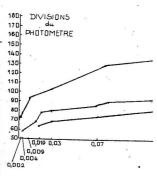
Il est absolument nécess photométrique propre de c que la valeur obtenue après

210 DIVISIONS 200 190 PHOTOMETRE 180 170 160 150 140 130 120 100 90 60



Les courbes I et II indique On remarquera :

1°) les grandes variations 2°) le parallélisme relatif d 5,5 :

(*) Protocole d'une manipule dissous dans l'eau sont mis dan d'une solution d'alun de fer et d de bien agiter afin de rendre la c à 0,1 p. 100 est la concentratio serait pas compatible avec la solors des mesures. Le mélange e les mesures sont faites en lumiè ce travail sont construites sur tions.

BULL. STE. CHIM. BIOL., 1949, 31, N

SEMI-MICRODOSAGES DES TANINS GALLIQUES. APPLICATIONS AU PELARGONIUM SAIN ET TUMORAL (CROWN-GALL). EXTRACTIONS ET DOSAGES,

par B. RYBAK et L. HIRTH.

(Mémoire présenté à la séance du 21 juin 1949).

Nous avons cherché à doser la quantité d'acide géraniatannique des tissus sains et tumoraux (Crown-gall) du Pelargonium zonale en

1° d'établir une éventuelle relation entre le taux de tanins et la résistance aux réinfections du *P. tumefaciens* de certaines régions saines de la tige pourvue de tumeurs [1];

2° de relier éventuellement ce taux de tanins à la toxicité de ceuxci vis-à-vis de cultures de tissus [2].

Les différentes techniques proposées [3, 4, 5, 6] (*) pour doser les tanins ne nous ont pas paru satisfaisantes, soit parce qu'elles ne permettent pas une évaluation suffisamment précise [3, 4], soit parce que le dosage est peu spécifique [5] ou encore que sa complication est telle que les erreurs inévitables de manipulation rendent la technique trop approximative [6]. Nous avons alors mis au point deux techniques rapides, l'une photométrique déjà ébauchée dans un précèdent travail [1], l'autre volumétrique, toutes les deux fondées sur la réaction des composés phénolés aux sels de fer.

TECHNIQUE PHOTOMÉTRIQUE.

Le principe revient à évaluer l'intensité de la coloration bleue produite par l'alun de fer et d'ammonium et les tanins à pyrogallol. C'est le cas à la fois de l'acide géraniatannique du P. zonale [1] (**) et de l'acide tannique ordinaire.

A l'aide du photomètre de Meunier nous avons donc construit les courbes d'étalonnage par rapport à des concentrations connues d'acide tannique à l'éther et à différents pH (***).

(*) Il en existe beaucoup d'autres, mais pour ne pas rendre notre critique fastidieuse, nous n'avons relevé que les techniques qui pouvaient se rapprocher le plus des nôtres.

rapprocher le plus des nôtres.

(**) Toutes les mesures ont été effectuées sur la variété « Jardin des Plantes » du P. zonale cultivée dans la serre de l'Institut Pasteur de Paris à 20° C. Les plantes utilisées étaient des plantes de la fin automne-début hiver.

hiver.

(***) Bien entendu, les tanins étant des acides, on maintenait le même pH pour toutes les dilutions d'une même mesure. Cette précision est également valable pour notre technique volumétrique.

ANINS GALLIQUES.
M SAIN ET TUMORAL
L).
OSAGES,

HIRTH.

du 21 juin 1949).

tité d'acide géraniatannique l) du Pelargonium zonale en

ntre le taux de tanins et la iens de certaines régions sai-

tanins à la toxicité de ceux-

3, 4, 5, 6] (*) pour doser les es, soit parce qu'elles ne perprécise [3, 4], soit parce que core que sa complication est pulation rendent la technique rs mis au point deux techniébauchée dans un précédent les deux fondées sur la rée fer.

ÉTRIQUE.

