

O. R. S. T. O. M.

TRAVAUX PRATIQUES DE PHYSIOLOGIE VEGETALE

dirigés par Melle D. SCHEIDECKER

assistée par Melle M. BOULOUX

*

* *

- L'EQUILIBRE ACIDO-BASIQUE DANS LES TISSUS VEGETAUX
- ACIDITE TITRABLE ET ALCALINITE DES CENDRES
- DETERMINATION DU pH (méthodes générales et application aux tissus et extraits végétaux).

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire
N° : 29405 ex 1
Cote : B

L'EQUILIBRE ACIDO-BASIQUE DANS LES TISSUS VEGETAUX

(d'après BONNER, Plant Biochemistry, p.159-161)

Les acides organiques des tissus végétaux n'existent pas seulement sous forme de molécules libres, mais se combinent généralement, en plus ou moins grande proportion, sous forme de sels avec les cations minéraux absorbés par la plante. Ainsi se constitue un système tampon acide organique - sel d'acide organique qui joue son rôle dans la détermination du pH de la cellule et exerce aussi une certaine protection vis-à-vis des agents du milieu extérieur qui pourraient autrement altérer gravement le pH cellulaire.

D'un autre point de vue, les acides organiques jouent le rôle d'anions vis-à-vis des cations minéraux absorbés par la plante. En fait, dans certains tissus, la plus grande partie des cations minéraux se trouve sous forme de sels d'acides organiques.

Dans le cas, très étudié, des fruits de Citrus, on a montré que le pH du jus est déterminé à peu près exclusivement par :

- a) la quantité totale d'acide,
- b) le rapport entre acide libre et acide combiné sous forme de sels, suivant la formule :

$$\text{pH} = \text{pK} + \log. \frac{\text{Acide Salifié}}{\text{Acide Libre}}$$

où pK = constante de dissociation de l'acide. Ce qui signifie qu'un changement dans le rapport, comme celui qui peut être provoqué par les fluctuations dans l'absorption des cations au cours du développement du fruit, peut avoir un effet relativement minime sur le pH. On a calculé, par exemple, que, quand les cations du fruit de pamplemousse doublaient, le pH variait de 0.3 unités pH environ.

Certains auteurs ont cherché à établir une corrélation entre l'acidité titrable des extraits de plantes et leur pH. Une telle corrélation existe effectivement dans le cas des fruits de Citrus, où la plus grande partie des acides se trouve sous forme libre, et, parfois, dans le cas des pommes. Mais pour beaucoup d'autres tissus, y compris ceux des autres fruits, il n'y a pas de rapport entre l'acidité titrable et le pH. Ce qui est dû évidemment au fait que la détermination de l'acidité titrable ne rend compte que du terme acide libre dans l'expression $\log. \frac{\text{Acide salifié}}{\text{Acide libre}}$.

Ce n'est que dans les fruits que l'équilibre acido-basique joue un rôle particulièrement important. Lors de l'absorption des sels minéraux par les racines ou par d'autres organes, l'absorption des cations peut être inférieure ou supérieure à celle des anions. Dans le cas

des fruits, l'absorption excédentaire de cations est accompagnée de la neutralisation des acides. Dans les racines, une production active d'acides organiques accompagne une absorption disproportionnée de cations, alors qu'une disparition d'acides organiques accompagne une absorption disproportionnée d'anions. Les acides contenus dans les cellules, en plus de leur fonction passive de système tampon, sont capables de jouer un rôle de système régulateur, avec beaucoup de souplesse, des variations quantitatives appropriées permettant l'adaptation aux problèmes posés par l'absorption des éléments minéraux. Cette action de régulation est particulièrement remarquable dans le maintien de l'équilibre ionique au cours de l'absorption et de la réduction des nitrates, les cations résiduels étant pris en charge

Il n'est pas recommandé d'opérer sur du matériel frais, du fait des transformations chimiques possibles en cours de manipulation et du fait que les cellules vivantes tendent à retenir les liquides cellulaires. Pour pouvoir, dans ce cas particulier, travailler avec sécurité sur du matériel sec, il faut que le séchage soit fait avec des précautions spéciales (sous vide à froid, lyophilisation, etc...) - (Voir pour les causes d'erreurs qui interviennent, J.WOLF, Moderne Methoden du Pflanzenanalyse, Vol.II, p.479-480). La meilleure solution semble souvent être de se servir de matériel stabilisé en milieu clos (fiolle bien bouchée), par le froid (-18°C) ou la chaleur (bain marie bouillant). La stabilisation ayant eu lieu sans changements appréciables de la concentration des liquides organiques, on peut alors doser l'acidité soit sur le jus de presse (obtenu avec une presse à main, le matériel végétal étant enfermé dans un linge blanc bouilli avec de l'eau distillée), soit sur un extrait (obtenu à partir du matériel broyé, soit avec de l'eau, soit avec un solvant approprié).

Le choix du procédé - jus de presse ou extrait - dépend surtout de la nature des tissus étudiés. S'il est facile d'obtenir des jus de presse à partir de fruits riches en eau par exemple, pour d'autres organes il faut opérer sur extrait.

