	5900	5820	5560
ARN	6080	9800	1950	2330	2360
A.N. totaux:	11700	11900	7850	8150	7920
	<u>Gliadines</u>				
ADN	89	140	115	380	307
ARN	551	500	305	1430	1063
A.N. totaux:	640	540	420	1810	1370
	<u>Gluténines</u>				
ADN	475	336	468	1635	1135
ARN	1655	664	1412	2725	955
A.N. totaux:	2130	1000	1880	4360	2090

Tableau 12.

TENEURS EN ACIDES NUCLÉIQUES DES PRÉPARATIONS PROTÉIQUES

en % d'acides nucléiques / protéines

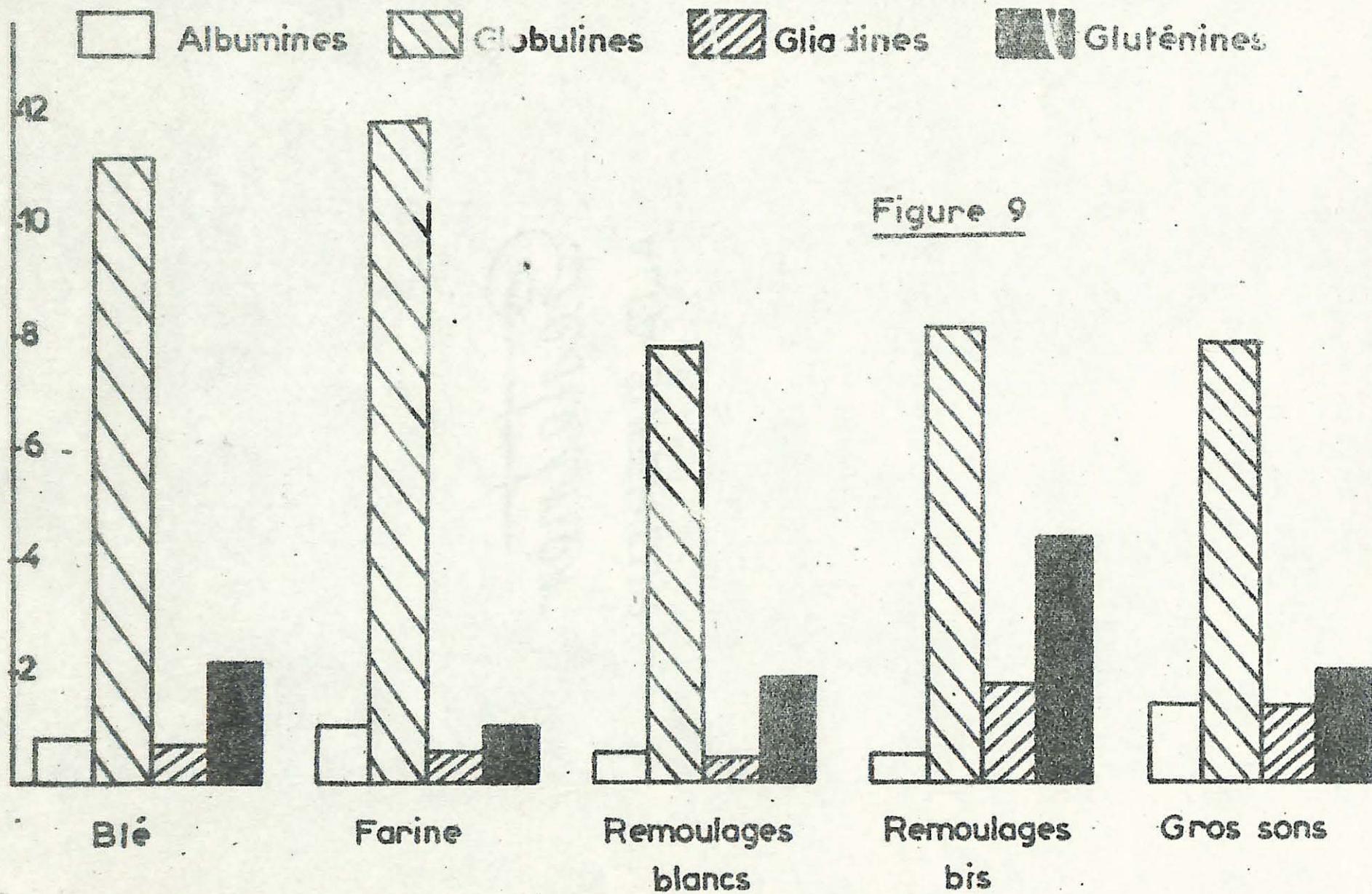


Figure 9

On ignore si de tels procédés ne risquent pas d'amener des dénaturations de nucléoprotéines. Mais quoi qu'il en soit, il ne semble pas exister actuellement d'autre moyen simple pour disperser ces fractions dites insolubles.

