

**J. DIDIER DE ST AMAND
J. DÉJARDIN**

**MÉTHODES DE FRACTIONNEMENT
DES CONSTITUANTS PHOSPHORÉS
VÉGÉTAUX ET DE CORRECTION
DES RÉSULTATS DE DOSAGE**

**J. Didier de Saint-Amand
L. Zuckerman**

Méthodes de Fractionnement et dosage
des constituants phosphorés végétaux
appliquées au laboratoire d'analyses vé-
gétales de l'O.R.S.T.O.M.

**J. Déjardin
R. Chaume**

Méthode de correction des résultats de
dosage d'un tout et des Fractions qui le
constituent.

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



ET TECHNIQUE OUTRE-MER

INITIATIONS - DOCUMENTATIONS TECHNIQUES

N° 8

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

PARIS

1968

J. DIDIER DE SAINT-AMAND L. ZUCKERMAN

**MÉTHODES DE FRACTIONNEMENT ET DOSAGE
DES CONSTITUANTS PHOSPHORÉS VÉGÉTAUX
appliquées au Laboratoire d'Analyses végétales de l'O.R.S.T.O.M.**

J. DÉJARDIN R. CHAUME

Service de Biométrie de l'O.R.S.T.O.M.

**MÉTHODE DE CORRECTION DES RÉSULTATS DE DOSAGE D'UN TOUT
ET DES FRACTIONS QUI LE CONSTITUENT**

- I -

J. DIDIER DE SAINT-AMAND

L. ZUCKERMAN

**MÉTHODES DE FRACTIONNEMENT ET DOSAGE
DES CONSTITUANTS PHOSPHORÉS VÉGÉTAUX**
appliquées au Laboratoire d'Analyses végétales de l'O.R.S.T.O.M.

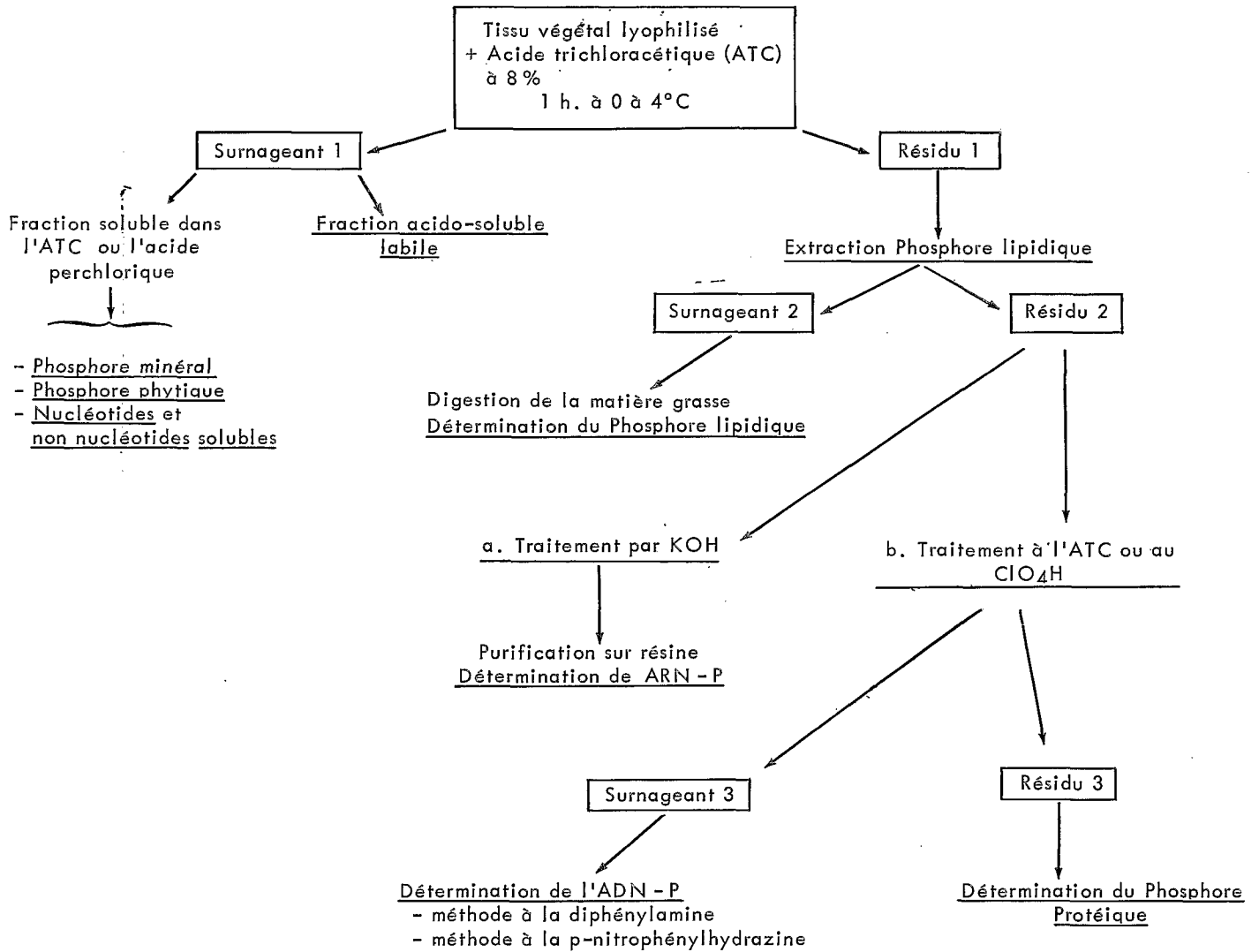
INTRODUCTION

La méthode de séparation et de dosage des constituants phosphorés dans le matériel végétal, exposée ci-dessous, fait appel à des techniques analytiques classiques dont les références sont données à la fin de chaque chapitre. La forme synthétique proposée évitera un long travail de recherches bibliographiques.

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les tissus frais à analyser sont séchés à froid dans un lyophilisateur à environ -60°C , sous vide. Le matériel cryodesséché est broyé à froid puis conservé à -10°C .

SCHEMA DU FRACTIONNEMENT DES CONSTITUANTS PHOSPHORÉS DANS LA MATIÈRE VÉGÉTALE



MÉTHODES ANALYTIQUES

A - EXTRACTION ET DOSAGE DES CONSTITUANTS ACIDO-SOLUBLES

1 - EXTRACTION DE LA FRACTION ACIDO-SOLUBLE TOTALE

La fraction acido-soluble est extraite par l'acide trichloracétique (ATC) ou l'acide perchlorique dont la concentration optimum doit être déterminée par des essais préalables.

La concentration de l'ATC, adoptée dans le cas de tissus chlorophylliens et radiculaires de cotonnier est de 8%. Une concentration supérieure de l'ordre de 12 à 15% par exemple, risquerait d'entraîner dans la fraction soluble, une partie de l'acide ribonucléique.

Une concentration plus faible, de l'ordre de 5%, peut aboutir à un entraînement incomplet des formes acido-solubles.

L'extraction est opérée sur des tractions de 500 mg de poudre végétale, lyophilisée, que l'on introduit dans de petites capsules de porcelaine, en présence de 20 ml environ d'ATC à 8%. L'ensemble est conservé à 0-4°C pendant une heure, et remué de temps à autre. Le contenu des capsules est ensuite transféré quantitativement dans des tubes de centrifugeur, en utilisant de petits volumes d'ATC à 8%, froid. Centrifuger, puis traiter par deux fois les résidus avec de l'ATC à 8% dans les mêmes conditions.

Les surnageants sont réunis, puis l'on amène à un volume déterminé (50 ou 100 ml) avec de l'ATC de même concentration.

Le résidu est conservé pour la détermination du phosphore lipidique (cf. paragraphe "phosphore lipidique").

2 - DIGESTION DE LA FRACTION ACIDO-SOLUBLE TOTALE

Prélever une partie aliquote (5 à 15 ml) de l'extrait trichloracétique dans un matras contenant une bille de verre. Couvrir d'un petit entonnoir. Ajouter 1 ml d'acide sulfurique.

DIGESTION :

Chauffer très lentement pour évaporer la plus grande partie possible de l'acide trichloracétique : la matière organique se consume. Chauffer jusqu'à obtention d'une solution homogène et poursuivre l'opération jusqu'à ce que la solution prenne une coloration légèrement plus claire. Ajouter alors, avec précaution, une goutte d'acide nitrique, de sorte qu'elle coule le long de la paroi du matras. Continuer à chauffer en évitant continuellement une surchauffe. Ajouter une nouvelle goutte de NO_3H . Chauffer doucement jusqu'à ce que le liquide soit décoloré ou qu'il présente seulement une teinte jaune paille. Poursuivre le chauffage une minute encore. Refroidir. Ajouter un peu d'eau distillée et porter à ébullition deux ou trois minutes pour chasser les vapeurs. Transvaser en fiole de 25 ml et amener à ce volume en rinçant le matras avec de l'eau distillée.

3 - DOSAGE DU PHOSPHORE ACIDO-SOLUBLE TOTAL

MÉTHODE GÉNÉRALE DE DOSAGE

A - RÉACTIFS

1 - Mélange Alcool-Benzène

Mélanger au moment de l'emploi des volumes égaux d'alcool isobutylique et de benzène, pour analyses.

2 - Solution Molybdique

Dissoudre 50 g de molybdate d'ammonium dans 400 ml d'acide sulfurique à 10 N. Amener à 1 litre avec de l'eau distillée. Garder en bouteille paraffinée. Préparer au moment de l'emploi.

3 - Solution de chlorure stanneux

Dissoudre 10 g de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 25 ml de HCl concentré et garder dans un flacon brun. A partir de cette solution, préparer au moment de l'emploi une solution diluée en amenant 1 ml à 200 ml avec du $\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}$. Ce réactif ne reste pas stable plus d'un jour.

4 - Mélange Acide sulfurique-Ethanol

Mélanger à 980 ml d'éthanol à 99,5% et 20 ml de SO_4H_2 concentré (vérifier la réaction par rapport à la stabilité de la couleur bleue du molybdate. L'instabilité peut être due à quelque contamination de l'alcool. Il faut alors essayer de changer la qualité de l'alcool et refaire le mélange).

5 - Réactif Silico-tungstique

Il est utilisé pour la défécation dans le dosage du phosphore minéral libre.

Dissoudre 5,7 g de silicate de sodium $9\text{H}_2\text{O}$, et 79,4 g de tungstate de sodium $2\text{H}_2\text{O}$, dans 500 ml d'eau distillée. Ajouter 15 ml de SO_4H_2 concentré. Faire bouillir pendant cinq heures. Refroidir et amener à 1 litre.

6 - Solution-étalon de P

Préparer une solution-étalon à 1 mg de P/ml à partir de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ (séché à 110°C) pour analyses ($4,3936 \text{ g} \times \text{facteur de pureté}$, amené à 1 litre).

B - MÉTHODE

Le dosage est effectué sur une partie aliquote de l'extrait trichloracétique, **après digestion**.

Dans les conditions de concentrations indiquées plus haut (soit 500 mg de matière végétale lyophilisée ramenée à 100 ml dont 15 ml subissent la digestion et sont ensuite ramenés à 25 ml), on prélève 1 ml, que l'on introduit dans un tube à essais de 25 x 200 mm. Ajouter de l'eau distillée pour un volume de 15 ml, puis 25 ml exactement mesurés de la solution alcool-benzène (1). Mettre ensuite 5 ml de réactif molybdique (2). Boucher et agiter aussitôt vigoureusement 30 secondes. Laisser les deux phases liquides se séparer. Préparer dans un bécher 15 ml du mélange acide sulfurique - éthanol (4). Pipeter dans les tubes 10 ml de la phase supérieure organique et les introduire dans une fiole de 25 ml. Ajouter avec la même pipette qui se trouve ainsi rincée, 10 ml du mélange acide sulfurique - éthanol (4), puis 1 ml de la solution diluée de chlorure stanneux (3). Ajuster les fioles à 25 ml avec le mélange acide sulfurique - éthanol. La coloration bleue obtenue est stable plusieurs heures. Attendre une dizaine de minutes pour colorimétrer à 700 m. Faire un blanc. Régler le zéro à partir du mélange alcool-acide sulfurique.