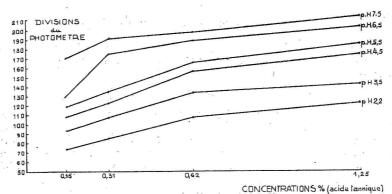
nsité de la coloration bleue um et les tanins à pyrogallol. annique du *P. zonale* [1] (**)

ous avons donc construit les oncentrations connues d'acide

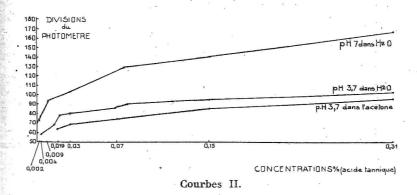
pour ne pas rendre notre criles techniques qui pouvaient se

sur la variété « Jardin des Planle l'Institut Pasteur de Paris à lantes de la fin automne-début

acides, on maintenait le même nesure. Cette précision est égaletrique. photométrique propre de chaque solution étalon et de ne considérer que la valeur obtenue après adjonction de l'alun (*).



Courbes I.



Les courbes I et II indiquent les résultats.

On remarquera:

- 1°) les grandes variations liées au pH;
- $2^{\circ})$ le parallélisme relatif des courbes comprises entre pH 2,2 et pH 5,5 ;
- (*) Protocole d'une manipulation : 4,8 ml d'acide tannique à l'éther dissous dans l'eau sont mis dans un tube à essais et additionnés de 0,2 ml d'une solution d'alun de fer et d'ammonium à 0,1 p. 100. Il faut prendre soin de bien agiter afin de rendre la coloration homogène. La concentration d'alun à 0,1 p. 100 est la concentration optima, une concentration plus forte ne serait pas compatible avec la sensibilité de l'appareil de Meunier employé lors des mesures. Le mélange est mis dans une cuve à faces parallèles et les mesures sont faites en lumière verte. Toutes les courbes présentées dans ce travail sont construites sur des moyennes d'au moins trois déterminations.

3") l'allure différente des courbes à partir de pH 5,5 correspondant à un brusque déplacement de la coloration de la solution d'acide tannique vers les grandes longueurs d'onde.

TECHNIQUE VOLUMÉTRIQUE.

La découverte du fait qu'à pH < 1 la coloration bleu obtenue par l'alun de fer et d'ammonium et les tanins disparaissait, nous a amenés à mettre au point une nouvelle technique de dosage des tanins.

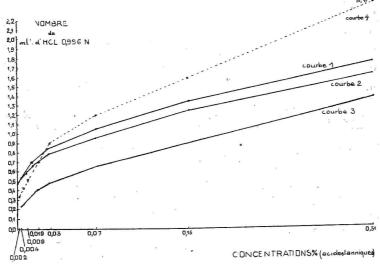
I. — Etalonnage par rapport à l'acide tannique à l'éther.

2 ml de la solution d'acide tannique à l'éther à des concentrations variables (*) sont additionnés de 1 ml d'une solution d'alun de fer et d'ammonium à 1 p. 100; après agitation on ajoute à la microburette de l'acide chlorhydrique exactement titré (dans nos essais : 0,996 N). Les étalonnages ont été effectués dans 2 séries de milieux différents:

a) un milieu uniquement aqueux;

b) un milieu acétone 50 p. 100 + eau 50 p. 100.

Les courbes III représentent nos résultats.



Courbes III.

La courbe 1 correspond à des solutions d'acide tannique dans l'eau à pH

La courbe 2 correspond à des solutions d'acide tannique dans l'eau à pH 3,7 et à pH 5; elle se superpose exactement à celle correspondant à des solutions d'acide tannique dans l'acétone à pH 7,0.

La courbe 3 correspond à des solutions d'acide tannique dans l'acétone à pH 5 et à pH 3,7.

La courbe 4 correspond à l'acide géraniatannique dans l'eau à pH 5,0.

(*) Utiliser de préférence de l'eau bidistillée bouillie pour les dilutions. BULL. STÉ. CHIM. BIOL., 1949, 31, N° 5-6.