Nous avons constaté aussi qu'après fractionnement des protéines, on ne retrouve pas la totalité des acides nucléiques initialement présents. Ce calcul exclut pourtant les risques de pertes au cours de la dialyse et de la lyophilisation, puisque les acides nucléiques sont déterminés en % des protéines (l'azote étant dosé sur des parties aliquotes des extraits, avant dialyse). Faut-il penser qu'une partie des acides nucléiques demeure dans le résidu final après extraction des gluténines ? Dans ce cas, il faudrait admettre qu'ils ne sont plus inclus dans des nucléoprotéines puisque le bilan de l'azote des 4 fractions protéiques est quantitatif.

Nous avons tenté d'identifier des acides nucléiques dans le résidu final. Le seul moyen utilisable est la réaction spécifique de l'ADN (BURTON 1956). Malheureusement, la monochlorhydrine du glycol qui souille encore le résidu semble interférer dans la réaction colorée. Actuellement, nous n'avons donc pas encore pu éclaircir cette question.

b) Dialyse et lyophilisation :

Ces opérations sont indispensables à l'accomplissement de notre étude. Nous signalerons cependant quelques difficultés que leur réalisation présente.

La dialyse contre l'eau ordinaire devrait pouvoir se pratiquer au froid. Notre équipement ne le permet malheureusement pas encore. Nous sommes donc conscients des erreurs que ce grave inconvénient pourrait amener.

Hormis les pertes possibles au cours de l'opération de dialyse, il est difficile de lyophiliser quantitativement. C'est pourquoi, les bilans obtenus par pesée des produits lyophilisés n'étant pas quantitatifs, nous avons dû rapporter nos calculs aux quantités de protéines.

c) Méthodes de dosage:

Le dosage des acides nucléiques présente beaucoup moins d'incertitudes avec les préparations protéiques lyophilisées qu'avec les produits bruts. La méthode de détermination décrite au chapitre III convient généralement très bien, en particulier pour ce qui concerne l'identité des résultats obtenus par dosage du P nucléaire et par spectrophotométrie UV. Cependant, ce fait présente des exceptions, en particulier dans les gliadines et les gluténines, où le phosphore donne généralement des valeurs supérieures à celles du spectre UV. Si ce fait était confirmé, cela signifierait que des formes de P non nucléaire sont extraites, en particulier par l'alcool dilué et par la GMC, mais ne dialysent pas et ne sont pas extraites par l'acide perchlorique à 0° C.

La présence de P résiduel dans la plupart des fractions protéiques est inexplicée. BOURDET et FEILLET (1967) ont émis l'hypothèse de phosphoprotéines. On pourrait aussi penser à des phospholipides car les produits initiaux n'ont pas été délipidés. L'hypothèse de phosphore "glucidique" pourrait encore être émise car on sait que, dans certaines conditions, des alcools peuvent solubiliser une partie du P lié à l'amidon. On ignore, d'autre part, si la GMC n'a pas la même action lors de l'extraction des gluténines à partir d'un résidu très riche en amidon.

2) Résultats:

Les innombrables difficultés analytiques rencontrées font que d'importantes incertitudes demeurent parmi les résultats que nous avons donné. Nous nous proposons donc de reprendre cette étude de façon plus systématique et plus approfondie. Cependant, il semble que l'on puisse prudemment dégager quelques premières conclusions:

Une partie des nucléoprotéines peut être extraite simplement à l'aide de solutions salines. Une autre partie ne peut être entraînée qu'après un traitement plus violent et même dans ces conditions, on ne sait pas si l'extraction est quantitative.

On est donc amené à penser qu'il pourrait exister dans le grain de blé des nucléoprotéines du type "soluble" à l'image des albumines-globulines et des nucléoprotéines du type "insoluble" assimilables à des gliadines ou des gluténines. Il est cependant paradoxal que des nucléoprotéines dont le rôle biologique est typiquement fonctionnel puissent s'apparenter à d'énormes macromolécules telles que les gluténines. Mais comme nous ignorons la structure de ces complexes protéiques de réserve, on pourrait imaginer que des nucléoprotéines du type "soluble" soient intégrées, au cours de la maturation du grain, dans des complexes insolubles, de sorte que de simples extractions salines soient incapables de les libérer.