Pour une simple titration de l'acidité libre, on peut broyer le matériel stabilisé et faire une extraction à l'eau sous réfrigérant, en comptant 150cc d'eau environ pour 50 g. de matériel végétal. On maintient l'ébullition pendant une heure. On recueille l'extrait dans une éprouvette graduée. On mesure le volume après refroidissement en ajustant à 250cc ou 300cc, etc.. pour simplifier les calculs. On filtre (il est souvent nécessaire d'opérer sous vide avec filtre de Buchner et papier Chardin).

- 1) Pour déterminer alors l'acidité de titration (c'est-à-dire les ions H des acides libres, et aussi des sels acides), on peut se contenter dans certains cas de la titration directe, de l'extrait ou du jus, par NaOH en présence de phénolphthaléine.
- 2) Pour opérer avec plus de rigueur, il faut traiter l'extrait initial de manière à séparer les acides présents dans le milieu des sucres, des pectines et des protéines. En milieu assez fortement basique (ou acide), ces corps se décomposeraient plus ou moins complètement pour donner naissance à des produits d'hydrolyse dont certains sont acides et viendraient augmenter l'acidité du milieu.

Cette séparation des acides précipités sous forme de sels de plomb, à partir d'extrait aqueux, est une opération longue et assez délicate nécessitant l'emploi d'une centrifugeuse. La technique en est décrite en détails par J. WOLF dans *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, t. II, p. 481/.

Sur la solution ainsi obtenue, on peut alors utiliser la méthode de dosage suivante :

Une partie aliquote "a" cc de l'extrait est alors additionné de "a" cc de NaOH N et chauffée dix minutes au bain-marie bouillant (élimination des anhydrides d'acides) ; on ajoute ensuite "a" cc de HCl environ 1,2N, on chauffe de nouveau dix minutes au bain-marie (élimination de CO₂). Après refroidissement, on titre avec "y" cc de NaOH 0,1N, en retour et en présence de phénolphthaléine. Le titre de NaOH N et 0,1N doit être

DETERMINATION DU pH

(METHODES GENERALES ET APPLICATION AUX TISSUS ET EXTRAITS VEGETAUX)

- LA NOTION DE pH

Théorie d'ARRHENIUS : voir par ex. BRUNEL T.I., p. 271

Théorie de BRONSTED : " " CHARLOT et BEZIER, p. 8 et
suivantes;

La définition pratique du pH a été reprise en 1950 dans les pays
anglo-saxons (voir Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Vol.I, p.375-7).
Les auteurs modernes s'attachent plus à la notion d'"activité" des ions

- SOLUTIONS TAMPONS

Voir BRUNEL, T.I, p:274-6.

- METHODES DE DETERMINATION DU pH

a) Méthodes colorimétriques

Pour tout ce qui concerne les indicateurs : voir BRUNEL, T.I, p: 278 et suivantes:

Des indications sur les différentes méthodes, l'emploi des papiers indicateurs, des comparateurs, etc., sont données dans tous les traités pratiques de chimie:

blement saturé en quinhydrone. La force électro-motrice produite est de courte durée et les mesures doivent être faites rapidement. Le principe de cette méthode repose sur l'effet électrique de la transformation de la quinone C_6H_4O en l'anion d'hydroquinone par l'addition de deux électrons qui peuvent être neutralisés par $2H^+$. La quinhydrone $-C_6H_4(OH)_2$; $C_6H_4O_2$ est un complexe d'hydroquinone et de quinone en proportions équimoléculaires. L'électrode à la quinhydrone atteint rapidement son équilibre ; inutilisable en pH alcalin, elle permet, en dessous de pH7, des mesures en présence de certains agents oxydants, d'acides organiques non saturés et de certains sels qui interfèrent avec l'électrode à hydrogène.

4) Appareils à Electrode Métal-Oxyde métallique

L'usage des électrodes antimoine + oxyde d'antimoine exige tant de précautions spéciales et suppose tant d'erreurs possibles qu'on ne s'en sert guère pour des tissus ou des extraits végétaux. Mais, comme les électrodes au tellurium, elles peuvent être utiles dans certains cas.

c) Application de ces méthodes à l'étude du pH des tissus végétaux

Les sèves et les tissus végétaux ont, en général, des pH compris entre 1,3 et 8. La détermination peut être faite sur les organes ou les extraits non traités, sauf dans le cas de certains tissus très gras ou très riches en protéines (légumineuses, etc..), pour lesquels des traitements spéciaux peuvent être nécessaires (séparation de la phase aqueuse).