Calcul :

$$\frac{\text{mg P/ml} \times 25 \times 100}{\text{prise} \times 0,5} = \text{mg P acido-soluble/g de matière sèche}$$

Calculer la concentration en P en se rapportant à une solution-étalon de P (6) dont on détermine les densités optiques pour quelques points de gamme.

4 - DOSAGE DES FRACTIONS DE L'ENSEMBLE ACIDO-SOLUBLE

- Phosphore minéral

Le phosphore minéral libre est déterminé à partir de l'extrait trichloracétique, sur une partie aliquote de l'ordre de 1 ml pour les conditions de dilution indiquées plus haut. Le dosage s'effectue directement **sans digestion** suivant la méthode indiquée chapitre 3.

Le réactif silico-tungstique intervient éventuellement pour la précipitation des protéines, si le milieu en comporte de façon notable. On l'introduit alors, après l'addition du mélange alcool isobutylique-benzène. Puis on poursuit par l'addition du réactif molybdique, etc..

- Phosphore phytique

A - RÉACTIFS

1 - Solution de chlorure ferrique

Dissoudre 15 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dans l' HCl normal. Amener à 1 litre avec HCl N.

2 - HCl 0,6 % comportant du sulfate de sodium

Dissoudre 100 g de sulfate de sodium anhydre dans environ 500 ml d'eau. Ajouter 14,5 ml de HCl concentré. Amener à 1 litre avec de l'eau distillée.

3 - NaOH N/10

4 - NaOH N

5 - Phénolphtaléine

Solution à 1 % dans l'éthanol à 95 %.

B - MÉTHODE DE DOSAGE

Une partie de l'extrait acido-soluble dans ATC est neutralisée par de la soude N/10 en utilisant la phénolphtaléine comme indicateur et ensuite légèrement acidifiée. On amène à 50 ml avec de l'eau distillée.

Introduire une prise de 20 ml de cet extrait dans des tubes de centrifugeuse de 50 ml. Ajouter 5 ml de la solution de chlorure ferrique, en faisant tourner le tube pendant l'opération.

Disposer les tubes dans un bain-marie bouillant avec un petit agitateur. Chauffer 15 minutes en agitant de temps en temps pour aider la floculation du phytate ferrique. Refroidir ensuite les tubes environ 20 minutes et rincer les agitateurs avec un peu de HCl à 0,6 %.

Centrifuger 20 minutes à une vitesse supérieure à 2000 tours/minute. Jeter le liquide surnageant et laver le précipité avec 5 cc d'HCl à 0,6 % versés à la pipette, pour le remettre en suspension. Rincer les parois du tube avec 2 cc d'HCl à 6 %. Centrifuger 20 minutes à nouveau et

décanter le surnageant.

Mettre le précipité en suspension dans 5 ml d'eau bouillante. Ajouter 2 ml de (NaOH) N et chauffer 15 minutes au bain-marie bouillant, en agitant de temps en temps. Filtrer la solution encore chaude sur filtre sans cendre dans un ballon de 100 ml.

Laver le tube plusieurs fois avec quelques ml d'eau distillée bouillante et verser les eaux de lavage sur le filtre.

Le phosphore sera dosé sur une partie aliquote de cette solution, après la digestion indiquée chapitre 2.

- Nucléotides et non nucléotides solubles

A - RÉACTIFS

KOH 5 N.

Diéthyléther ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$).

Acide formique 4 N contenant du formiate d'ammonium 0,8 M.

Dowex 1 x 4 (formiate).

B - MÉTHODE DE DOSAGE

Il est préférable pour utiliser cette méthode de travailler sur des solutions extraites par l'acide perchlorique, de préférence à des solutions extraites par l'acide trichloracétique.

L'extrait acide est purifié par trois extractions successives au diéthyléther à raison de 5 volumes d'éther pour un volume d'extrait. Il est ensuite neutralisé par KOH 5 N, puis concentré sous pression réduite à 35°C.

Après refroidissement, le perchlorate de potassium est séparé par centrifugation et le surnageant est passé sur une colonne de résine Dowex 1 x 4.

Les dimensions optimum pour la colonne sont les suivantes : hauteur 10 cm, diamètre 1 cm.

Laver la colonne à l'eau et éluer les nucléotides avec 70 ml d'acide formique contenant du formiate d' NH_4 (0,8 M).

Le calcul de la teneur du liquide d'élution en nucléotides solubles est indiqué par J. INGLE (*Plant Physiology*, 1964, vol.39, n°5, pp.735-740).

- Fraction acido-soluble labile

Cette fraction est généralement rapportée, à partir de l'ensemble acido-soluble, à la quantité de phosphore dosée après une hydrolyse de 7 minutes, dont on soustrait la quantité de phosphore minéral déterminée selon la méthode indiquée ci-dessus.

La quantité P (7 minutes) - P minéral = P labile, permet d'estimer le phosphore ayant pour origine le groupement phosphorique terminal de la carboxylase et ceux des nucléotides di et triphosphate.

DOSAGE

Prélever dans un tube une partie aliquote de l'extrait soluble dans l'acide trichloracétique. Ajouter une quantité égale de HCl 2 N et chauffer au bain-marie à 100° de sorte que le liquide soit à ébullition exactement 7 minutes.

Doser ensuite le phosphore suivant la méthode indiquée au chapitre 3.

B - DÉTERMINATION DU PHOSPHORE LIPIDIQUE

A - RÉACTIFS

Ethanol à 95°.
Mélange méthanol-chloroforme 1-1 en volume.
Mélange éthanol-éther éthylique 2-1 en volume.
SO₄H₂
NO₃H

B - MÉTHODES

Le résidu demeurant après l'élimination de l'acide trichloracétique qui comporte les fractions solubles, est traité dans un tube de centrifugeuse avec 15 ml environ d'alcool éthylique à 95°. (il est possible aussi de traiter le résidu avec 15 ml d'acétate de potassium 0,1 N dans l'éthanol pour éviter une contamination éventuelle de l'alcool par des matières protéiques).

Bien mélanger et laisser reposer environ trente minutes puis centrifuger. Décanter le liquide surnageant sur une fiole à distiller, en prenant soin de n'entraîner aucune particule du culot. Ajouter environ 15 ml d'alcool éthylique à 95° et faire bouillir avec précaution trente secondes dans un bain-marie. Centrifuger une nouvelle fois. Réunir les surnageants. Répéter l'extraction avec le mélange d'éthanol-éther, trente secondes, puis avec le mélange de méthanol-chloroforme, trente secondes. Réunir tous les surnageants. Distiller les solvants, puis entraîner la matière grasse restante, dans un matras avec un peu d'alcool à 95°. Éliminer la plus grande partie de l'alcool, par ébullition, sous hotte. Laver le résidu avec l'éther et sécher sous vide ou à l'air pour obtenir une poudre sèche sur laquelle on pourra prélever des quantités exactement pesées.

Effectuer une digestion suivant la méthode ci-après :

Digestion - Méthode générale

Cette méthode est valable pour la détermination du phosphore lipidique et pour celle du phosphore total.

1 - Introduire une bille de verre dans le matras contenant l'échantillon. Couvrir avec un petit entonnoir.

2 - Ajouter 3 ml d'acide sulfurique. Chauffer avec précaution jusqu'à ce que la matière organique se consume, et que l'on obtienne une solution homogène. Continuer le chauffage jusqu'à ce que la solution homogène prenne une coloration légèrement plus claire.

3 - Faire tomber sur le liquide en ébullition, une goutte d'acide nitrique.

4 - Continuer à chauffer et ajouter, dès que les vapeurs blanches apparaissent, une nouvelle goutte de NO₃H.

5 - Poursuivre l'oxydation progressive jusqu'à ce que le mélange de digestion prenne une teinte paille clair. Chauffer jusqu'à ce qu'il devienne presque incolore. Laisser refroidir. Le liquide devient incolore au cours du refroidissement.

6 - Laver l'ouverture du matras avec un jet d'eau distillée sur l'entonnoir.

7 - Reprendre l'ébullition trois minutes de plus pour éliminer toutes traces de NO₃H.

8 - Transférer, après refroidissement, quantitativement en fiole jaugée de 25 ou 50 ml. Ajuster le niveau avec de l'eau distillée. Le dosage du phosphore est réalisé suivant la méthode indiquée au chapitre 3.

Bibliographie

- 1 - MARTIN (J.B.), DOTY (D.M.) - 1949 - Determination of inorganic phosphate. *Analyt. Chem.* vol.21, pp.965-967.
- 2 - PONS *et al.* - 1953 - *AOAC Jour.*, vol.36, n°2.
- 3 - INGLE (J.), BEEVERS (L.), HAGEMAN (R.H.) - 1964 - *Plant Physiol.*, vol.39, n° 5.

C - DÉTERMINATION DU PHOSPHORE NUCLÉIQUE

1 - DÉTERMINATION DE L'ADN

- Méthode de dosage par la Diphenylamine

A - RÉACTIFS

Diphénylamine.
Acide acétique redistillé.
Acide sulfurique concentré.
Acétaldéhyde - solution à 16 mg/ml.
Acide perchlorique à 5%.
Soude 0,005 M.
Acide désoxyribonucléique (thymus de veau - provenance : Mann Research Lab. inc.).

B - MÉTHODE

Préparation de l'extrait

Une partie du résidu sec (2) demeurant, après l'extraction du phosphore lipidique, est traitée pendant deux périodes de vingt minutes chacune, à 70°C par de l'acide perchlorique à 5%. Dans certains cas, pour favoriser la précipitation des protéines, on peut renouveler une addition d'acide perchlorique. Conserver le résidu pour la détermination du phosphore protéique (Avec certains tissus, il est conseillé d'élever la température jusqu'à 90°C).

Préparation du réactif

Dissoudre 1,5 g de diphenylamine dans 100 ml d'acide acétique redistillé. Ajouter 1,5 ml d'acide sulfurique concentré et garder à l'obscurité.

Le réactif ne doit pas prendre une teinte bleue en reposant.

Avant l'utilisation, ajouter 0,1 ml d'acétaldéhyde pour 20 ml de réactif utilisé. Mélanger 2 ml de l'extrait acide perchlorique avec 4 ml de réactif à la diphenylamine et laisser reposer en étuve à 30° pendant seize à vingt heures.

Effectuer une mesure de densité optique à 600 m μ et comparer aux valeurs obtenues pour une gamme étalon. Faire un blanc.

Préparation des standards

La solution-mère (ici à 0,4 mg d'ADN/ml) est préparée en dissolvant l'ADN dans de la soude 0,005 M, et conservée au réfrigérateur.

Les standards sont obtenus en mélangeant volume à volume la solution-mère ADN et de l'acide perchlorique à 10%, le mélange est chauffé à 70°C pendant environ quarante minutes. La conservation des standards se fait en réfrigérateur.

La gamme-étalon est préparée par dilution de la solution standard avec de l'acide perchlorique à 5%.