E) CONCLUSION GENERALE :

Le travail effectué jusqu'à ce jour n'a été qu'une simple approche du sujet proposé, c'est-à-dire la répartition histologique des nucléoprotéines dans le grain de blé.

Les difficultés analytiques rencontrées nous ont parfois contraint à nous intéresser à des constituants autres que les nucléoprotéines. Une partie de notre temps a donc dû être consacrée à des problèmes apparemment annexes tels que l'amidon, les différentes formes de phosphore, les protéines, etc... Cela nous a paru nécessaire d'une part dans la recherche de bilans quantitatifs afin de vérifier l'exactitude de nos déterminations de composés nucléiques ; d'autre part, dans un milieu aussi complexe que le grain de blé où les constituants ne sont pas indépendants, il semble impossible de se consacrer à l'un d'eux tout en ignorant les autres.

Notre travail a concerné à la fois des problèmes d'ordre quantitatif par les déterminations d'acides nucléiques, et des questions d'ordre qualitatif par les extractions de nucléoprotéines dans un état aussi natif que possible. Ce sont deux manières complémentaires d'envisager une étude. La première essaie de donner des résultats exacts mais a le défaut de dénaturer les constituants; la deuxième, qui prétend les obtenir intacts, permet rarement une étude exhaustive.

Cependant, en insistant sur l'extrême fragilité des macromolécules nucléoprotéiques et sur leur rôle essentiellement fonctionnel dans le milieu naturel, il convient de se demander si l'acharnement mis par les chimistes à obtenir des préparations très purifiées, justifié sur un plan strictement analytique, ne diminue pas les chances d'observer les effets biologiques réels de ces substances.

L'étude approfondie des nucléoprotéines dans les régions histologiques du grain de blé ne pourra être accomplie qu'avec l'aide de moyens beaucoup plus fins que ceux utilisés jusqu'ici. En particulier, il conviendra d'analyser les régions du grain obtenues par dissection et non plus les produits de sa mouture industrielle lesquels, bien que très commodes pour approcher les problèmes, ne permettraient probablement pas de tirer des conclusions suffisamment précises. De préférence, un tel travail devrait être envisagé sur un plan collectif, faisant intervenir des connaissances à la fois physiologiques, génétiques, botaniques et agronomiques.

Le travail accompli jusqu'ici, s'il reste éloigné de la physiologie végétale, permet néanmoins d'envisager de nombreuses voies d'étude dans cette discipline. C'est pourquoi, les projets de recherches que nous allons donner seront tout particulièrement axés sur le domaine de la physiologie végétale.

PROJETS DE RECHERCHES

D'assez nombreux travaux ont étudié le rôle des acides nucléiques dans les plantes supérieures, en particulier aux points de vue de la synthèse protéique, des phosphorylations oxydatives et de la photosynthèse. Le plus souvent, ces travaux sont relatifs aux organes en pleine activité métabolique mais s'intéressent plus rarement aux tissus de réserve, dont l'étude est plus délicate.

Or, ces tissus, bien qu'apparemment en état de vie ralentie et moins riches en composés nucléiques, ne devraient pas être négligés car ils sont le siège de phénomènes très particuliers, ne serait-ce qu'au cours de la biosynthèse des substances de réserve (protéines, amidon, cellulose, pentosanes) ou au cours de la germination de la graine. De plus, les recherches devraient porter non seulement sur les acides nucléiques, dont le rôle commence à être bien connu, mais aussi sur les protéines qui leur sont associées, telles les histones, dont le mécanisme d'action dans les biosynthèses doit encore être précisé.

Jusqu'ici, nous avons travaillé à partir de blés arrivés à maturité. Mais, vu la complexité du matériel biochimique de ces blés matures, il semble qu'une étude "dynamique" des acides nucléiques et des nucléoprotéines faciliterait la compréhension de leurs propriétés et de leur rôle biologique.

1) Evolution des composés nucléiques au cours de la maturation du grain :

a) Dans le grain entier :

En effectuant des prélèvements de grains, dès que possible après la floraison et régulièrement (I-2 par semaine) jusqu'à maturité, nous pourrions suivre, par des déterminations d'acides nucléiques, l'évolution quantitative et qualitative (ARN et ADN) au cours de cette période.