On remarquera que:

1. les courbes 1, 2 et 3 sont 2. la limite de sensibilité est métrique ne permet guère qu'i Nous expliquons ceci par le f d'apprécier le terme de la re (volumétrique) que pour la ce à la limite de sa zone de sensil

3. les courbes du milieu ac exactement pour le pH 3,5 c marquées dans la technique] à ce que la coloration du mél véritable coloration d'indicate

II. — Etalonnage par r

REMAROL

1) En tout état de cause les tannique ordinaire ne peuvent luations d'acide tannique ordi ment; en effet il est hautemer cas) que la constitution et le sont différents et qu'en cons établir entre l'acide tannique traire. En toute rigueur on do le dosage de l'acide géraniatai quoi nous l'avons extrait du F

2) Si l'on essaie de définir ı étalons de nos techniques vol avec l'acide tannique ordinai dance rationnelle satisfaisant tient au fait qu'en définitive re; c'est pourquoi :

a) les autres techniques p comme celles de MITCHELL [7 utilisent des réactifs différent tisfaisantes;

b) nous donnons la préfér courbe étalon obtenue avec courbe étalon volumétrique; vaillé à pH 5 (voir plus loin) respondant à pH 5,0.

A) Extraction de l'acide gé Après lavage à l'eau de co porte des tiges de P. zonale d

(*) L'adjonction d'HCl au n provoque l'apparition d'un « nu: peut facilement apprécier le mon ne produit plus ce nuage et où considérée comme terminée.

A STATE OF THE PARTY OF THE PAR

partir de pH 5,5 correspondant ion de la solution d'acide tan-

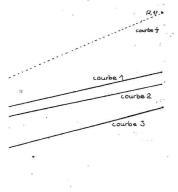
IÉTRIQUE.

la coloration bleu obtenue par ns disparaissait, nous a amenés ue de dosage des tanins.

'acide tannique à l'éther.

à l'éther à des concentrations l d'une solution d'alun de fer citation on ajoute à la microement titré (dans nos essais : ctués dans 2 séries de milieux

au 50 p. 100. ultats.



CONCENTRATIONS (acidestanniques)

d'acide tannique dans l'eau à pH

I.

d'acide tannique dans l'eau à pH nt à celle correspondant à des so-pH 7,0.

s d'acide tannique dans l'acétone

iatannique dans l'eau à pH 5,0.

illée bouillie pour les dilutions.

On remarquera que:

1. les courbes 1, 2 et 3 sont d'un parallélisme assez satisfaisant;

2. la limite de sensibilité est repoussée à 40 γ (notre méthode photométrique ne permet guère qu'une sensibilité de l'ordre de 120 à 140 γ. Nous expliquons ceci par le fait qu'il est plus facile pour l'opérateur d'apprécier le terme de la réaction au cours du dosage par retour (volumétrique) que pour la cellule photoélectrique lorsqu'on travaille à la limite de sa zone de sensibilité (*);

3. les courbes du milieu acétonique tout au moins se superposent exactement pour le pH 3,5 et 5,0 alors que les différences étaient marquées dans la technique photométrique; nous attribuons ce fait à ce que la coloration du mélange tannin et sel de fer constitue une

véritable coloration d'indicateur de pH.

II. — Etalonnage par rapport à l'acide géraniatannique.

REMARQUES PRÉLIMINAIRES.

1) En tout état de cause les courbes étalon établies à l'aide d'acide tannique ordinaire ne peuvent servir de références que pour des évaluations d'acide tannique ordinaire dans des végétaux qui en renferment; en effet il est hautement probable (et en particulier dans notre cas) que la constitution et le poids moléculaire des différents tanins sont différents et qu'en conséquence la correspondance qu'on veut établir entre l'acide tannique et l'acide géraniatannique est très arbitraire. En toute rigueur on doit donc établir des courbes étalon pour le dosage de l'acide géraniatannique à partir de cet acide, c'est pourquoi nous l'avons extrait du P. zonale.

