

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 par les acides organiques synthétisés.

*
* *

ACIDITE TITRABLE ET ALCALINITE DES CENDRES

On peut connaître la proportion des acides organiques combinés ou libres, avec une approximation suffisante, en déterminant :

- 1°) L'alcalinité des cendres, qui traduit la quantité d'anions organiques combinés ;
- 2°) L'acidité de titration, qui indique la quantité d'anions organiques libres.

Appréciation de l'alcalinité des cendres

On dessèche à l'étuve à 70° un poids exactement connu de matière végétale fraîche (30 à 100 g. environ, l'importance de la prise dépendant de la teneur en eau). On note le poids de matière sèche obtenue et on calcine à la température habituelle (450°). On pèse les cendres. On les reprend par SO_4H_2 0,1 N exactement titré (compter 100cc SO_4H_2 environ pour 500 mg de cendres). On ajoute quelques gouttes d'eau oxygénée et on chauffe 10 minutes au bain-marie bouillant (élimination du CO_2 des carbonates). On filtre et on rince le filtre avec un peu d'eau chaude. On laisse refroidir et on ajoute quelques gouttes de méthylorange ou de rouge de méthyle. On titre en retour avec NaOH 0,1N de titre exactement connu. On peut exprimer le résultat par la quantité d'acide normal nécessaire pour la neutralisation des cendres de 100 g. de matière végétale sèche. On peut s'exprimer aussi en milli-équivalents.

Les erreurs que l'on peut faire, dues par exemple à la neutralisation d'une partie des cendres par du phosphore organique minéralisé lors de la calcination, peuvent être négligées devant les quantités importantes d'anions organiques qui entrent en jeu.

Appréciation de l'acidité titrable

Il s'agit d'abord d'obtenir à partir du végétal étudié un extrait contenant les acides sous forme libre. Ce qui est le point le plus délicat (voir fascicule : "Préparation du matériel végétal en vue de l'analyse").

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 exactement connu. Un blanc, fait dans les mêmes conditions de volume, dispense de connaître au départ le titre exact de HCl. Suivant l'acidité de l'extrait étudié, on peut être amené à utiliser aussi NaOH N pour le titrage.

Connaissant alors la quantité et le titre de NaOH et de HCl utilisés, on en déduit l'acidité de titration pour 100cc de jus ou d'extrait, exprimée en NaOH N nécessaire à la neutralisation, ou en équivalents d'acide.

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 H qu'à celle de leur "concentration". De toute façon, on sait depuis longtemps qu'on ne peut pas mesurer la concentration en ions H dans le cas des tissus vivants et des liquides ou produits d'origine animale ou végétale.

L'activité des ions H est affectée par la nature des ions avec lesquels les ions H sont associés et par la concentration moléculaire de ces ions. La solution pratique a été de prendre le coefficient d'activité moyenne, f_{\pm} , comme un terme modifiant la concentration, C_H , et de se référer pour chaque mesure de la valeur de $-\log: C_H f_{\pm}$ à un témoin arbitraire (tel qu'une solution N/20 de phtalate acide de K à 15°C = pH 4,000, etc..).

- RELATION ENTRE LA NORMALITE ET LE pH

L'acidité totale, ou acidité de titration, d'une solution est la concentration totale de cette solution en ions H⁺ remplaçables par un métal. L'acidité actuelle, ou réelle, est donnée par la mesure de la concentration (ou de l'activité) des ions H⁺ libres.

Il y a relation directe entre la normalité et le pH pour les solutions diluées des acides forts et des bases fortes (qui sont entièrement dissociées). Les acides faibles ou les bases faibles en solutions diluées sont très peu dissociés et la relation directe entre la normalité et le pH n'existe plus.

Des solutions ayant même acidité de titration (même normalité) peuvent avoir des pH très différents et inversement. C'est là une question de dissociation.

Il en est de même pour les milieux organiques complexes où d'autres facteurs entrent en ligne de compte. Il n'y a, par exemple, pas de rapport constant entre le pH d'un lait et son acidité titrable. Les laits à haute acidité naturelle contiennent en proportion plus élevée les substances tampons (caséine, phosphates) qui, s'opposant au changement du pH, exigent plus de solution alcaline au cours du titrage.

Le cas des organes et des extraits végétaux a été examiné ci-dessus.

- 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.

b) Méthodes électrométriques

On évalue la différence de potentiel qui prend naissance aux bornes d'un couple d'électrodes appropriées, d'une part dans les témoins de référence, d'autre part dans le milieu à étudier.

- 1) Appareils à électrode à hydrogène
- 2) Appareils à électrode de verre

Les pH mètres modernes d'emploi courant sont à électrodes de verre, ce qui offre de multiples avantages (possibilités de mesure sur des substances pâteuses, des solutions oxydantes ou réductrices, etc...). Certains de ces appareils sont conçus de manière à permettre aussi des mesures de rH.

Ils sont équipés :

- d'une électrode de verre, dont la membrane, en verre de composition spéciale est soufflée généralement sous la forme d'un bulbe sphérique, à paroi extrêmement mince, placé à l'extrémité d'un tube. Une solution ionisée ($\text{HCl } N/10$) assure la liaison électrolytique de la face interne de la paroi avec une armature métallique. Cette dernière se trouve portée à un potentiel d'équilibre qui est fonction du pH du milieu dans lequel le bulbe sphérique est immergé.

Pour des usages spéciaux il existe des électrodes de verre de forme spéciale : à membrane protégée, pénétrante, etc.. (voir catalogues).

- d'une électrode de référence au calomel où le pont salin est constitué par une solution saturée de KCl, avec laquelle le potentiel du liquide de jonction est négligeable (mais si la température tombe pendant l'opération, cette solution saturée peut déposer un film de KCl à la surface du verre et on obtient des valeurs de pH anormales ; la température doit donc être raisonnablement constante pendant une série de mesures).

On opère en général suivant la méthode dite du "double témoin" qui utilise deux solutions tampons dont les pH encadrent celui du milieu à étudier (l'une à $\text{pH} = 4$, l'autre choisie suivant les circonstances).

- 3) Appareils à électrode à quinhydrone

Si on ne dispose pas d'un pH mètre moderne, on peut se servir d'une électrode de référence au calomel et d'un fragment de platine, plongés dans le milieu à étudier, préala-

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-ger éd. 1947.
- P.C. CALDWELL - Intracellular pH - Intern.Rev.Cytol. 5, p.229-77 - 1956.
- G. VIVIN - Mesure et régulation du pH - Génie chimique, suppl. au n° 2 du vol.77, p.37-47 - 1957.