- 1) Certaines mesures peuvent être faites directement sur des organes végétaux avec des électrodes de verre spéciales (électrodes pénétrantes, microélectrodes). Les résultats obtenus dépendent évidemment énormément des conditions dans lesquelles on opère et ne peuvent avoir qu'une valeur indicative.
- 2) On peut faire des micro-injections d'indicateurs dans certaines cellules ou des micro-ponctions sur des tissus traités par des indicateurs.
- 3) SMALL (Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Vol.I p.385) décrit en détails l'application de sa méthode utilisant un mélange d'indicateurs pour la détermination du pH de fragments de tissus vivants.
- 4) Dans le même chapitre, il donne également des indications sur la technique de SMITH qui permet d'utiliser, chez les plantes qui en renferment, des pigments, tels que les anthocyanes, comme des indicateurs naturels (on réalise une échelle de témoins de référence avec des extraits de ces tissus colorés dans des solutions témoins de pH connu).
- 5) On peut enfin opérer sur des jus de presse ou des extraits obtenus à partir d'organes frais ou stabilisés.

d) Causes générales d'erreur

Voir BRUNEL, T.I, p.297-8.

e) Causes d'erreur particulières aux tissus végétaux

Les erreurs de sels avec les extraits végétaux sont ordinairement si petites qu'elles sont négligeables avec les méthodes de travail modernes et les erreurs de protéines (sauf avec des plantes particulièrement riches) ne touchent que la 2ème décimale. Mais la détermination du pH sur un matériel d'origine végétale comporte bien d'autres causes d'erreur considérables.

Pour permettre la mesure, les tissus sont presque toujours blessés ou disloqués. Les jus de presse, les sèves, les extraits d'organes frais évoluent rapidement et ne traduisent pas exactement la réaction de la plante vivante. Les extraits stabilisés sont sujets à d'autres causes d'erreur. Il ne faut donc pas ignorer dans quelle mesure les résultats sont rendus aléatoires par le déclenchement de processus de fermentation, le mélange du protoplasme avec les enclaves liquides et autres, etc., etc.. Ils ne peuvent être comparables que s'ils sont obtenus dans des conditions rigoureusement identiques.

D'autre part, les sèves et les extraits végétaux contiennent souvent des substances oxydantes ou réductrices qui, en affectant le potentiel d'oxydo-réduction, interfèrent sérieusement dans le fonctionnement du pH mètre. Les tissus et les extraits végétaux enfin renferment couramment du CO₂ qui peut être entièrement ou partiellement éliminé au cours de la manipulation, ce qui peut entraîner des variations de l'ordre de l'unité pH dans les résultats.

f) Précision atteinte et conditions d'emploi des différentes méthodes

Avec les papiers indicateurs, employés avec toutes les précautions d'usage (pour éviter le contact de l'acidité des doigts et du CO₂ expiré, etc..), on peut atteindre une précision maximale de 0,1 unité pH \pm 0,05 et une précision habituelle de 0,2 \pm 1.

Les autres méthodes colorimétriques ne donnent pas une précision supérieure, mais l'opérateur travaille avec plus de sûreté et l'interprétation des teintes est plus facile. La plupart des liquides troubles ou colorés échappent à ces méthodes et beaucoup d'indicateurs amènent des erreurs de sels ou de protéines. Les gammes étalons et les solutions d'indicateurs sont fragiles ; il est nécessaire de les conserver, dans la mesure du possible, à t° inférieure à 25° et à l'abri de la lumière.

L'électrode de verre, avec des solutions tampons, et dans des conditions bien déterminées, peut donner une précision reproductible de 0,005. Mais pour toutes les déterminations courantes, l'exactitude est limitée à la première décimale avec une marge de \pm 0,05. Dans le cas des extraits végétaux, les résultats ne sont satisfaisants à la première décimale près que dans de bonnes conditions (tissus homogènes, etc..) et il faut souvent se contenter d'une précision reproductible moindre (\pm 0,2)

L'électrode de verre convient moins bien quand le pH est supérieur à 9.

*

* *

ELEMENTS DE BIBLIOGRAPHIE

- A. BRUNEL - Traité Pratique de Chimie Végétale, T.I, Chapitre XX, La détermination du pH (J.Patin et A.Brunel), pages 271, 330 - 1948.
- G. CHARLOT et D. BEZIER - Méthodes Modernes d'Analyse Quantitative minérale, 2ème éd. - 1949.
- J. BONNER - Plant Biochemistry - 1950.
- K. PAECH - W.SIMONIS - Übungen zur Stoffwechselfysiologie der Pflanzen - 1952.
- R. DRU - Le pH dans l'industrie laitière et les produits alimentaires - Technique laitière, n° 162, p. 9-21 - 1954.
- P. GOUNY - Observations sur les particularités de l'alimentation ammoniacale en l'absence et en présence de calcaire - Annales Agron. Série A, 6ème année, n° 4, p.589-614 - 1955.
- K. PAECH - M.V. TRACEY - Moderne Methoden der Pflanzenanalyse
 - 1) Vol. II - 1955 - p.478-538
J.WOLF - Nichtflüchtige Mono-,Di-und Tricarbonsaure
 - 2) Vol. I - 1956 - p.375-392
J.SMALL - Estimation of pH Valurs (Living Tissus and Saps).

On pourra consulter aussi :

- MALCOLM DOLE - l'Electrode en verre -trad. L. GIRAUT-ERLER, Dunod éd.
- J.RIBEREAU-GAYON - E.PEYNAUD - Analyse et contrôle des vins - Béran-