2) Si l'on essaie de définir un rapport quelconque entre les courbes étalons de nos techniques volumétriques et photométriques obtenues avec l'acide tannique ordinaire, on s'aperçoit qu'aucune correspondance rationnelle satisfaisante ne peut être mise en évidence. Ceci tient au fait qu'en définitive la technique photométrique est grossiè-

re; c'est pourquoi:

a) les autres techniques photométriques de dosage des tannins, comme celles de Mitchell [7, 8], de Rosenblatt et Peluso [9], qui utilisent des réactifs différents des nôtres ne sont pas autrement sa-

b) nous donnons la préférence à la technique volumétrique. La tisfaisantes : courbe étalon obtenue avec l'acide géraniatannique sera donc une courbe étalon volumétrique; comme de plus, nous avons surtout travaille à pH 5 (voir plus loin) nous ne donnerons que la courbe correspondant à pH 5,0.

A) Extraction de l'acide géraniatannique.

Après lavage à l'eau de conduite et essorage sur papier filtre, on porte des tiges de P. zonale débarrassées des pétioles et des feuilles à

(*) L'adjonction d'HCl au mélange coloré d'acide tannique et d'alun provoque l'apparition d'un « nuage » de décoloration ; un opérateur exercé peut facilement apprécier le moment où, après agitation, l'adjonction d'acide ne produit plus ce nuage et où par conséquent la décoloration peut être considérée comme terminée. considérée comme terminée.

la dessiccation à 100° C pendant quelques heures. (On favorise cette opération en découpant les tiges en fragments de 2 cm. de long). On pulvérise ensuite au mortier ou mieux au Latapie. On place 1 partie de poudre en présence de 4 parties d'une solution renfermant :

75 g. d'éther sulfurique, 10 g. d'éthanol à 96°, 3 g. d'eau bidistillée.

On laisse en contact une nuit à la température du laboratoire et on épuise à chaud pendant 2-3 heures. On filtre et on évapore à 50° C. On épuise de nouveau à l'éther, filtre sur Chardin et évapore dans le vide phosphorique. On obtient après 10 jours une masse amorphe brunâtre possédant une odeur prononcée (N : 3-3,25 p. 100). On purifie en reprenant par l'eau distillée bouillante; dans ces conditions il se forme des grumeaux noirâtres, goudronneux. On filtre et on laisse reposer une nuit à 4° C (le milieu s'opacifie rapidement) après quoi

on centrifuge et évapore le surnageant à 50° C.

Le produit brun obtenu ressemblant à un vernis ne renferme pas d'azote mais il possède encore la même odeur que le produit non purifié (nous avons fait quelques essais de distillation mais le produit obtenu présentait encore cette odeur). Il donne évidemment une réaction bleue avec les sels de fer et une réaction de Molisch (hexoses) positive; il réduit la liqueur de Fehling et le permanganate de potassium. Les solutions concentrées sont opalescentes surtout à basse température. Nous ne pouvons affirmer que notre produit est pur, c'est pourquoi la courbe étalon n'est donnée que sous certaines réserves (*).

B) Etalonnage.

Nous avons opéré par volumétrie comme dans le cas de l'acide tannique ordinaire. La courbe 4 (Courbe III) constitue l'étalon à pH 5,0. On remarquera le coefficient angulaire plus grand que celui des courbes d'étalonnage de l'acide tannique ordinaire.

APPLICATIONS.

EXTRACTIONS DES TANINS DU P. zonale ET DOSAGES.

1) Extraction à l'eau à partir de tissus frais.

Pour ne pas être gênes par les différences de pH des sucs sains et tumoraux (pour Pzt extrait par l'eau bidistillée — 1 partie de matériel végétal pour 10 parties de solvant —, pH : 6,25; pour PzO dans les mêmes conditions, pH : 4,50) (**), nous avons effectué les extractions par broyage des tissus en présence d'un tampon boraté à pH 7,8.