Ce travail a déjà été abordé, en particulier par BOURDET et HERARD (1959) sur le blé CAPPELLE (Etude des divers composés phosphorés, et en particulier les acides nucléiques), par INGLE et al. (1965) sur le maïs, par WHEELER et BOULTER (1967) sur la graine de fève.

Il a généralement été constaté une augmentation des quantités d'acides nucléiques exprimées en mg/100 grains mais une baisse des taux rapportés au poids sec. Le rapport ARN/ADN est bas aussitôt après la floraison, car les tissus jeunes dont les cellules présentent un noyau de taille importante, sont caractérisés par une importance relative de l'ADN. Peu à peu, le rapport ARN/ADN croît grâce à une biosynthèse rapide de l'ARN. L'accumulation de substances de réserve détermine au point de vue quantitatif, une dilution des composés nucléiques et du point de vue histologique, leur concentration dans l'embryon.

Parallèlement à l'évolution des 2 acides nucléiques, on note une biosynthèse des protéines. La cinétique d'accumulation des protéines, dans 100 grains, est analogue à celle de l'ARN, comme si la production des protéines du grain était conditionnée au préalable par celle de l'ARN.

Ces travaux demandent à être approfondis, non seulement au point de vue des acides nucléiques (par applications des plus récentes adaptations des méthodes de dosage) mais aussi sous l'aspect des protéines qui leur sont associées. Une étude similaire a d'ailleurs été conduite par FEILLET (1965) relativement à l'ensemble des protéines du grain au cours de la maturation. L'évolution a été suivie grâce à l'importance quantitative des différents groupes protéiques et grâce à l'électrophorèse.

Un travail du même type est à envisager mais en s'intéressant cette fois uniquement aux nucléoprotéines. Ces composés jouant en effet un rôle fondamental au cours des biosynthèses, il est à prévoir que cette étude fournirait des résultats encore plus significatifs et permettrait de mieux connaître les phénomènes de la maturation d'une graine. Mais préalablement, il faudrait mettre au point des moyens analytiques plus fins, par exemple, savoir caractériser spécifiquement une nucléoprotéine sur un gel d'électrophorèse.

On pourrait penser également à séparer plusieurs fractions protéiques par chromatographie et à rechercher une évolution significative de celles qui contiendraient les nucléoprotéines. Enfin, à défaut d'extraire de façon exhaustive les nucléoprotéines, l'étude pourrait se concentrer sur l'une des fractions protéiques connue pour sa richesse en acides nucléiques (fraction globuline) dont certains ont suggéré la similitude avec des histones végétales. Il est vraisemblable que l'identification des globulines (ou d'une partie d'entre elles) à des histones, et l'étude de leur évolution au cours de la maturation ouvrirait la voie à de précieuses découvertes.

b) Dans les différentes régions histologiques :

Ce travail a été abordé par JENNINGS et MORTON (1963) : Etude de l'évolution séparée des acides nucléiques dans l'albumen et le péricarpe (+ testa) du grain de blé.

Dans l'albumen, l'évolution de l'ADN met en évidence une rapide division cellulaire jusqu'au 14^e jour après la floraison, puis une augmentation de la taille du tissu à cause de l'expansion des cellules. Dans le péricarpe (+ testa), l'évolution de l'ADN montre la constance du nombre des cellules présentes, tandis que celle de l'ARN, peu significative, est en accord avec le faible taux des synthèses protéiques dans ce tissu.

Une telle étude devrait être élargie des acides nucléiques aux nucléoprotéines. La découverte d'une évolution significative de ces composés (qui éclairerait vraisemblablement les connaissances relatives à la synthèse protéique) gagnerait à être étendue du blé entier à ses différentes régions histologiques (embryon, péricarpe, assise protéique, albumen) susceptibles d'être obtenues en quantités suffisantes, par dissection.

Signalons que l'application pour ce travail de la technique d'immuno électrophorèse permettrait une étude beaucoup plus fine puisqu'il serait théoriquement possible, en identifiant une protéine par ses propriétés antigéniques, de suivre sa présence dans les différentes régions du grain ainsi qu'au cours de sa maturation.

En dehors des problèmes de la synthèse protéique, il serait fort intéressant de se préoccuper des modifications qualitatives qui ont lieu au cours de la maturation telles que le passage des formes protéiques "solubles" du jeune grain, à des formes "insolubles" dans le grain à maturité ou telles que la réorganisation tardive des gliadines avec perte d'azote au profit des gluténines. L'étude des nucléoprotéines, lesquelles jouent probablement un rôle dans tous ces phénomènes, pourrait donc apporter de nombreux renseignements.