- Méthode à la p-Nitrophénylhydrazine

A - RÉACTIFS

- p-Nitrophénylhydrazine - solution à 0,5 % dans l'éthanol.
- Acide trichloracétique à 5 %.
- Acétate de n-butyle.
- Soude 2 N.
- Acide désoxyribonucléique (thymus de veau - provenance : Mann Research Lab. inc.).

B - MÉTHODE

On effectue le dosage sur une partie de poids connu du résidu sec demeurant après l'extraction du phosphore lipidique.

L'hydrolyse est opérée dans des tubes de centrifugeuse coniques de 15 ml en présence de 3 ml d'acide trichloracétique à 5 %. L'orifice du tube est bouché par un pantin afin de limiter le plus possible les pertes par évaporation.

La suspension est chauffée pendant trente minutes au bain-marie à 90-100°. Après refroidissement, ajouter à nouveau 3 ml d'acide trichloracétique à 5 % et centrifuger. Le culot est conservé pour la détermination du phosphore protéique.

Prélever 2 ml du liquide d'hydrolyse dans un tube de centrifugeuse de 15 ml. Effectuer la même opération avec 2 ml de la solution standard d'ADN contenant 100 γ d'ADN que l'on aura hydrolysée dans les mêmes conditions. (Préparer simultanément un blanc avec 4 ml d'ATC à 5 %). A chacun des tubes, ajouter 2 ml d'acide trichloracétique à 5 % et 0,2 ml du réactif à la p-Nitrophénylhydrazine à 0,5 %, fraîchement préparé. Chauffer au bain-marie à 90-100°, en prenant soin de limiter l'évaporation, pendant quinze minutes. Après refroidissement, ajouter 10 ml d'acétate de n-butyle dans chaque tube.

Boucher les tubes et les agiter cinq minutes, puis centrifuger pour achever la séparation des couches organiques et aqueuses. Retirer la plus grande partie de la couche organique. Pipeter ensuite 3 ml de la phase aqueuse dans une fiole jaugée de 5 ml bouchée en verre. Vérifier qu'aucune gouttelette organique n'a été entraînée. Ajouter alors, juste avant de colorimétrer, 1 ml de NaOH 2 N et compléter à volume avec de l'eau distillée et agiter.

La couleur développée par l'addition de NaOH pâlit très rapidement, si bien que la lecture doit être faite dans la minute qui suit cette addition. Les densités optiques sont mesurées à 560 $m\mu$ avec un blanc d'eau distillée. Colorimétrer les standards exactement dans les mêmes conditions. (Le temps requis pour chaque mesure à 560 $m\mu$ doit être déterminé avec précision et être toujours le même, y compris pour les standards).

Préparation des solutions standards d'ADN

Mettre dans une fiole jaugée de 50 ml, 25 mg d'ADN (Thymus de veau). Ajouter 40 ml d'acide trichloracétique à 5 %. Couvrir et chauffer pendant trente minutes dans un bain-marie à 90-100°. Refroidir, puis amener à volume avec de l'ATC à 5 %. Des standards de concentration plus basse sont préparés par la dilution appropriée de la solution avec de l'ATC à 5 %. (Si la dissolution de l'ADN dans l'acide trichloracétique à 5 % n'est pas totale, on peut opérer une solution préalable dans la soude 0,005 M. A partir de cette solution, les gammes sont établies par une dilution convenable. On ajoute alors à un volume choisi de solution-mère, un volume égal d'ATC à 10 % et on chauffe trente minutes à 90-100°).

Bibliographie

- 4 - BURTON (K.) - 1956 - A study of the condition and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid. *Bioch. J.*, 62, pp.315-323.
- 5 - WEBB (J.M.), LEVY (H.B.) - 1955 - A sensitive method for the determination of desoxyribonucleic acid in tissues and microorganisms. *J. Biol. Chem.*, 213, pp.107-117.

2 - DÉTERMINATION DE L'ARN

Si la méthode décrite ici ne présente pas la précision de celle consistant à chromatographier les nucléotides après hydrolyse, puis à mesurer leur densité optique à 260 $m\mu$, elle est susceptible d'être toutefois commodément utilisée dans des déterminations de routine. Il est nécessaire de disposer d'un spectrophotomètre à ultra-violet, pour des mesures de densité optique à 260 $m\mu$.

- Dosage par spectrophotométrie dans l'ultra-violet

A - RÉACTIFS

KOH 0,3 N.
Cl₂Mg 0,006 M.
Ethanol à 95 %.
NaCl 0,01 M.
Solution HCl-NaCl-tampon (5,6 g NaCl + 20 ml HCl concentré pour 240 ml d'eau distillée).

B - MÉTHODE

Déposer 20 mg de l'extrait sec (Résidu 2) dans un tube de centrifugeuse avec 1 ml de KOH 0,3 N. Laisser reposer pendant dix-huit heures à l'étuve à 37°C puis refroidir le tube dans de l'eau glacée. Ajouter ensuite la solution de Cl₂Mg jusqu'à une concentration en Mg égale à 10⁻³M. Toujours dans le bain glacé, afin d'éviter l'hydrolyse des nucléotides, acidifier avec de l'acide perchlorique dilué jusqu'à approximativement pH 2. Ajouter un volume d'éthanol à 95°.

Laisser le mélange reposer vingt minutes à 0° puis centrifuger et décanter en conservant le surnageant. Laver le résidu avec de l'acide perchlorique à 1%, glacé, et joindre le liquide de rinçage au surnageant. Jeter le résidu qui contient des protéines et de l'ADN (L'ADN peut être récupéré éventuellement dans ce résidu, en hydrolysant avec de l'acide perchlorique à 5%. Cependant la digestion alcaline peut, avec certains tissus, provoquer une dégradation de l'ADN qui n'est alors, à ce stade, qu'incomplètement récupérable. Il est possible d'effectuer des dosages comparatifs de l'ADN après hydrolyse acide directe et hydrolyse du résidu). Ajuster le liquide à pH 8-9 avec la solution de potasse diluée. Refroidir jusqu'à formation d'un précipité qu'on sépare par centrifugation. Conserver le surnageant. Laver le précipité à l'eau froide. Joindre les rinçages au surnageant.

C - PRÉPARATION DE LA RÉSINE ÉCHANGEUSE D'IONS

Réactifs

Résine Dowex 1 x 10 forme Cl⁻ - 200 - 400 mesh.
Colonne de 5 cm de longueur sur 0,5 cm² (Si le tissu végétal est susceptible de comporter une forte proportion d'impuretés, il peut-être nécessaire d'augmenter la hauteur de la colonne).
HCl N.
NaOH ou NH₄OH N.

Traitement

La résine doit être traitée successivement par de l'HCl N, de l'eau distillée, de la NaOH ou de l'NH₄OH N, puis à nouveau de l'eau distillée. La résine ne doit rester que quelques instants au contact de l'HCl et de l'NH₄OH, tandis que les rinçages intermédiaires à l'eau doivent être plus prolongés et évacués avec précaution. Traiter à nouveau la résine par l'HCl N en l'agitant quelques secondes dans l'acide.

Dès que la sédimentation s'opère, décanter le liquide qui entraîne les plus fines particules. Répéter plusieurs fois le lavage à l'eau distillée. Décanter.

Remettre à nouveau la résine en suspension dans l'eau, puis la verser sur la colonne et la laisser se stabiliser, par gravité. Evacuer l'eau avec précaution. Répéter l'opération jusqu'à ce que la colonne atteigne la hauteur désirée. Le rinçage final doit fournir un liquide neutre. La résine ainsi préparée ne peut être utilisée qu'une ou deux fois.

D - DOSAGE

Faire passer le liquide surnageant (que l'on peut concentrer préalablement) résultant des centrifugations, sur la résine où les nucléotides seront retenus.

Ajouter une solution de NaCl 0,01 M pour laver la colonne et jeter. Eluer les nucléotides par la solution NaCl-HCl. Prélever 40 ml d'éluat, puis des fractions successives de 5 ml jusqu'à ce que la D.O. soit nulle à 260 $m\mu$. Le blanc est mesuré sur la solution HCl-NaCl.

La teneur en ARN est estimée sur la base d'une structure tétranucléotide théorique :

$$D.O. (\text{à } 260 \text{ } m\mu) \times 32 = \gamma \text{ ARN/ml}$$

- Dosage de ARN par la détermination du Ribose

Ces méthodes de dosage peuvent conduire à des résultats inexacts dans le cas où le processus de purification ne serait pas complet.

PREMIÈRE MÉTHODE

Réactif

Solution d'orcinol à 0,4% dans HCl 12 N comportant 0,04% de Cl_3Fe .

Dosage

Mettre dans un tube à essais une prise de 0,2 ml de la solution à doser, dans 1 ml d'eau distillée. Ajouter 2 ml de la solution d'orcinol, fraîchement préparée.

Agiter les tubes, les couvrir puis les laisser sur un bain-marie bouillant pendant quinze minutes. Les retirer et attendre 7 à 8 minutes avant de lire les densités optiques à 660 $m\mu$. Faire un blanc. Etalonner par les solutions standards (voir plus loin).

DEUXIÈME MÉTHODE

Réactif

Composition des constituants :

- (1) Solution aqueuse d'orcinol à 1% (à conserver au réfrigérateur).
- (2) HCl concentré.
- (3) Solution aqueuse de $FeCl_3, 6 H_2O$ à 10%.

Préparation du réactif :

Mélanger : 10 ml de (1),
40 ml de (2),
1 ml de (3).

Dosage

A une prise de 0,2 ml de la solution à doser, ajouter 2 ml de réactif, dans des tubes à essais. Agiter, couvrir puis chauffer huit minutes environ au bain-marie bouillant.

Laisser refroidir puis lire les densités optiques (filtre rouge). Comparer à des standards préparés comme il est indiqué ci-après.

Préparation des standards : Purification de l'ARN de levure

On peut utiliser comme standard le d.Ribose ou l'ARN de levure (provenance : British Drughouse, distribué par Serlabo).

La levure est alors purifiée de la façon suivante :

Mettre en suspension 10 g d'ARN de levure dans 50 ml d'eau distillée. Refroidir dans un bain glacé jusqu'à environ 2°.

Ajouter lentement une solution de NaOH 5 N, jusqu'à clarification du liquide.

Veiller à ce que le mélange demeure froid et à ce que le pH ne dépasse pas 6.

Mesurer le volume, puis lui ajouter cinq fois sa valeur d'acide acétique glacial. Laisser reposer une dizaine de minutes à la température ambiante.

La levure reprécipitée par l'acide acétique est filtrée sous vide, puis lavée deux à trois fois à l'eau et trois à quatre fois à l'alcool à 95°. Le précipité est remis en suspension dans 40 à 50 ml d'eau distillée et traité une nouvelle fois par la soude et l'acide acétique. Finalement il est lavé à l'eau distillée, à l'éthanol, puis à l'éther, et séché à l'air jusqu'à poids constant.

L'hydrolyse est opérée sur cette poudre, dans des conditions identiques à celles indiquées pour l'échantillon.

On peut vérifier le coefficient de pureté de l'ARN de levure par une détermination du ribose, en utilisant pour standard du d-ribose pur. La proportion théorique de d-ribose réagissant à l'orcinoï, à partir de l'ARN de levure est théoriquement d'environ 23,4 % (il s'agit essentiellement des pentoses-purines nucléotides, soit environ la moitié des pentoses totaux, en effet les pentoses-pyrimidiques nucléotides ne donnent pas de réaction à l'orcinoï, car ils ne s'hydrolysent pas facilement).

Le calcul du pourcentage d'ARN donne :

$$\% \text{ ARN} = \frac{\text{quantité de ribose retrouvée après la purification}}{23,4} \times 100$$

Calcul du P-ARN et du P-DNA

Le phosphore nucléique est évalué d'après les proportions moyennes de P dans chacun des acides nucléiques, soit 9,2 % dans l'ADN et 9 % dans l'ARN.

