

NOTE TECHNIQUE

LA DÉTERMINATION
DES CONSTITUANTS NUCLÉIQUES DU BLÉ
ET LEUR RÉPARTITION DANS LE GRAIN

J.-C. AUTRAN et A. BOURDET

avec la collaboration technique de Chantal GARNIER et Ginette GOBIN

*Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés, I. N. R. A.,
16, rue Nicolas-Fortin, 75 - Paris (13^e)*

RÉSUMÉ

Plusieurs méthodes de détermination des acides nucléiques ont été appliquées au grain de blé mûr et à quelques produits de sa mouture industrielle. L'origine des différences observées dans les résultats est discutée. Trois méthodes semblent cependant s'accorder à fournir des valeurs significatives permettant de donner une image de la répartition histologique des constituants nucléiques dans le grain de blé.

Mots clés : *acides nucléiques, grain de blé, dosage.*

La détermination quantitative des acides nucléiques dans un matériel biologique constitue toujours une étape nécessaire au cours de l'étude de ces composés.

D'innombrables travaux relatifs aux tissus animaux ont abordé cette question et des revues très complètes ont été publiées (HUTCHISON et MUNRO, 1961 ; MUNRO et FLECK, 1966). S'il apparaît que le domaine animal ne présente que peu de difficultés à cette étude, les auteurs signalent, par contre, l'échec des méthodes classiques d'extraction et de dosage des acides nucléiques lorsqu'on les transpose au secteur végétal (SMILLIE et KROTKOV, 1960 ; HOLDGATE et GOODWIN, 1965 ; PRAKASH, 1970).

La détermination des acides nucléiques de tissus végétaux apparaît donc toujours plus difficile que dans les tissus animaux à cause, par exemple, de constituants parasites absorbant dans l'UV ou de polysaccharides à forte concentration qui interfèrent respectivement avec les mesures spectrophotométriques ou les dosages de sucres nucléiques.

Les difficultés sont encore plus grandes avec les tissus de réserve comme les graines de céréales, où les teneurs en ARN et en ADN sont beaucoup plus faibles que dans les tissus à métabolisme actif. Pour tenter de résoudre ce problème, nous avons volontairement choisi un matériel dont

l'étude est délicate : le grain de blé mûr. Nous lui avons appliqué les méthodes les plus classiques de détermination des acides nucléiques afin de comparer leur efficacité et de retenir les plus favorables.

Leur application à quelques produits de la mouture industrielle du blé (farine, germes, sons et remoulages) nous a permis d'établir un bilan approché de la répartition histologique des composés nucléiques dans le grain.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Le Blé étudié est un *Triticum aestivum* (variété *Cappelle*). Les produits de sa mouture industrielle, classés selon leurs dimensions, sont constitués respectivement de :

- la farine (78,3 p. 100 du grain), représentative de l'albumen ;
- les gros sons (14,3 p. 100), qui correspondent aux enveloppes du grain, auxquelles la majeure partie de l'assise protéique reste attachée ;
- les remoulages bis (5,8 p. 100), contenant à la fois des débris d'enveloppes et des fragments d'assise protéique ;
- les remoulages blancs (1,6 p. 100), riches en cellulose provenant des parois cellulaires ;
- le germe, non séparé selon le diagramme de mouture utilisé, est contenu dans les remoulages. Les échantillons de germe dont il est fait état ont été spécialement préparés, dans d'autres conditions, à partir de la même variété.

Avant extraction des acides nucléiques, les différents produits ont subi un broyage (sauf la farine et les remoulages), une délipidation par l'éthanol-éther à 75°C et une élimination des composés acido-solubles à froid par l'acide perchlorique 0,25 N.

L'extraction des acides nucléiques, soit sous la forme de leurs produits d'hydrolyse, soit sous la forme de nucléoprotéines, a été réalisée à l'aide d'adaptations des techniques suivantes :

1^o méthode de SCHNEIDER (1945), selon SCHNEIDER *et al.* (1950) : extraction globale à l'aide d'acide perchlorique 0,5 N à 90°C ;

2^o méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER (1945), selon l'adaptation de SMILLIE et KROTKOV (1960) : extraction globale par incubation dans KOH 0,3 N suivie d'une séparation de l'ARN et de l'ADN par acidification du milieu ;

3^o méthode de OGUR et ROSEN (1950) : extraction différentielle de l'ARN et de l'ADN, respectivement par l'acide perchlorique N à 0°C et 0,5 N à 90°C ;

4^o hydrolyse sulfurique (directement effectuée sur les produits) des acides nucléiques, suivie d'une précipitation sélective par le nitrate d'argent des bases puriques ainsi libérées (NETUPSKAYA *et al.*, 1959) ;

5^o extraction des acides nucléiques par NaCl 10 p. 100 à l'ébullition suivie d'une précipitation par l'alcool (DAVIDSON et SMELLIE, 1952) ;

6^o extraction des acides nucléiques par le phénol, selon la technique employée par ESNAULT (1968) ;

7^o solubilisation des nucléoprotéines par NaCl 1 M, à basse température suivie d'une hydrolyse perchlorique de l'extrait dialysé et lyophilisé. Les taux d'acides nucléiques sont rapportés au produit initial sur la base de l'azote (AUTRAN) ;

8^o extraction des nucléoprotéines par NaCl 1 M, à basse température, suivie d'une précipitation à l'acide trichloracétique et d'une hydrolyse perchlorique des acides nucléiques du précipité (adaptation de la technique de KERN, 1960).