Enfin, on pourrait chercher à mieux connaître le rôle des composés nucléiques au cours de l'accumulation des autres constituants fondamentaux des graines de céréales. La biosynthèse des grains d'amidon, phénomène encore mal connu mais qu'on imagine relié à l'action de certains acides nucléiques, en est un exemple.

c) En relation avec les autres parties de la plante.

L'étude des composés nucléiques pourrait être envisagée en relation avec d'autres organes de la plante. On pourrait en effet, rechercher dans des tissus plus jeunes (pollen, ovaire, ...) des résultats plus significatifs que dans le matériel trop complexe qu'est le grain de blé. De même, l'étude pourrait être reliée à des travaux concernant les feuilles, les racines, ... La découverte de la constitution nucléoprotéique des différents organes pourrait permettre de mieux préciser les processus métaboliques propres à chacun d'eux. Les mécanismes de la croissance du végétal et les transferts entre organes au cours du développement et du vieillissement pourraient être mieux définis à partir de données fournies par les nucléoprotéines elles-mêmes.

2) Evolution des composés nucléiques au cours de la germination :

Cette question a fait l'objet des travaux de MARKOWSKI et al (1967) sur le blé, de HALL et HODGES (1966) sur l'avoine, de LEDOUX et al. (1962) sur l'orge, de INGLE et HAGEMAN (1965) et de WOODSTOCK et SKOOG (1960) sur le maïs, de CHERRY (1963) et de GUITTON (1968) sur l'arachide.

Ces travaux suivent généralement l'évolution quantitative des acides nucléiques pendant les premiers jours qui suivent le début de la germination et parfois l'évolution qualitative (différents types d'ARN).

Il serait également intéressant de se pencher sur l'étude des protéines associées à ces acides nucléiques. Ce travail, faisant encore intervenir les techniques d'électrophorèse, de chromatographie et d'ultracentrifugation, pourrait concerner non seulement la graine entière ou la plantule, mais aussi les différentes régions histologiques de la graine. Au cours de la germination on constate en effet de nombreux transferts de composés de la graine vers la jeune plante. Il serait important de connaître l'origine des produits de réserve dégradés préférentiellement en vue de l'alimentation de la plantule et le rôle possible des composés nucléiques dans la détermination de ces phénomènes.

La germination étant un phénomène très complexe, dont certains aspects sont encore mal connus, une meilleure connaissance des composés nucléiques ne pourrait être que bénéfique en particulier pour savoir si la présence d'acides nucléiques dans la graine mature n'est que la trace de composés nucléiques ayant joué un rôle à la maturation ou bien s'ils constituent une réserve en vue d'une utilisation précède à la germination.

3) Influence de certains facteurs sur la composition nucléoprotéique de la graine :

L'étude de l'influence de certains facteurs compléterait utilement l'étude dynamique des nucléoprotéines de la graine.

En particulier, on pourrait essayer de déterminer l'influence des conditions culturales (sols, fertilisants, etc...) sur le mode d'action des nucléoprotéines. Il est possible que certaines propriétés passées inaperçues dans le blé normal, se manifestent lors de traitements extrêmes (engrais azotés ou phosphorés) et révèlent ainsi de nouvelles voies de recherches.

On pourrait de même envisager l'action d'agents mutagènes sur la plante en vue de préciser leur action au niveau des gènes et de faire apparaître des données nouvelles qu'un blé normal n'aurait pas révélées.

CONCLUSION : Bien que le rôle des acides nucléiques dans le support et la transmission du code génétique et l'action des protéines du type histone dans la régulation des gènes aient été montrés pour certains organismes, les phénomènes demandent à être précisés, en particulier pour des organes aussi curieux que les graines amylacées.