Bibliographie

- 6 - COHEN (W.) - 1950 - *J. Amer. Chem. Soc.*, 72, 1471.
- 7 - DIENER (T.O.), LASHEEN (A.M.) - 1960 - The determination of nucleic acid content and composition of fruit tree and other plant leaves. *Soc. for Horticultural Sci.*, vol.75, pp.195-206.
- 8 - HURLBERT (R.B.), SCHMITZ (H.), BRUMM (A.F.), POTTER (V.R.) - 1954 - Nucleotide metabolism. *J. Biol. Chem.*, 204, 23-39.
- 9 - INGLE (J.) - 1963 - The extraction and estimation of nucleotides and nucleic acids from plant material. *Phytochemistry*, vol. 2, pp.353-370.
- 10 - KUNITZ (M.) - 1940 - *J. Gen. Physiol.*, 24, P.31.
- 11 - MARKHAM (R.) - 1955 - Nucleic Acids. *Modern methods of plant analysis*. vol.IV, P.291.
- 12 - SMILLIE (R.M.), KROTKOV (G.) - 1960 - The estimation of nucleic Acids in some Algae and higher plants. *Can. J. Botany*, vol.38, pp.31-49.
- 13 - WEBB (J.M.) - 1956 - A sensitive method for the determination of Ribonucleic acid in tissues and microorganisms. *J. Biol. Chim.*, 221, 635-649.

D - PHOSPHORE PROTÉIQUE

Le résidu demeurant après l'extraction des acides nucléiques est traité par NaOH N, pendant quinze minutes à 100° pour extraire les protéines.

On peut déterminer sur l'extrait alcalin l'azote total par Kjeldahl et en déduire la teneur en protéines d'après la formule :

$$\text{teneur en protéines} = \text{Azote total} \times 6,25$$

(On peut également déterminer la teneur en protéines, sur une autre quantité de tissu végétal lyophilisé, suivant la méthode indiquée par LOWRY O.H. (16).)

Il est possible, aussi, sur l'extrait alcalin, d'effectuer une colorimétrie, en utilisant le réactif au phénol de Folin.

On peut enfin réaliser le dosage de P, sur l'extrait, après digestion, voir chapitres A.2 et A.3.

Le traitement à la soude peut, dans certains cas, ne pas donner une extraction quantitative. On peut alors être amené à effectuer sur le résidu une minéralisation, puis le dosage du phosphore (voir digestion, chapitre B, et dosage chapitre A.3). Le dosage de l'azote protéique peut être également fait sur une partie du résidu.

E - PHOSPHORE TOTAL

Le dosage du phosphore total est réalisé sur la poudre végétale lyophilisée, après digestion, soit suivant la méthode indiquée ci-dessus en A.3, soit selon la méthode colorimétrique au vanadomolybdate (14).

Bibliographie

- 14 - DIDIER DE SAINT-AMAND (J.), CAS (G.) - 1966 - Dosage des éléments majeurs chez les végétaux. Méthodes utilisées au laboratoire de Diagnostic foliaire de l'O.R.S.T.O.M. ORSTOM-Bondy, 40 p., multigr.
- 15 - FISKE (Ch.), SUBBAROW (Y.) - 1925 - The colorimetric determination of Phosphorous. *Journal of Biochemistry*, vol. 66, p. 375.
- 16 - LOWRY (O.H.), ROSEBROUGH (N.J.), FARR (A.L.), RANDALL (R.J.) - 1951 - Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, pp. 265-275.

- II -

J. DÉJARDIN

R. CHAUME

Service de Biométrie de l'O.R.S.T.O.M.

MÉTHODE DE CORRECTION DES RÉSULTATS DE DOSAGE D'UN TOUT ET DES FRACTIONS QUI LE CONSTITUENT

PLAN

- A - Exposé du problème
- B - Dosage avec fractionnement simple
 - 1 - Mesures d'égale précision
 - a - Principe de calcul
 - b - Interprétation géométrique
 - 2 - Mesures d'inégale précision
 - a - Principe de calcul
 - b - Interprétation géométrique
 - c - Fixation des poids
 - d - Procédé pratique
 - 3 - Hypothèses supplémentaires sur la forme de la variance
 - a - Variance proportionnelle à la moyenne
 - b - Variance proportionnelle au carré de la moyenne
- C - Dosage avec sous-fractionnement
 - 1 - Sous-fractionnement de toutes les fractions
 - 2 - Sous-fractionnement partiel
- D - Exemples numériques
 - 1 - Fractionnement simple
 - 2 - Sous-fractionnement partiel
- E - Résumé

A - EXPOSÉ DU PROBLÈME

Lorsqu'on dose un tout globalement et qu'on dose séparément les fractions qui le constituent, les résultats des dosages particuliers ne cumulent qu'exceptionnellement au résultat du dosage du total. Ceci est dû à la variabilité des mesures, variabilité analytique et variabilité biologique en particulier. Le problème de la correction optimale des résultats se pose alors, impérativement même, si leur exploitation nécessite la vérification de la condition de cumul. Il s'est entre autres posé à propos du dosage des constituants phosphorés végétaux au Laboratoire d'Analyses végétales de l'O.R.S.T.O.M. (1). C'est sur cet exemple que la méthode de correction va être exposée.

Le phosphore total ainsi que ses différentes formes dans la plante ont été dosés. Nous appellerons y_i la teneur en ième forme (nous supposerons qu'il y en a n) et y_t la teneur en phosphore total. La relation de cumul qu'on devrait avoir s'écrit $\sum_{i=1}^n y_i = y_t$. Dans la pratique cette relation n'est pas vérifiée et nous observons une différence non nulle entre y_t et $\sum_{i=1}^n y_i$; nous l'appelons D : $D = y_t - \sum_{i=1}^n y_i$.

Le problème est d'estimer à partir des y des teneurs t vérifiant la relation de cumul, autrement dit de calculer des corrections c à apporter aux y . Pour le résoudre nous ferons une hypothèse générale: tous les écarts aux véritables valeurs sont gaussiens et indépendants. Moyennant cette hypothèse la méthode des moindres carrés que nous allons utiliser pour estimer les corrections c s'identifie à la méthode du maximum de vraisemblance (2).

Soit τ_i et τ_t les véritables teneurs. Nous avons évidemment $\sum_{i=1}^n \tau_i - \tau_t = 0$. Soit aussi t_i et t_t les estimations des τ ; elles vérifient bien sûr la même relation $\sum_{i=1}^n t_i - t_t = 0$.

Ecrivons enfin que les corrections à apporter aux y s'ajoutent à ces derniers pour donner les teneurs t : $t_i = y_i + c_i$ et $t_t = y_t + c_t$. La relation de contrainte s'écrit:

$$\sum_{i=1}^n (y_i + c_i) - (y_t + c_t) = 0$$

soit:

$$\sum_{i=1}^n c_i - c_t = D$$

(1) DIDIER DE SAINT-AMAND (J.), ZUCKERMAN (L.) - 1968 - Méthodes de fractionnement et de dosage des constituants phosphorés végétaux, appliquées au Laboratoire d'Analyses végétales de l'O.R.S.T.O.M. Init. Doc. techn. ORSTOM n°8 (I).

(2) Si cette hypothèse n'est pas vérifiée, la méthode des moindres carrés peut encore être utilisée en tant que telle mais ne s'identifie plus à la méthode du maximum de vraisemblance.

B - DOSAGE

AVEC FRACTIONNEMENT SIMPLE

Il s'agit du cas fréquent où le dosage global est simplement scindé en n dosages élémentaires sans que ceux-ci fassent l'objet d'un fractionnement de deuxième ordre.

1 - MESURES D'ÉGALE PRÉCISION

L'hypothèse d'égalité de précision est en fait peu réaliste : dans la presque totalité des cas pratiques il faudra la mettre en doute. C'est pourquoi nous l'abandonnerons par la suite, mais l'exposé de la solution et son interprétation géométrique sont peut-être un peu plus clairs sur ce cas simple.

a - PRINCIPE DE CALCUL

Comme nous l'avons dit ci-dessus, les c_i seront estimés par la méthode des moindres carrés :

$$f = \sum_{i=1}^n (y_i - t_i)^2 + (y_t - t_t)^2 = \sum_{i=1}^n c_i^2 + c_t^2 \text{ sera rendu minimum compte tenu de la relation de contrainte } \sum_i c_i - c_t = D.$$

Le problème à résoudre est un problème d'extremum lié :

$$\begin{aligned} f &= \sum c_i^2 + c_t^2 \text{ minimum} \\ \text{avec } g &= \sum c_i - c_t - D = 0. \end{aligned}$$

La technique classique des multiplicateurs de LAGRANGE nous fournit la solution : nous allons résoudre $df + \lambda dg = 0$, soit :

$$\begin{aligned} 2c_i + \lambda &= 0 \quad (n \text{ équations}) \\ 2c_t - \lambda &= 0 \quad (1 \text{ équation}). \end{aligned}$$

En additionnant les n premières équations et soustrayant de la somme la dernière nous obtenons :

$$\begin{aligned} 2(\sum c_i - c_t) + (n+1)\lambda &= 0 \\ \text{soit } 2D + (n+1)\lambda &= 0 \\ \lambda &= -\frac{2D}{n+1} \end{aligned}$$

$$\text{d'où } c_i = \frac{D}{n+1} \quad \text{et } c_t = -\frac{D}{n+1}$$

chaque teneur élémentaire est donc corrigée de $D/(n+1)$ et la teneur en phosphore total de $-D/(n+1)$.

Pour une précision constante nous trouvons une correction constante.

b - INTERPRÉTATION GÉOMÉTRIQUE

Elle est assez simple : dans l'espace R_{n+1} , $\sum c_i^2 + c_t^2$ représente le carré de la distance de l'origine au point $M (c_1, c_2, \dots, c_n, c_t)$. $\sum c_i - c_t = D$ est l'équation d'un hyperplan H. Le point M est sur H puisque la relation de contrainte doit être vérifiée. La distance OM est évidemment minimale lorsque M est la projection orthogonale de l'origine sur H.

Il est évident que l'hyperplan est également incliné sur tous les axes (les coefficients des c sont tous égaux à 1 en valeur absolue) ; les coordonnées de la projection de l'origine sur lui sont donc toutes égales : $c_i = \text{constante} = c$ et $c_t = -c$. Nous obtenons à partir de l'équation de H :

$$\begin{aligned} nc - (-c) &= D \\ c &= \frac{D}{n+1} \\ \text{d'où } c_i &= \frac{D}{n+1} \quad \text{et} \quad c_t = -\frac{D}{n+1} \end{aligned}$$

On peut d'ailleurs aisément vérifier que la distance de l'origine au point $(D/(n+1), \dots, D/(n+1), -D/(n+1))$ de H est bien $\left| \frac{D}{\sqrt{n+1}} \right|$, valeur fournie par la formule générale, autrement dit on peut vérifier que ce point est bien la projection de l'origine sur H (3) :

$$d^2 = \sum c_i^2 + c_t^2 = n \frac{D^2}{(n+1)^2} + \frac{(-D)^2}{(n+1)^2} = \frac{D^2}{n+1}$$

2 - MESURES D'INÉGALE PRÉCISION

Nous pouvons maintenant abandonner l'hypothèse de mesures d'égalité de précision pour passer au cas réel. Nous conservons l'hypothèse générale de normalité et d'indépendance des écarts aux véritables valeurs.

a - PRINCIPE DE CALCUL

Nous avons toujours $\sum_{i=1}^n c_i - c_t = D$ mais cette fois la somme des carrés à minimiser est : $\sum_{i=1}^n w_i c_i^2 + w_t c_t^2$ w_i étant le poids accordé à c_i et w_t le poids accordé à c_t en fonction de la précision de chacun des dosages correspondants.