Le dosage proprement dit des acides nucléiques est réalisé à partir des extraits obtenus, soit par lectures directes en UV (lorsque le spectre est suffisamment représentatif d'un acide nucléique) soit par dosage du phosphore nucléique. L'ADN a toujours pu être déterminé spécifiquement par dosage du désoxyribose (BURTON, 1956) mais, du fait de l'interférence des pentosanes du blé, l'ARN n'a jamais pu être évalué par l'intermédiaire de son ribose.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Certains des procédés d'extraction utilisés ne semblent pas convenir à la détermination quantitative des acides nucléiques dans les matériels étudiés.

Ainsi, les extractions par NaCl 10 p. 100 à l'ébullition et par le phénol n'apparaissent pas

quantitatives, surtout pour l'ADN. Par contre, les acides nucléiques sont solubilisés de façon quasi totale et vraisemblablement sous forme de nucléoprotéines, lorsqu'on procède à une dispersion énergétique dans NaCl 1 M, à basse température. Le dosage à partir d'un hydrolysât perchlorique à chaud de l'extrait salin dialysé ne présente alors aucune difficulté. En revanche, la précipitation trichloracétique de ces mêmes nucléoprotéines, comme le préconise KERN (1960), n'apparaît pas quantitative, particulièrement chez l'albumen du grain de blé.

Le meilleur procédé d'extraction globale semble être celui de SCHNEIDER (1945), à condition d'opérer avec l'acide perchlorique à 90°C (SCHNEIDER *et al.*, 1950).

L'extraction différentielle selon OGUR et ROSEN (1950) donne de bons résultats, mais une faible partie de l'ARN semble échapper à l'extraction à froid. Enfin, la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER (1945), qui permet une bonne séparation des deux types d'acides nucléiques, est d'un emploi délicat avec les produits riches en amidon.

Les principales difficultés proviennent du dosage lui-même : en effet, même quand l'extraction est quantitative, le spectre d'absorption des extraits à chaud n'est généralement pas assez caractéristique pour permettre une lecture directe en UV, à 260 ou 265 nm. On note fréquemment des perturbations vers 320 nm et 280 nm, particulièrement chez les enveloppes du grain de blé, ayant peut-être pour origine des phénols ou des produits de dégradation de la lignine.

L'estimation par l'intermédiaire du phosphore nucléique se heurte aussi à des difficultés, à cause de la richesse du grain en amidon ; en effet, les résultats sont considérablement faussés par le fait que la majeure partie du phosphore contenu dans l'amidon (0,04 à 0,08 p. 100) se trouve solubilisée dans les mêmes conditions que le phosphore nucléique.

Dans ces conditions, aucun procédé ne semble permettre de déterminer la somme ARN + ADN, même lorsque l'extraction est quantitative. Le dosage reste cependant possible par mesure spectrophotométrique des bases pures obtenues par précipitation sélective au nitrate d'argent à partir d'un hydrolysât sulfurique du matériel.

En définitive, les trois seules méthodes de détermination qui semblent utilisables avec les matériels étudiés, et qui conduisent d'ailleurs à des résultats analogues, sont les suivantes :

- extraction des nucléoprotéines par NaCl 1 M et dosage des acides nucléiques sur les produits dialysés et lyophilisés obtenus (AUTRAN) ;
- hydrolyse sulfurique du grain et estimation par les bases pures (NETUPSKAYA *et al.*, 1959) ;
- extraction perchlorique différentielle (OGUR et ROSEN, 1950) avec estimation par défaut de l'ARN par lecture UV, et de l'ADN par colorimétrie (BURTON, 1956).

Il faut signaler que les écarts constatés comparativement entre les 8 méthodes varient avec le matériel : ces écarts sont faibles avec le germe de blé, dont les tissus sont pauvres en impuretés et riches en acides nucléiques, mais sont importants avec le blé entier ou la farine. Dans ce dernier matériel, il se pourrait de plus qu'une dégradation des acides nucléiques, consécutive à la dégénérescence des cellules de l'albumen au cours de la maturation, explique certaines propriétés de solubilité anormales, se traduisant par une plus mauvaise reproductibilité des résultats.

La concordance des valeurs obtenues par les 3 méthodes retenues a cependant permis d'établir le tableau 1 (en mg d'acides nucléiques pour 100 g de matériel sec).