Les travaux pourraient être orientés particulièrement vers le rôle des nucléoprotéines dans les phénomènes d'accumulation qui caractérisent la maturation des graines ainsi que vers l'action et le devenir de ces composés au cours des dégradations et des transferts qui accompagnent la germination du grain et l'apparition d'une plante nouvelle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALLEN R.J.L., 1940. *Biochem. J.*, 34, 858.
- AUBEL-SADRON G. et al. Etude de la préparation des acides nucléiques par les sels d'ammonium quaternaire. *Biochim. Biophys. Acta*, 42, 542-543, 1960.
- AUBEL-SADRON G. et al. Action des sels d'ammonium quaternaire sur les acides nucléiques. *Ibid.* 53, II-18, 1961.
- ÄYRÄPÄÄ T. 1957. On the presence of nucleoproteins and lipoproteins in the salt-soluble protein fraction of barley. *Acta Chemica Scandinavica II*, 1565-1575.
- BECHTEL et al. 1964. Carbohydrates. In: *WHEAT Chemistry and technology*, 7, 277.
- BOURDET A. 1964. Qualité protéique et force des blés. *Ann. Technol. Agric.* 13, I, 45-66.
- BOURDET A. Quantitative estimation of phosphorus compounds in flours. *Research Final Progress Report PL 480*. 1965.
- BOURDET A. et HERARD J. Evolution des constituants phosphorés du grain de blé au cours de la maturation. *Acides nucléiques et synthèse protéique. Ann. Physiol. Végét.* 1959, I, 29-52.
- BOURDET A. et HERARD J. 1960. Association des protéines et de différentes formes de phosphore dans le gluten. *Ann. Technol. Agric.* 4, 363-392.
- BOURDET A. et FEILLET P. 1967. Distribution of phosphorus compounds in the protein fraction of various types of wheat flours. *Cereal Chemistry*, 44, 5, 457-482.
- BOURDET A. et FEILLET P. 1967. Composition protéique et caractéristiques génétiques des blés. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 49, 10, 1273-1283.
- BOURDET A. et FEILLET P. 1966. Caractérisation des lipides des farines turboséparées. *Industries agricoles et alimentaires*, 5, 553-558.
- BRIGGS 1939. *Journ. of Biol. Chem.* 21, 139.
- BROWN et al. 1963. A sensitive method for the extraction of DNA in plant leaves tissues. *Phytochemistry*, 2, 221-224.
- BURTON K. 1956. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA. *Biochem. J.* 62, 315-323.
- CERIOTTI G. 1952. A microchemical determination of DNA. *J. Biol. Chem.* 198, 297.
- CERIOTTI G. 1955. Determination of nucleic acids in animal tissues. *J. Biol. Chem.* 214, 59.

- CHERRY J. 1962. Nucleic acid determination in storage tissues of higher plants. *Plant Physiol.* 37, 670-678.
- CHERRY J. 1963. Nucleic acids changes in the storage tissues of seeds during germination. *Biochim. Biophys. Acta* 68, 193-198.
- CLARKE et SCHRYVER 1917. *Biochem. J.* II, 319.
- DESVEAUX-CHABROL J. 1968. Acquisitions récentes sur la biologie des histones. *Année Biol.* 7, 7-8, 369-427.
- DISCHE Z. *Mikrochemie* 1930, 8, 4.
- DUTTA 1959. *Indian J. Pharmac.* 21, 8.
- EBEL et al. 1961. Etude de l'influence des sels d'ammonium quaternaire sur l'activité biologique des acides nucléiques. *C. R. Soc. Biol. Nancy.* 1088-89.
- FEILLET P. 1965. Contribution à l'étude des protéines du blé. Influence des facteurs génétiques, agronomiques et technologiques. (Thèse de Docteur-Ingénieur). *Ann. Technol. Agric.* 14, HS.
- FEILLET P. 1967. Les protéines solubles des céréales. Mise au point bibliographique. *Ibid.* 16, 2, 135-182.
- FEILLET P. et BOURDET A. Les protéines solubles du blé. I - Isolement et caractérisation des albumines et des globulines. *Ibid.* 1968, 17, 5, 217-225.
II - Fractionnement des albumines par chromatographie et par électrophorèse. *Ibid.* 1968, 17, 4, 267-276.
- FISKE et SUBBAROW 1926. *Journ. of Biol. Chem.* 66, 375.
- GALITZ et HOWELL 1965. Measurement of RNA and total free nucleotids of developing soybean seeds. *Physiologia Plantarum.* 18, 1018.
- GEOFFROY R. *Le blé, la farine, le pain.* Dunod. Paris. 1939.
- GUINN 1966. Extraction of nucleic acids from lyophilized plant material. *Plant Physiol.* 41, 689-695.
- HALL et HODGES 1966. Phosphorus metabolism of germinating oat seeds. *Ibid.* 41, 1459-64.
- HOLDGATE et GOODWIN 1965. Quantitative extraction and estimation of plant nucleic acids. *Phytochemistry.* 4, 831-843.
- HUTCHINSON et MUNRO 1961. The determination of nucleic acids in biological materials. *Analyst.* 86.
- INGLE J. 1963. The extraction and estimation of nucleotides and nucleic acids from plant material. *Phytochem.* 2, 353-370.
- INGLE J. 1965. Changes in composition during development and maturation of maize seeds. *Plant physiol.* 40, 835.
- INGLE J., BEEVERS L. et HAGEMAN R.H. 1964. Metabolic changes associated with the germination of corn. I - Changes in weight and metabolites and their redistribution in the embryo-axis