Appliquant la méthode des multiplicateurs de LAGRANGE, nous devons rendre $f = \sum w_i c_i^2 + w_t c_t^2$ minimum avec $g = \sum c_i - c_t - D = 0$.

(3) La distance du point $(x_1^i, x_2^i, \dots, x_n^i, x_{n+1}^i)$ à l'hyperplan $a_1 x_1 + a_2 x_2 + \dots + a_{n+1} x_{n+1} + b = 0$ est

$$d = \left| \frac{a_1 x_1^i + a_2 x_2^i + \dots + a_{n+1} x_{n+1}^i + b}{a_1^2 + a_2^2 + \dots + a_{n+1}^2} \right|$$

la distance de l'origine à H est donc $\left| \frac{D}{\sqrt{n+1}} \right|$

En dérivant, nous obtenons :

$$2w_i c_i + \lambda = 0 \quad (n \text{ équations})$$

$$2w_t c_t - \lambda = 0 \quad (1 \text{ équation})$$

ou encore

$$2c_i + \frac{\lambda}{w_i} = 0 \quad (n \text{ équations})$$

$$2c_t - \frac{\lambda}{w_t} = 0 \quad (1 \text{ équation})$$

En additionnant les n premières équations et soustrayant de la somme la dernière, nous obtenons :

$$2(\sum c_i - c_t) + \lambda \left(\sum \frac{1}{w_i} + \frac{1}{w_t} \right) = 0$$

$$\lambda = - \frac{2D}{\sum \frac{1}{w_i} + \frac{1}{w_t}}$$

d'où

$$c_i = \frac{D}{\sum \frac{1}{w_i} + \frac{1}{w_t}} \cdot \frac{1}{w_i} \quad \text{et} \quad c_t = \frac{-D}{\sum \frac{1}{w_i} + \frac{1}{w_t}} \cdot \frac{1}{w_t}$$

Si tous les w_i sont égaux nous retrouvons bien les formules précédentes.

b - INTERPRÉTATION GÉOMÉTRIQUE

Moyennant le changement de variable $u_i = c_i \sqrt{w_i}$ l'interprétation géométrique faite ci-dessus reste valable. L'équation de H devient :

$$\sum \frac{u_i}{\sqrt{w_i}} - \frac{u_t}{\sqrt{w_t}} = D$$

Sous sa forme normale, elle s'écrit $\sum u_i \cos \alpha_i - u_t \cos \alpha_t = d$. Les $\cos \alpha$ sont les cosinus directeurs de la normale à H et d la distance de l'origine à H, par conséquent :

$$\cos \alpha_i = \frac{\frac{1}{\sqrt{w_i}}}{\sqrt{\sum \frac{1}{w_i} + \frac{1}{w_t}}}$$

$$\cos \alpha_t = \frac{-\frac{1}{\sqrt{w_t}}}{\sqrt{\sum \frac{1}{w_i} + \frac{1}{w_t}}}$$

$$d = \frac{D}{\sqrt{\sum \frac{1}{w_i} + \frac{1}{w_t}}}$$

Les coordonnées du pied de la normale passant par l'origine sont $u_i = d \cos \alpha_i$.

$$D'où \quad u_i = \frac{D}{\sum \frac{1}{w_i} + \frac{1}{w_t}} \cdot \frac{1}{\sqrt{w_i}} \quad \text{et} \quad u_t = \frac{-D}{\sum \frac{1}{w_i} + \frac{1}{w_t}} \cdot \frac{1}{\sqrt{w_t}}$$

En revenant aux variables c nous obtenons :

$$c_i = \frac{u_i}{\sqrt{w_i}} = \frac{D}{\sum \frac{1}{w_i} + \frac{1}{w_t}} \cdot \frac{1}{w_i} \quad \text{et} \quad c_t = \frac{-D}{\sum \frac{1}{w_i} + \frac{1}{w_t}} \cdot \frac{1}{w_t}$$

c - FIXATION DES POIDS

On peut, sur des considérations particulières, théoriques ou autres, fixer *a priori* les valeurs relatives des w et utiliser les formules ci-dessus. Il y a d'ailleurs dans cette fixation deux positions correspondant aux hypothèses suivantes :

1 - Les teneurs vraies τ_i et τ_t dont il a été question ci-dessus sont les véritables teneurs dans la population étudiée (attitude du biologiste).

2 - Les τ sont les véritables teneurs du matériel soumis à l'analyse (attitude du chimiste).

La nôtre sera celle plus globale du biologiste prenant en compte les variabilités naturelle et analytique. Le chimiste ne s'occupera que de la variabilité analytique. Nous considérons en effet que notre but est l'estimation des teneurs dans le matériel soumis à expérimentation et non dans l'échantillon parvenant au laboratoire.

Notre attitude nous conduira, en particulier dans le point B-3, à envisager une hypothèse telle que $\sigma_i^2 = K\tau_i^2$ (avec $w_i = 1/\sigma_i^2$) qui amène la teneur en total à avoir la plus grande variance donc le poids le plus faible. C'est en fait d'ailleurs ce qui est le plus couramment observé. Le chimiste, au contraire, accordera au dosage du total le poids le plus élevé car il le considèrera comme le plus précis. C'est en effet un dosage réalisé bien souvent par une technique assez simple après un nombre restreint de manipulations.

On voit donc que les deux attitudes arrivent à être contradictoires. De toutes façons les formules générales peuvent être appliquées dans l'un et l'autre cas, la divergence n'apparaissant que lors de l'attribution des poids qui sont fixés par des critères différents : étude de précision de dosage pour le chimiste, examen de la variabilité naturelle pour le biologiste.

Un exemple de fixation des poids est le suivant :

On accorde toute confiance au dosage du total, autrement dit on affirme que la différence D observée ne provient que des fractions. Ceci revient à considérer y_t comme certain, donc à lui accorder un poids infini : $w_t = \infty$

On peut aussi décider de corriger peu les faibles teneurs et beaucoup les fortes en prenant pour chaque résultat de dosage un poids inversement proportionnel à ce dernier : $w_i = 1/y_i$. On obtient alors $c_i = \left[D / (\sum y_i) \right] \cdot y_i$ et $c_t = 0$.

Comme on considère que les erreurs ne proviennent que des fractions, on remplace au dénominateur $\sum y_i$, erroné, par y_t , sûr, pour obtenir en définitive :

d'où

$$c_i = \left[D/y_t \right] \cdot y_i \quad \text{et} \quad c_t = 0$$

$$t_i = y_i (1 + D/y_t) \quad \text{et} \quad t_t = y_t.$$

Ces formules sont citées car elles ont parfois été envisagées après un établissement plus ou moins intuitif. On voit les hypothèses qu'elles supposent : y_t non aléatoire (validité plus que douteuse) et variances proportionnelles aux moyennes (cf. point B-3, hypothèse à vérifier dans chaque cas car elle n'est pas la plus courante).

d - PROCÉDÉ PRATIQUE

Les calculs numériques dans les cas pratiques d'utilisation peuvent être réalisés en utilisant un tableau de calcul tel que le tableau 1. Il contient tous les éléments nécessaires à l'obtention des valeurs des corrections qui se trouvent dans les deux dernières colonnes. Toutes les opérations à faire sont données en tête de colonne.

Les colonnes (1), (2), (4) et (5) contiennent les données : teneurs en (1) et (2), poids en (4) et (5). La différence D est obtenue en colonne (3). En colonnes (6) et (7) sont calculés les inverses des poids et en colonne (8) le dénominateur des coefficients de corrections $P = \sum_i \frac{1}{w_i} + \frac{1}{w_t}$. Le coefficient constant D/P (c'est-à-dire $\lambda/2$) figure en colonne (9) et les corrections en (10) et (11). Ces corrections sont à ajouter aux termes correspondants des colonnes (2) et (1) dans l'ordre.

Habituellement, la précision d'un dosage est caractérisée par sa variance et le poids qu'on lui attribue est l'inverse de cette dernière. Nous pouvons donc, en remplaçant w_i par $1/\sigma_i^2$ et w_t par $1/\sigma_t^2$, obtenir une expression des corrections c_i et c_t en fonction de σ_i^2 et σ_t^2 . Peu importe d'ailleurs que ces variances reflètent uniquement la variabilité analytique ou la somme des variabilités qui intéressent le biologiste.


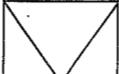


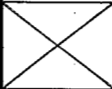
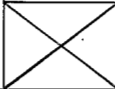



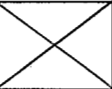
Les formules obtenues sont :

$$c_i = \frac{D \sigma_i^2}{\sum \sigma_i^2 + \sigma_t^2} \quad \text{et} \quad c_t = \frac{-D \sigma_t^2}{\sum \sigma_i^2 + \sigma_t^2}$$

Les c sont proportionnels aux variances : les corrections apportées aux mesures peu dispersées sont plus faibles que celles apportées aux mesures fort dispersées, autrement dit les résultats des dosages précis sont peu corrigés alors que les résultats des dosages peu précis subissent des corrections plus importantes, ce qui est tout-à-fait normal.

Les formules données ci-dessus ne sont utilisables que si les variances vraies sont connues : c'est là un cas plus qu'exceptionnel. Dans la pratique, si aucune hypothèse ne peut être faite sur la nature de la variance (cf. point B-3), il est nécessaire de disposer d'une possibilité d'estimation des σ_i^2 et σ_t^2 . Des séries de dosages réalisés dans des conditions uniformes, des plans d'expérience

Tableau 1 - Tableau de calcul des corrections dans le cas d'un fractionnement simple.

Teneur en total	Teneur en fraction	(1) - tot.(2)	Poids dosage total	Poids dosage fraction	1/(4)	1/(5)	(6) + tot.(7)	(3)/(8)	(7) x (9)	-(6) x (9)
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)
y_t	y_i	D	w_t	w_i	$1/w_t$	$1/w_i$	P	D/P	C_i	C_t
	y_1 y_2 y_i y_n			w_1 w_2 w_i w_n		$1/w_1$ $1/w_2$ $1/w_i$ $1/w_n$			C_1 C_2 C_i C_n	
y_t			w_t		$1/w_t$					C_t
	$\sum_i y_i$	D				$\sum_i 1/w_i$	P	D/P		

fournissant un carré moyen résiduel, des informations tirées de dosages antérieurs, etc. . peuvent, par exemple, être utilisés pour calculer des estimations suffisamment sûres s_i^2 de σ_i^2 et s_t^2 de σ_t^2 . Les formules de correction utilisables sont obtenues en remplaçant les véritables valeurs par leur estimation dans les expressions données ci-dessus :

$$c_i = \frac{D}{\sum s_i^2 + s_t^2} s_i^2 \quad \text{et} \quad c_t = \frac{-D}{\sum s_i^2 + s_t^2} s_t^2$$

Les corrections seront en général suffisamment faibles vis-à-vis des y pour que le remplacement de σ^2 par s^2 n'ait pas grande répercussion pratique.

La mise en œuvre de ces formules se fait de la façon suivante :

1 - calcul de la différence D entre le résultat du dosage du total, y_t , et de la somme des résultats des dosages des différentes fractions $\sum_{i=1}^n y_i$ ($D = y_t - \sum_{i=1}^n y_i$).

2 - calcul de la somme de toutes les variances (fractions et total) : $S = \sum_{i=1}^n s_i^2 + s_t^2$ et du facteur constant $C = D/S$.