Il est également intéressant de rapporter les quantités d'acides nucléiques au grain total en faisant intervenir les proportions relatives de chacune des « régions histologiques » (tabl. 2) (en p. 100 d'acides nucléiques par rapport aux acides nucléiques totaux du grain entier).

Les acides nucléiques semblent alors se diviser en trois parties d'importances voisines, correspondant à l'albumen, aux remoulages et aux enveloppes. Si l'on considère que les acides nucléiques contenus dans les remoulages proviennent uniquement du germe, on trouve — compte tenu de l'analyse nucléique des préparations purifiées de cette région — une teneur du grain en germe de 2,5 p. 100 environ, pourcentage communément signalé.

Cela permet de penser sur le germe lui-même n'apporte que le tiers environ des acides nucléiques du grain et d'infirmer l'hypothèse selon laquelle les acides nucléiques présents dans la farine pourraient avoir le germe pour origine. Il nous semble, au contraire, qu'une partie, au moins, des composés nucléiques de la farine préexiste dans l'albumen du grain et qu'elle corres-

TABLEAU I

Composition nucléique du blé Cappelle et de quelques produits de sa mouture industrielle (en mg d'acides nucléiques pour 100 g de matériel sec)

	ARN	ADN	AN totaux	ARN/ADN
Blé (100 %)	139	86	225	1,62
Farine (78,3 %)	62	50	112	1,24
Remoulages blancs (1,6 %)	542	253	795	2,14
Remoulages bis (5,8 %)	855	365	1 220	2,34
Gros sons (14,3 %)	353	167	520	2,11
Germe	2 527	1 028	3 555	2,46

TABLEAU 2

Pourcentage d'acides nucléiques des différents produits de mouture par rapport aux acides nucléiques du grain entier

	ARN	ADN	AN totaux
Farine	30,8	44,0	35,6
Remoulages blancs	5,5	4,5	5,2
Remoulages bis	31,5	24,7	29,0
Gros sons	32,2	26,8	30,2

ponde aux vestiges des systèmes ayant participé à la synthèse des tissus de réserve durant la maturation. Enfin, les acides nucléiques trouvés dans les enveloppes du grain sont probablement apportés par l'assise protéique.

Cette étude des acides nucléiques ne constitue que les préliminaires d'un travail ayant pour but l'identification des nucléoprotéines dans les différents matériels envisagés.

Il se peut, en effet, que d'éventuelles différences qualitatives dans la constitution des protéines apparemment associées aux acides nucléiques apportent des données bien plus précises dans la connaissance des différentes régions du grain. C'est ce que nous étudions actuellement.

Reçu pour publication en mars 1971.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AUTRAN J.-C. (Résultats non publiés).
 BURTON K., 1956. A study for the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA. *Biochem. J.*, **62**, 315-323.
 DAVIDSON J. N., SMELLIE R. M. S., 1952. Phosphorus compounds in the cell. *Biochem. J.*, **52**, 594-599.
 ESNAULT R., 1968. Étude de l'action de l'acide β -indolyl-acétique sur le métabolisme de l'ARN de segments de coléoptiles d'avoine. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **50** (11), 1887-1913.
 HOLDGATE D. P., GOODWIN T. W., 1965. Quantitative extraction and estimation of plant nucleic acids. *Phytochemistry*, **4**, 831-843.
 HUTCHISON W. C., MUNRO H. N., 1961. The determination of nucleic acids in biological materials. *Analyst*, **86**, 768-813.

- KERN H., 1960. Zur quantitativen Bestimmung von Nukleinsäuren. *Planta*, **55**, 259-273.
- MUNRO H. N., FLECK A., 1966. The determination of nucleic acids ; in : *Methods of biochemical analysis*, vol. 14 ; 113-176. Interscience Publishers, New York.
- NETUPSKAYA S. V., PERUANSKII Y. V., KONAREV V. G., 1959. Détermination spectrophotométrique des acides nucléiques des végétaux, d'après les bases puriques (en russe). *Biol. Nuklein Obmena u Rastenii, Ufa, Sbornik*, 148-153.
- OGUR M., ROSEN G., 1950. The nucleic acids of plant tissues. *Arch. Biochem.*, **25**, 262-276.
- PRAKASH S., 1970. Recent advances in the procedures for the extraction of nucleic acids from plants and their estimation. *J. Sci. industr. Res.*, **29** (5), 244-250.
- SCHMIDT G., THANNHAUSER S. J., 1945. A method for the determination of DNA, RNA, and phosphoproteins in animal tissues. *J. biol. Chem.*, **161**, 83-89.
- SCHNEIDER W. C., 1945. Phosphorus compounds in animal tissues. *J. biol. Chem.*, **161**, 293-303.
- SCHNEIDER W. C., HOGEBOM G. H., ROSS H. E., 1950. *J. Nat. Cancer Inst.*, **10**, 977.
- SMILLIE R. M., KROTKOV G., 1960. The estimation of nucleic acids in some algae and higher plants. *Canad. J. Bot.*, **38**, 31-49.
-