- INGLE J. et HAGEMAN R.H. 1965. Metabolic changes associated with the germination of corn. II - Nucleic acid metabolism. *Plant Physiol.* 40, 48-53.
- IOFFE K.G. 1968. A general preparative method for the successive extraction of proteins and peptids from the seeds of leguminous and mallow plants. *Chem. Abstr.* 69, 65095.
- IWAI K. 1964. Histones of rice embryo and chlorella. In "The nucleohistones" de BONNER and TS'0. 59.
- JAVILLIER et al. 1931. *Bull. Soc. Chim. Biol. Paris.* 13, 678.
- JENNINGS et MORTON. 1962. Changes in nucleic acids and other phosphorus containing compounds of developing wheat grain. *Aust. J. Biol. Sci.* 16, 2, 332.
- JENNINGS et MORTON. 1962. Changes in carbohydrates, protein and non-protein nitrogenous compounds of developing wheat grain. *Ibid.* 16, 2, 318.
- JERVELL et al. *J. Biol. Chem.* 1958, 231, 945.
- KING 1932.
- KLEIN et al. 1954. *Exp. Cell. Res.* 6, 211.
- KONDO K. et MORITA Y. 1954. Studies on proteins (58). Nucleic acids in rice-glutenin. *Bull. Res. Inst. Food. Sci. Kyoto Univ.* 15, 1, 1954.
- KOSHIYAMA I. et IGUCHI N. 1965. Studies on soybean protein. Part I. A ribonucleoprotein and ribonucleic acids in soybean casein fraction. *Agr. Biol. Chem.*, 29, 2, 144-150, 1965.
- LALAND et al. 1950. Isolement d'ADN à partir de seigle et de blé. *Acta Chemica Scand.*, 4, 6, 885-91.
- LAVEE S. 1968. Dosage du RNA et du DNA dans la moelle de tabac. *Anal. Biochem.* 26, 369-380.
- LEDOUX et al. 1962. Nucleic acids metabolism of barley seedlings. *Biochim. Biophys. Acta.* 55, 97-104.
- LEVENE et LAFORGE 1910. *Ber.* 43, 3164.
- LIPSHITZ et CHARGAFF 1956. Preparation of the DNP and fractionation of DNA from wheat germ. *Biochim. Biophys. Acta* 19, 2, 256-66, 1956.
- LOWRY et al. *J. Biol. Chem.* 193, 265, 1951.
- LUSENA 1951. Preparation of RNP and RNA from wheat germ. *Cereal Chem.* 28, 400.
- LYTTLETON 1960. *Biochem. J.* 74, 1960, 82.
- MACHEBOEUF et DELSAL. Dosage de très petites quantités de P dans des matières organiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1943, 25.
- MARKOWSKI et MADEJ 1968. Changes in nucleic acids content during germination of wheat. *Bull. Acad. Polonaise Sci.* II, XVI, 3.