3 - calcul des différents $c_i = Cs_i^2$ et $c_t = -Cs_t^2$ et addition des corrections aux résultats observés : $t_i = y_i + c_i$ et $t_t = y_t + c_t$.

Il est bien évident que le tableau 1 peut être utilisé comme indiqué ci-dessus en entrant directement les s_i^2 et s_t^2 en colonnes (6) et (7).

3 - HYPOTHÈSES SUPPLÉMENTAIRES SUR LA FORME DE LA VARIANCE

Dans la pratique, certains dosages sont souvent complexes, longs et surtout coûteux. Il s'ensuit des difficultés d'estimation des variances et un coût élevé d'utilisation des formules qui viennent d'être données.

Heureusement, dans la quasi-totalité des dosages, les variances ne sont pas quelconques. Elles sont fonction des moyennes et d'autres expressions plus simples d'emploi peuvent être obtenues pour les corrections qui sont alors exprimées en fonction des moyennes et non plus des variances.

Deux relations moyenne-variance sont à considérer :

- variance proportionnelle à la moyenne,
- variance proportionnelle au carré de la moyenne (relation la plus fréquente).

Ces deux cas vont être examinés.

a - Variance proportionnelle à la moyenne

La relation est $\sigma_i^2 = K\tau_i$. Nous pouvons remplacer σ_i^2 et σ_t^2 par leur expression dans :

$$c_i = \frac{D}{\Sigma\sigma_i^2 + \sigma_t^2} \sigma_i^2 \quad \text{et} \quad c_t = \frac{-D}{\Sigma\sigma_i^2 + \sigma_t^2} \sigma_t^2$$

pour obtenir :

$$c_i = \frac{D}{\Sigma\tau_i + \tau_t} \tau_i \quad \text{et} \quad c_t = \frac{-D}{\Sigma\tau_i + \tau_t} \tau_t$$

Ces expressions des corrections en fonction des moyennes vraies ne sont évidemment pas directement utilisables. Si des estimations de ces teneurs moyennes sont connues, elles peuvent être employées dans les formules ci-dessus pour obtenir des corrections particulières :

$$c_i = \frac{D\bar{f}_i}{\Sigma\bar{f}_i + \bar{f}_t} \quad \text{et} \quad c_t = \frac{-D\bar{f}_t}{\Sigma\bar{f}_i + \bar{f}_t}$$

Bien souvent d'ailleurs, surtout en début d'étude, nous n'avons même pas cette connaissance. Les seules quantités disponibles sont les résultats des dosages qui viennent d'être effectués et la seule possibilité que nous avons alors est le remplacement de τ_i par y_i et τ_t par y_t pour obtenir

$c_i = \frac{D}{\Sigma y_i + y_t} y_i \quad \text{et} \quad c_t = \frac{-D}{\Sigma y_i + y_t} y_t$
--

Au fur et à mesure de l'accumulation des informations les c peuvent être améliorés par remplacement des y par les \bar{f} qui sont des estimations plus précises des τ .

La mise en œuvre de ces formules est simple. Nous pouvons obtenir aisément les expressions de $t_i = y_i + c_i$ et $t_t = y_t + c_t$; après quelques calculs nous trouvons :

$$t_i = \frac{2y_t}{\Sigma y_i + y_t} y_i \quad \text{et} \quad t_t = \frac{2\Sigma y_i}{\Sigma y_i + y_t} y_t$$

Les calculs numériques à exécuter pour corriger les observations brutes y_i sont donc successivement :

- 1 - obtention du total des teneurs en fractions $\sum_{i=1}^n y_i$ et addition de la teneur en total à cette somme pour obtenir $S = \Sigma y_i + y_t$.
- 2 - calcul de $C = 2y_t/S$ et $C' = 2\Sigma y_i/S$.
- 3 - calcul des teneurs corrigées : $t_i = Cy_i$ et $t_t = C'y_t$

Le remplacement de $1/w_i$ par y_i et $1/w_t$ par y_t en colonnes (6) et (7) du tableau 1 est bien sûr une façon d'opérer tout aussi valable. Les calculs sont alors conduits comme il est indiqué dans le cas général.

b - Variance proportionnelle au carré de la moyenne

Nous en arrivons maintenant au cas le plus courant. C'est d'ailleurs le cas des dosages de phosphore. La relation entre la variance et la moyenne s'exprime par $\sigma_i^2 = K\tau_i^2$. En remplaçant σ^2 par $K\tau^2$ dans l'expression générale des c nous obtenons :

$$c_i = \frac{D}{\Sigma \tau_i^2 + \tau_t^2} \tau_i^2 \quad \text{et} \quad c_t = \frac{-D}{\Sigma \tau_i^2 + \tau_t^2} \tau_t^2$$

Selon l'état des connaissances déjà acquises les τ sont remplacés dans les formules ci-dessus par \bar{f} ou y pour obtenir les expressions pratiquement utilisables :

$$c_i = \frac{D}{\Sigma \bar{f}_i^2 + \bar{f}_t^2} \bar{f}_i^2 \quad \text{et} \quad c_t = \frac{-D}{\Sigma \bar{f}_i^2 + \bar{f}_t^2} \bar{f}_t^2$$

ou

$c_i = \frac{D}{\Sigma y_i^2 + y_t^2} y_i^2 \quad \text{et} \quad c_t = \frac{-D}{\Sigma y_i^2 + y_t^2} y_t^2$
--

La mise en œuvre des dernières formules, les plus utiles dans un bon nombre de cas, se fait pratiquement sans modifications :

- 1 - calcul de $D = y_t - \frac{\Sigma y_i}{n}$, de la somme des carrés de tous les dosages, y compris celui du total $S = \Sigma y_i^2 + y_t^2$ et du facteur constant $C = D/S$,
- 2 - pour chaque y_i , obtention de Cy_i , $1 + Cy_i$ et enfin de $t_i = (1 + Cy_i)y_i$,
- 3 - pour y_t obtention de Cy_t , $1 - Cy_t$ et $t_t = (1 - Cy_t)y_t$.

Au lieu de réaliser directement ces calculs il est possible, comme ci-dessus, de porter les valeurs de y_i^2 et y_t^2 dans les colonnes (6) et (7) du tableau 1 réservées aux inverses des poids. L'utilisation du tableau reste celle qui a été vue.

C - DOSAGE

AVEC SOUS-FRACTIONNEMENT

Il arrive, dans la réalisation de dosages comme ceux qui nous intéressent ici, que les fractions puissent elles-mêmes être scindées en sous-fractions qui sont également dosées. Nous nous trouvons alors en présence de dosages réalisés à différents niveaux :

- sous-fraction dans la fraction,
- fraction dans le total,
- total.

1 - SOUS-FRACTIONNEMENT DE TOUTES LES FRACTIONS

Nous noterons y_{ij} les teneurs en sous-fraction. L'indice i repère la fraction à laquelle la sous-fraction appartient (il y a k fractions : $i = 1, 2, \dots, k$) et j repère la sous-fraction à l'intérieur de la fraction (il y a n_i sous-fractions dans la fraction i : $j = 1, 2, \dots, n_i$). Le nombre total de sous-fractions dosées est donc $n = \sum_{i=1}^k n_i$. La teneur en fraction i sera appelée Y_i et la teneur en total Y_t .

Le tableau ci-dessous schématise la notation utilisée pour représenter les résultats des dosages effectués :

sous - fraction					fraction	total
y_{11}	y_{1j}	y_{1n_1}	Y_1	
y_{21}	y_{2j}	y_{2n_2}	Y_2	
\vdots		\vdots		\vdots	\vdots	
y_{i1}	y_{ij}	y_{in_i}	Y_i	
\vdots		\vdots		\vdots	\vdots	
y_{k1}	y_{kj}	y_{kn_k}	Y_k	Y_t

Pour obtenir les estimations des véritables teneurs les valeurs observées seront corrigées d'une quantité additive portant les mêmes indices que l'observation correspondante :

$$\begin{array}{lll}
 c_{ij} & \text{pour } y_{ij}, & \text{conduisant à } t_{ij} = y_{ij} + c_{ij}, \\
 C_i & \text{pour } Y_i, & \text{conduisant à } T_i = Y_i + C_i, \\
 C_t & \text{pour } Y_t, & \text{conduisant à } T_t = Y_t + C_t.
 \end{array}$$

A l'intérieur de la fraction i les teneurs t_{ij} doivent cumuler à T_i et la somme de tous les T_i doit être T_t . Nous avons donc :

$$\sum_{j=1}^{n_i} t_{ij} = T_i \qquad \sum_{i=1}^k T_i = T_t$$

et par voie de conséquence :

$$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} t_{ij} = T_t$$

Ces relations entraînent, comme dans le cas d'un fractionnement simple, les relations de contrainte suivantes :

$$\sum_j c_{ij} - C_i = Y_i - \sum_j y_{ij} = D_i \qquad (k \text{ relations})$$

$$\sum_i C_i - C_t = Y_t - \sum_i Y_i = D_t \qquad (1 \text{ relation})$$

La contrainte correspondant à la dernière relation est une conséquence des précédentes, elle n'en est donc pas indépendante et il n'y a pas lieu d'en tenir compte.

Appliquant toujours la méthode des moindres carrés nous allons minimiser :

$$f = \sum_i \sum_j w_{ij} c_{ij}^2 + \sum_i W_i C_i^2 + W_t C_t^2$$

w_{ij} est le poids attribué au dosage de la sous-fraction ij , W_i le poids attribué au dosage de la fraction i et W_t le poids attribué au dosage du total.

La fonction f sera minimisée compte tenu des relations de contrainte ci-dessus qui s'écrivent :

$$g = \sum_i C_i - C_t - D_t = 0 \qquad (1 \text{ relation})$$

$$h_i = \sum_j c_{ij} - C_i - D_i = 0 \qquad (k \text{ relations})$$

La méthode des multiplicateurs de LAGRANGE nous conduit à résoudre

$$df + \lambda dg + \sum_i \mu_i dh_i = 0$$

soit :

- (1) $2w_{ij} c_{ij} + \mu_i = 0$ (n équations, formant k groupes, le i ème comprenant n_i équations)
- (2) $2W_i C_i + \lambda - \mu_i = 0$ (k équations)
- (3) $2W_t C_t - \lambda = 0$ (1 équation)

Pour résoudre ce système nous allons calculer λ et μ_i puis porter leur valeur dans les relations ci-dessus pour obtenir les expressions des corrections.

En additionnant, après division par w_{ij} ou W_i selon le cas, les n_i équations de (1) relatives à la fraction i et soustrayant de la somme l'équation correspondante de (2), nous obtenons :

$$2\left(\sum_j c_{ij} - C_i\right) + \mu_i \sum_j \frac{1}{w_{ij}} - \frac{\lambda}{W_i} + \frac{\mu_i}{W_i} = 0$$

soit

$$2D_i + \left(\sum_j \frac{1}{w_{ij}} + \frac{1}{W_i} \right) \mu_i - \frac{\lambda}{W_i} = 0$$

Nous avons ainsi k équations.

En additionnant maintenant après division comme ci-dessus les k équations de (2) et soustrayant la dernière de la somme nous obtenons :

$$2 \left(\sum_i C_i - C_t \right) + \lambda \sum_i \frac{1}{W_i} - \sum_i \frac{\mu_i}{W_i} + \frac{\lambda}{W_t} = 0$$

soit

$$2D_t + \left(\sum_i \frac{1}{W_i} + \frac{1}{W_t} \right) \lambda - \sum_i \frac{\mu_i}{W_i} = 0$$

donc, au total, k+1 équations pour les k+1 inconnues λ et μ_j .

Posons pour simplifier l'écriture :

$$P_i = \sum_j \frac{1}{w_{ij}} + \frac{1}{W_i}$$

$$P_t = \sum_i \frac{1}{W_i} + \frac{1}{W_t}$$

Notre système d'équations s'écrit :

$$2D_i + P_i \mu_i - \frac{\lambda}{W_i} = 0 \quad (k \text{ équations})$$

$$2D_t + P_t \lambda - \sum_i \frac{\mu_i}{W_i} = 0 \quad (1 \text{ équation})$$

d'où nous tirons :

$$\mu_i = \frac{1}{P_i} \left[\frac{\lambda}{W_i} - 2D_i \right]$$

et

$$\sum_i \frac{\mu_i}{W_i} = \sum_i \frac{1}{P_i W_i} \left[\frac{\lambda}{W_i} - 2D_i \right]$$

La dernière équation nous donne

$$2D_t + P_t \lambda - \sum_i \frac{1}{P_i W_i} \left[\frac{\lambda}{W_i} - 2D_i \right] = 0$$

d'où la valeur de λ :

$$\lambda = -2 \frac{D_t + \sum_i \frac{D_i}{P_i W_i}}{P_t - \sum_i \frac{1}{P_i W_i^2}}$$

que nous reportons dans les k premières équations pour obtenir :

$$\mu_i = -\frac{2}{P_i W_i} \left[\frac{D_t + \sum_i \frac{D_i}{P_i W_i}}{P_t - \sum_i \frac{1}{P_i W_i^2}} + D_i W_i \right]$$

Ces valeurs nous permettent d'obtenir les expressions des corrections :

$$c_{ij} = -\frac{\mu_i}{2w_{ij}} = \frac{1}{P_i W_i} \left[\frac{D_t + \sum_i \frac{D_i}{P_i W_i}}{P_t - \sum_i \frac{1}{P_i W_i^2}} + D_i W_i \right] \frac{1}{w_{ij}}$$

$$C_i = \frac{\mu_i - \lambda}{2W_i} = \left[\left(1 - \frac{1}{P_i W_i}\right) \frac{D_t + \sum_i \frac{D_i}{P_i W_i}}{P_t - \sum_i \frac{1}{P_i W_i^2}} - \frac{D_i}{P_i} \right] \frac{1}{W_i}$$

$$C_t = \frac{\lambda}{2W_t} = \frac{D_t + \sum_i \frac{D_i}{P_i W_i}}{P_t - \sum_i \frac{1}{P_i W_i^2}} \cdot \frac{1}{W_t}$$

L'interprétation géométrique est ici peut-être moins évidente que dans le cas d'un fractionnement simple : à un changement de variable près la fonction f est le carré de la distance de l'origine à un point M de l'espace R_{n+k+1} . Ce point doit se trouver sur les hyperplans dont les équations sont $g = 0$ et $h_j = 0$, donc sur leur intersection. La distance OM est minimale lorsque M est la projection orthogonale de O sur cette intersection.

La mise en œuvre de ces formules suit pas à pas la résolution littérale de façon à ordonner les calculs numériques. On peut utiliser un tableau de calcul tel que le tableau 2 qui présente les opérations dans un ordre systématique. Ces opérations sont rappelées en tête de colonne.


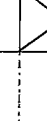
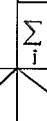








Les colonnes (1), (2) et (3) contiennent les teneurs observées ainsi que les totaux dont nous aurons besoin : $\sum_i y_{ij}$ et $\sum_i Y_i$; les colonnes (4) et (5) contiennent les différences D_j et D_t . Dans les colonnes (6), (7) et (8) sont présentés les poids, ainsi que leur inverse dans les colonnes (9), (10) et (11). Les sommes des inverses des poids (P_i et P_t) sont obtenues dans les colonnes (12) et (13).

Les colonnes (14) à (21) contiennent les différents termes des corrections qui sont calculées dans les colonnes (22), (23) et (24). Ces corrections sont ajoutées respectivement aux termes correspondants des colonnes (3), (2) et (1).

Les colonnes (14), (15), (16) et (17) conduisent au calcul de $\lambda/2$, appelé ici A , les sommes nécessaires sont obtenues au bas des colonnes (16) et (17). Enfin les colonnes (18), (19) et (20) fournissent $\mu_i/2$, appelé ici B_i .

Il serait possible de développer les formules utilisant des expressions particulières des poids telles que celles qui ont été envisagées dans le cas d'un fractionnement simple. Ces formules n'ont pas été établies car l'introduction des expressions des poids dans le tableau général semble ici au moins aussi simple que l'utilisation de nouvelles formules. Les points particuliers associés à l'attribution des poids ont été discutés à propos du fractionnement simple.

Tableau 2 - Tableau de calcul des corrections dans le cas de sous-fractionnement.

Teneur en total	Teneur en fraction	Teneur en sous-fraction	(2) - Ss. tot.(3)	(1) - tot.(2)	Poids dosage total	Poids dosage fraction	Poids dosage sous-fraction	1/(6)	1/(7)	1/(8)	(10) + Ss. tot.(11)
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
Y_t	Y_i	y_{ij}	D_i	D_t	W_t	W_i	w_{ij}	$1/W_t$	$1/W_i$	$1/w_{ij}$	P_i
		y_{i1} \vdots y_{ij} \vdots y_{in_i}					w_{i1} \vdots w_{ij} \vdots w_{in_i}			$1/w_{i1}$ \vdots $1/w_{ij}$ \vdots $1/w_{in_i}$	
	Y_i	$\sum_j y_{ij}$	D_i			W_i		$1/W_i$	$\sum_j 1/w_{ij}$	P_i	
		y_{i1} \vdots y_{ij} \vdots y_{in_i}					w_{i1} \vdots w_{ij} \vdots w_{in_i}			$1/w_{i1}$ \vdots $1/w_{ij}$ \vdots $1/w_{in_i}$	
	Y_i	$\sum_j y_{ij}$	D_i			W_i		$1/W_i$	$\sum_j 1/w_{ij}$	P_i	
		y_{k1} \vdots y_{kj} \vdots y_{kn_k}					w_{k1} \vdots w_{kj} \vdots w_{kn_k}			$1/w_{k1}$ \vdots $1/w_{kj}$ \vdots $1/w_{kn_k}$	
	Y_k	$\sum_j y_{kj}$	D_k			W_k		$1/W_k$	$\sum_j 1/w_{kj}$	P_k	
Y_t					W_t			$1/W_t$			
	$\sum_i Y_i$			D_t				$\sum_i 1/W_i$			

* A = - $\frac{\text{TOTAL (16)} + (5)}{\text{TOTAL (17)} - (13)}$

(9) + tot. (10)	1/(12)	(10) x (14)	(4) x (15)	(10) x (15)	A x (15)*	(4) x (14)	(18) - (19)	(20) - A*	-(20) x (11)	(21) x (10)	A x (9)*
(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)
P_t	$1/P_i$	$1/P_i W_i$	$D_i/P_i W_i$	$1/P_i W_i^2$	$A/P_i W_i$	D_i/P_i	B_i	$B_i - A$	c_{ij}	C_i	C_t
	$1/P_i$	$1/P_i W_i$	$D_i/P_i W_i$	$1/P_i W_i^2$	$A/P_i W_i$	D_i/P_i	B_i	$B_i - A$	c_{i1} \vdots c_{ij} \vdots c_{in_i}	C_i	
	$1/P_i$	$1/P_i W_i$	$D_i/P_i W_i$	$1/P_i W_i^2$	$A/P_i W_i$	D_i/P_i	B_i	$B_i - A$	c_{i1} \vdots c_{ij} \vdots c_{in_i}	C_i	
	$1/P_k$	$1/P_k W_k$	$D_k/P_k W_k$	$1/P_k W_k^2$	$A/P_k W_k$	D_k/P_k	B_k	$B_k - A$	c_{k1} \vdots c_{kj} \vdots c_{kn_k}	C_k	
P_t			$\sum_i D_i/P_i W_i$	$\sum_i 1/P_i W_i^2$							C_t

2 - SOUS-FRACTIONNEMENT PARTIEL

Nous avons dans le point C-1 supposé que toutes les fractions conduisaient à des dosages de sous-fractions. Ce n'est pas obligatoirement le cas général. Il arrive que certaines fractions soient dosées dans leur ensemble sans poursuivre la décomposition plus avant. Nous allons examiner maintenant les modifications qui doivent être apportées aux formules que nous venons d'établir lorsque certaines fractions restent telles quelles alors que d'autres sont décomposées. Pour la commodité de l'exposé nous supposons, ce qui ne nuit pas à la généralité, que les r premières ne sont pas décomposées. Nous noterons Y_1, Y_2, \dots, Y_r les résultats de leur dosage. A partir de la valeur $r+1$ de l'indice i nous conserverons la notation précédente.

Le nombre total, n , de sous-fractions est maintenant $n = \sum_{i=r+1}^k n_i$. Dans l'application de la méthode des moindres carrés il n'y aura plus que $k-r+1$ relations de contrainte, donc $k-r+1$ multiplicateurs de LAGRANGE : λ et μ_i ($i=r+1, r+2, \dots, k$).

Les quantités D_1, D_2, \dots, D_r et P_1, P_2, \dots, P_r n'existeront plus ; $D_{r+1} \dots D_k, P_{r+1} \dots P_k, P_t$ resteront inchangées.

Il est inutile de redévelopper les calculs dont les résultats sont évidents :

. μ_i n'existe plus pour $i = 1, 2, \dots, r$.

$$\lambda = -2 \frac{D_t + \sum_{i=r+1}^k \frac{D_i}{P_i W_i}}{P_t - \sum_{i=r+1}^k \frac{1}{P_i W_i^2}}$$

. μ_i reste inchangé pour $i = r+1, r+2, \dots, k$:

$$\mu_i = -\frac{2}{P_i W_i} \left(-\frac{\lambda}{2} + D_i W_i \right)$$

Les expressions des corrections deviennent :

$$C_i = -\frac{\lambda}{2W_i} \quad (1 \leq i \leq r)$$

$$c_{ij} = -\frac{\mu_j}{2w_{ij}} \quad (r+1 \leq i \leq k)$$

$$C_i = \frac{\mu_i - \lambda}{2W_i} \quad (r+1 \leq i \leq k)$$

$$C_t = \frac{\lambda}{2W_t}$$

La réalisation des calculs se fait encore en utilisant le tableau 2 moyennant les quelques modifications qui suivent. Lorsqu'une fraction n'est pas décomposée :

. rien n'est inscrit dans les colonnes (3) et (8) correspondantes. Aucune des quantités qui dérivent de ces colonnes n'est alors calculée (colonnes (11) à (19), à l'exception de (13) et (22)).

. le B_j correspondant est remplacé par zéro en colonne (20) pour le calcul de la correction C_i .

A remarquer que la partie du tableau modifiée comme il vient d'être indiqué n'est autre que le tableau 1 utilisé dans le cas de fractionnement simple, au calcul de A près.

Lorsque les poids sont pris égaux aux inverses des carrés des moyennes (ou des teneurs) il est évidemment inutile de remplir les colonnes (6), (7) et (8) : les colonnes (9), (10) et (11) sont directement remplies par les variances, les moyennes (ou teneurs) ou leur carré.

Pour être complet, il resterait à examiner le problème des variances et covariances des termes correctifs. Il n'a pas été abordé pour le moment car, d'une part notre propos était simplement de dégager les corrections à apporter aux résultats des dosages et, d'autre part, la connaissance de ces variances et covariances paraît d'un intérêt assez réduit pour les exploitations habituelles des résultats.