- MARTIN E.M. et MORTON R.K. 1956. *Biochem. J.* 64, 221-35.
- MASONI G. 1915. Nutritive value of wheat flour and of bread in relation to phosphorus fertilizers. *Staz. Sper. Agrar. Ital.* 48, 385, 1915.
- MATSUSHITA S. 1958. Etude sur les acides nucléiques végétaux;
 I - Teneurs en acides nucléiques des graines de céréales et de légumineuses et de certaines fractions protéiques isolées. *Res. Inst. Food Sc. Kyoto Univ.* 14, 14, 1958.
 II - Variations des teneurs en ARN des grains de riz et de blé au cours de la maturation. *Ibid.* 14, 24, 1958.
 IV - On the distribution and forms of RNA in wheat leaves cells. *Ibid.* 15, 1-II, 1958.
- MATSUSHITA S. 1959. Sur la formation des protéines et les variations des taux d'ARN et d'activité RNAsique dans les grains de blé en cours de maturation. *Ibid.* 19, 1, 1959.
- Mc DONALD I.V. 1954. *Biochem J.* 57, 566.
- MEJBAUM W. *Hoppe Seyl. Z.* 1939, 258, 117.
- MIHAILOVIC et al. 1963. Dynamics of various forms of phosphorus in wheat during its ontogenesis. 3 - RNA in ripe grain of different varieties of wheat. *Bull. Acad. Serbe.* 27, 4.
- MIHAILOVIC et al. 1964. Chemical investigation of wheat;
 IV - Chemical investigation of wheat. Dynamics of various forms of phosphorus during its ontogenesis. *Cereal Chem.* 41, 5, 351-364, 1964. *Bull. Acad. Serbe.* 1964, 10.
- MOSSE J. et BAUDET J. 1962, 1963, 1964. Etude de l'extraction des protéines des graines.
 I - Extraction par l'eau des protéines de la farine de blé. *Ann. Physiol. Vég.*, 4, 315-331.
 II - Influence des facteurs intervenant dans l'extraction des protéines de la farine solubles dans l'eau. *Ibid.* 5, 151.
 III - Extraction par l'eau et par les solutions salines des protéines de la farine de blé. *Ibid.* 5; 303-319.
 IV - Extraction exhaustive et fractionnement des protéines de la farine de blé. Composition en acides aminés des 17 fractions séparées. *Ibid.* 6.
- MOUREAUX T. 1965. V - Les composés phosphorés de la farine de blé, facteurs du fractionnement protéique au cours de l'épuisement de la farine par l'eau. *Ibid.* 7, 1, 5-24.
- NIEMAN et al. Estimation of nucleic acids of plant leaves. *Plant. Physiol.* 1963, 38, 31.
- OGUR et ROSEN. The nucleic acids of plants tissues. *Arch. Biochem. and Biophys.* 25, 1950, 262.
- OSBORNE T.B. 1907. The proteins of wheat kernel. Carnegie Institution of Washington. Pub. n° 84.
- RÖTTGER et al. Determination of RNA in plant material. *Biochim. Biophys. Acta*, 61, 1962, 621-623.

- SCHMIDT G. et THANNHAUSER S.J. 1945. A method for the determination of DNA, RNA and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1945, 161, 83-89.
- SCHNEIDER W.C. 1945. Phosphorus compounds in animal tissues: I - Extraction and Estimation of Desoxypentose Nucleic Acid and of Pentose Nucleic Acid. *J. Biol. Chem.* 1945, 161, 293-303.
- SMILLIE R.M. et KROTKOV G. Estimation of nucleic acids in some algae and higher plants. *Can. J. Botany*, 38, 1960, 31.
- SOLOMON J.B. 1957. *Biochim. Biophys. Acta*, 13, 516.
- TAKASUGI N. 1942. *J. Chem. Soc. Japan.*, 63, 654.
- THIVOLLE L.C.R. 1944. *C.R. Soc. Phys. Biol.* 18, 171.
- WEBB J.M. et LEVY H.B. 1958. in: Glick D. Editor, "Methods of Biochemical Analysis" Interscience Publishers Inc. New York, 1958, vol VI, I.
- WHEELER et BOULTER 1967. Nucleic acids of developing *Vicia Faba*. *J. Exp. Bot.* 18, 55, 229-240, 1967.
- WOODSTOCK et SKOOG 1960. Relationships between growth rates and nucleic acids content in the roots of corn. *Am. J. Bot.* 47, 9, 1960.
- ELIAS 1963. The extraction of DNA preparation from small quantities of rye embryos. *Acad. Rep. Populare Romine., Studii Cercetari Biochim.* 6, 4, 579-81, 1963.
- KING E.J. 1932. *Biochem. J.* 26, 292.
- Mc MULLEN A.I. 1959. *Biochem. J.* 72, 682.
- OOTA Y. et OSAWA S. 1954. Migration of storage RNA from cotyledons into growing organs of bean seed embryos. *Experientia*, 10, 254-256.
- OSBORNE T.B. et HARRIS I.F. 1901. The nucleic acid of the wheat embryo. *Report Connect. Agr. Exper. Station.*, 365-430.
- OSBORNE T.B. et CAMPBELL G.F. 1900. Nucleic Acid of the embryo of wheat and its protein compounds. *J. Amer. Chem. Soc.* 22, 379.
-