Enfin, l'hypothèse de normalité, toujours supposée vraie, peut exiger un changement de variable. Les y_{ij} ou y_j , Y_j , y_t ou Y_t ne seront plus alors les teneurs elles-mêmes mais une fonction Φ des teneurs telle que les Φ_{ij} , Φ_j et Φ_t soient distribués de façon gaussienne. Les exploitations seront faites sur les Φ et lors de la transformation inverse il conviendra de tenir compte du biais introduit par la transformation dans l'estimation de la tendance centrale comme l'indiquent NEYMAN et SCOTT. De toute façon, l'hypothèse de normalité n'est pas indispensable lorsqu'aucun test paramétrique n'est fait sur les teneurs.

D - EXEMPLES NUMÉRIQUES

Deux exemples numériques sont fournis pour illustrer la méthode de correction :

- correction dans le cas d'un fractionnement simple ;
- correction dans le cas d'un sous-fractionnement partiel.

Les données numériques utilisées ici nous ont été aimablement communiquées par J. DIDIER de SAINT-AMAND et L. ZUCKERMAN. Nous tenons à les en remercier.

Ce sont les résultats du dosage de phosphore dans les feuilles de la variété de cotonnier 108 F. Ils sont extraits d'une expérimentation plus importante ; le traitement retenu est le témoin.

Tableau 3 - Calcul des teneurs corrigées dans le cas de fractionnement simple.

	Teneurs			Inverses des poids				Corrections		Teneurs corrigées				
	total	fraction		total	fraction			fraction	total	total	fraction			
	(1)	(2)		(3)	(6)			(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(1) + (11)	(2) + (10)
				(1) - tot.(2)					(6) + tot.(7)	(3)/(8)	(7) x (9)	- (6) x (9)		
	y_t	y_i		D	$1/W_t$			$1/W_i$	P	D/P	c_i	c_t	t_t	t_i
P acido-soluble total		2.200			4.8400			- 0.0397			2.160			
P lipidique		0.647			0.4186			- 0.0034			0.644			
P protéique		0.520			0.2704			- 0.0022			0.518			
P A.D.N.		0.128			0.0164			- 0.0001			0.128			
P A.R.N.		0.880			0.7744			- 0.0063			0.874			
P total	4.180	4.375	- 0.195	17.4724	6.3198	23.7922	- 0.008196		+ 0.1432	4.323	4.324			

1 - FRACTIONNEMENT SIMPLE

Les fractions dosées sont : le phosphore acido-soluble total, le phosphore lipidique, le phosphore protéique, le phosphore ADN et le phosphore ARN. Le phosphore total a également été dosé. Les teneurs observées sont les suivantes, toutes données pour une raison d'uniformité à trois chiffres après la virgule bien qu'obtenues à trois chiffres significatifs :

Phosphore total	4.180 mg/g
Ph. acido-soluble total	2.200 mg/g
Phosphore lipidique	0.647 mg/g
Phosphore protéique	0.520 mg/g
Phosphore ADN	0.128 mg/g
Phosphore ARN	0.880 mg/g.

Une étude des carrés moyens résiduels de l'ensemble de l'expérimentation a montré que la proportionnalité des variances au carré des moyennes peut être acceptée. Nous adopterons donc comme poids les inverses des carrés des teneurs. En fait, d'ailleurs pour le calcul, comme nous l'avons déjà dit, les carrés des teneurs sont introduits directement à la place des inverses des poids dans le tableau 3 qui est la reprise du tableau 1 après suppression des colonnes (4) et (5) et adjonction de deux colonnes "teneurs corrigées" en fin de tableau. La réalisation des calculs n'appelle aucun commentaire particulier, chaque opération étant précisée en tête de colonne.

2 - SOUS-FRACTIONNEMENT PARTIEL

Pour illustrer la conduite des calculs dans le cas de sous-fractionnement, le sous-fractionnement partiel, dont les calculs théoriques n'ont pas été développés, a été retenu. Pour les besoins de l'illustration nous supposerons que la fraction "P acido-soluble total" a donné lieu au dosage de deux sous-fractions : "P acido-soluble minéral" et "P acido-soluble organique", fournissant les teneurs suivantes :

P acido-soluble minéral	1.610 mg/g
P acido-soluble organique	0.568 mg/g.

Les calculs sont conduits dans le tableau 4, reprise du tableau 2 à l'exception des colonnes (6), (7) et (8). Trois colonnes supplémentaires contenant les teneurs corrigées y ont été ajoutées. Les opérations faites dans chaque colonne sont explicitées en tête de celle-ci comme dans le tableau 3.

Les calculs sont conduits de bout en bout pour la fraction "P acido-soluble total" qui a été sous-fractionnée alors que B_j est remplacé par zéro, comme il a été dit en C-2 ci-dessus, pour les autres fractions qui n'ont pas fait l'objet d'un fractionnement de second ordre.

Tableau 4 - Calcul des teneurs corrigées dans le cas de sous-fractionnement partiel.

	Teneurs			(4)	(5)	Inverses des poids			(12)	(13)	(14)				
	total	fraction	ss. fract.			total	fraction	ss. fract.							
	(1)	(2)	(3)			(9)	(10)	(11)				(10) + Ss. tot. (11)	(9) + tot. (10)	1/(12)	
						(2) - Ss. tot. (3)	(1) - tot. (2)								
	Y _t	Y _i	y _{ij}			D _i	D _t	1/W _t				1/W _i	1/w _{ij}	P _i	P _t
P acido-soluble minéral			1.610					2.5921							
P acido-soluble organique			0.568					0.3226							
P acido-soluble total		2.200	2.178	0.022				4.8400	2.9147	7.7547	0.1289				
P lipidique		0.647						0.4186							
P protéique		0.520						0.2704							
P A.D.N.		0.128						0.0164							
P A.R.N.		0.880						0.7744							
P total	4.180	4.375			- 0.195	17.4724	6.3198			23.7922					

$$* A = \frac{0.01373 - 0.195}{3.0208 - 23.7922} = \frac{-0.1813}{-20.7714} = 0.008727$$

							Corrections			Teneurs corrigées		
(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	ss. fract.	fraction	total	total	fraction	ss. fract.
(10) x (14)	(4) x (15)	(10) x (15)	A x (15)*	(4) x (14)	(18) - (19)	(20) - A*	-(20)x(11)	(21) x (10)	A x (9)*	(1) + (24)	(2) + (23)	(3) + (22)
$1/P_i W_i$	$D_i/P_i W_i$	$1/P_i W_i^2$	$A/P_i W_i$	D_i/P_i	B_i	$B_i - A$	c_{ij}	C_i	C_t	t_t	t_i	t_{ij}
							- 0.0068					1.603
							- 0.0008					0.567
0.6241	0.01373	3.0208	0.005447	0.002837	0.002610	- 0.006117		- 0.0296			2.170	2.170
					0	- 0.008727		- 0.0036			0.643	
					0	- 0.008727		- 0.0024			0.518	
					0	- 0.008727		- 0.0001			0.128	
					0	- 0.008727		- 0.0068			0.873	
	0.01373	3.0208							+ 0.1525	4.332	4.332	

E - RÉSUMÉ

Lorsqu'on procède au dosage d'un tout et des fractions qui le constituent on ne trouve pas sur les résultats expérimentaux la relation de cumul qui doit les lier : le total des teneurs en fractions n'est pas la teneur en total. Les résultats bruts des dosages doivent être corrigés pour que la relation de cumul soit vérifiée. Des corrections additives ont été calculées par la méthode des moindres carrés : si w_i est le poids accordé au dosage de la fraction n°i, w_t le poids accordé au dosage du total et D la différence entre le résultat du dosage du total y_t et la somme des résultats des dosages des fractions $\sum_i y_i$ ($D = y_t - \sum_i y_i$), la correction à ajouter au résultat brut y_i du dosage de la fraction n° i est :

$$c_i = \frac{D}{\sum \frac{1}{w_i} + \frac{1}{w_t}} \cdot \frac{1}{w_i}$$

Le résultat corrigé du dosage du total est obtenu en ajoutant :

$$c_t = \frac{-D}{\sum \frac{1}{w_i} + \frac{1}{w_t}} \cdot \frac{1}{w_t}$$

au résultat brut y_t de ce dosage.

A partir de ces formules générales des formules utilisant des expressions particulières des poids ont été établies : poids inversement proportionnels aux variances, variances proportionnelles aux moyennes ou au carré des moyennes.

Des schémas de mise en œuvre de toutes les formules ont été donnés dans chaque cas : tableau pour le cas général et directives dans les cas particuliers.

Le cas de sous-fractionnement de tout ou partie des fractions a également été examiné.

Si toutes les fractions sont décomposées, nous avons, en appelant y_{ij} la teneur brute en la j^{ème} sous-fraction de la fraction i, Y_i la teneur brute en la i^{ème} fraction, Y_t la teneur brute en total, w_{ij} , W_i et W_t les poids correspondants, P_i la somme $\sum_j \frac{1}{w_{ij}} + \frac{1}{W_i}$, P_t la somme $\sum_i \frac{1}{W_i} + \frac{1}{W_t}$, D_i la différence $Y_i - \sum_j y_{ij}$ et D_t la différence $Y_t - \sum_i Y_i$:

$$c_{ij} = - \frac{\mu_i}{2w_{ij}} \quad \text{pour les teneurs en sous-fractions,}$$

$$C_i = \frac{\mu_i - \lambda}{2W_i} \quad \text{pour les teneurs en fractions,}$$

$$C_t = \frac{\lambda}{2W_t} \quad \text{pour la teneur en total,}$$

avec

$$\lambda = -2 \frac{D_t + \sum \frac{D_i}{P_i W_i}}{P_t - \sum \frac{1}{P_i W_i^2}}$$

et

$$\mu_i = - \frac{2}{P_i W_i} \left(- \frac{\lambda}{2} + D_i W_i \right)$$

Si certaines des fractions (les r premières) ne donnent pas lieu au dosage de sous-fractions les formules ci-dessus doivent être modifiées comme suit :

$$C_i = - \frac{\lambda}{2 W_i} \quad \text{pour les r premières fractions non sous-fractionnées}$$

$$c_{ij} = - \frac{\mu_i}{2 w_{ij}} \quad \text{pour les sous-fractions,}$$

$$C_i = \frac{\mu_i - \lambda}{2 W_i} \quad \text{pour les k-r dernières fractions, celles qui ont donné lieu à sous-fractionnement}$$

$$C_t = \frac{\lambda}{2 W_t} \quad \text{pour le total,}$$

avec

$$\lambda = -2 \frac{D_t + \sum_{i=r+1}^k \frac{D_i}{P_i W_i}}{P_t - \sum_{i=r+1}^k \frac{1}{P_i W_i^2}}$$

et

$$\mu_i = - \frac{2}{P_i W_i} \left(- \frac{\lambda}{2} + D_i W_i \right)$$

Un tableau-type a été établi pour guider la réalisation des calculs numériques dans le cas général d'application. Moyennant quelques simplifications il s'adapte aux cas particuliers.

Deux exemples numériques ont été fournis pour illustrer la méthode de calcul :

- correction dans le cas d'un fractionnement simple,
- correction dans le cas d'un sous-fractionnement partiel.

Bibliographie

- (1) LINNIK (Y.V.) - 1963 - *Méthode des moindres carrés* (traduction ARKHIPOFF O.). Dunod, Paris, X + 356 p.
- (2) NEYMAN (J.), SCOTT (E.) - 1960 - Correction for bias introduced by a transformation of variables. *Ann. Math. Stat.*, 31, pp.643-655.

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

Direction générale :

24, rue Bayard, PARIS 8^e

Service Central de Documentation :

70-74, route d'Aulnay - 93 - BONDY