(*) La coloration de notre produit laissant présumer une oxydation, nous avons réalisé quelques essais d'extraction par voie anhydre (par l'acétone) mais par évaporation du solvant on obtenait encore une masse colorée.

(**) Nous emploierons au cours de cet exposé la notation suivante:

Pzt = P. zonale tumoral (tumeurs de 3-5 mois non nécrosées obtenues par inoculations de Phytomonas (Bacterium) tumefaciens variété « 42/4 »).

PzO = P. zonale sain (tige totale).

Pzc = P. zonale parties connexes aux tumeurs. Pzj = P. zonale sain, jeune (entrenœuds d'élongation). = P. zonale sain âgé (entrenœuds près du collet).

BULL. STÉ. CHIM. BIOL., 1949, 31, N°5 5-6.

Protocole d'une expér. broyés au mortier pendai avec du sable de Fontais Nous avons effectué des diqué ci-dessus. On a tr l'extrait de Pzt et 68,5 p d'orientation confirmant

2) Extractio

SEMI-MICRO

On a dějà considéré l' en tanins serăit proporti teux (1); or les résultats pas de noter de différer deux sucs considérés. De tives aux sels de fer, le nous avons alors pensé (à l'eau pour les extractio flux. Il était vraisemblat tanins devait être plus co totale de protéines.

Protocole d'une expéri broyés au mortier en pré d'acétone « pure » (Prol. dans un appareil rodé à dont une partie sert au l à l'ébullition pendant un un courant d'eau et on p tions les pulpes ne donn fer. On ramène le volume 1/2 volume d'eau bidisti. de distillation ne sente p distillat).

Les extraits sont alors t pour Pzj, 3,50; pour Pza extraits par NaOH N/5 ap distillée. On prélève 50 50 ml d'acétone « pure » selon la technique volume

> Pzj.... Pza ...

Pzt

On voit que les valeurs

3) Extractions de poi Ces résultats sur tissus les poids auxquels on ram BULL. STÉ. CHIM. BIOL., 1949, 3 heures. (On favorise cette nts de 2 cm. de long). On Latapie. On place 1 partie solution renfermant:

ature du laboratoire et on re et on évapore à 50° C. hardin et évapore dans le jours une masse amorphe I: 3-3,25 p. 100). On purite; dans ces conditions il leux. On filtre et on laisse ie rapidement) après quoi 1° C.

n vernis ne renferme pas ur que le produit non puistillation mais le produit onne évidemment une rééaction de Molisch (hexong et le permanganate de palescentes surtout à basse notre produit est pur, c'est sous certaines réserves (*).

ne dans le cas de l'acide III) constitue l'étalon à laire plus grand que celui ne ordinaire.

nale ET DOSAGES.

'e tissus frais.

ces de pH des sucs sains istillée — 1 partie de ma-—, pH : 6,25; pour PzO), nous avons effectué les sence d'un tampon boraté

ésumer une oxydation, nous voie anhydre (par l'acétone) encore une masse colorée, sé la notation suivante : nois non nécrosées obtenues amefaciens variété « 42/4 »).

irs. élongation). lu collet). Protocole d'une expérience. — 5,510 g. de tissu (PzO et Pzt) sont broyés au mortier pendant 25 minutes en présence de 10 ml de tampon avec du sable de Fontainebleau, on centrifuge et on ramène à 20 ml. Nous avons effectué des mesures photométriques comme il a été indiqué ci-dessus. On a trouvé (en lumière rouge) : 70 divisions pour l'extrait de Pzt et 68,5 pour l'extrait de PzO. Il s'agit là d'un dosage d'orientation confirmant les résultats rapportés précédemment (1).

2) Extraction des tissus frais par l'acétone.

On a déjà considéré l'argument anatomique selon lequel la teneur en tanins serait proportionnelle à la quantité de tissus parenchymateux (1); or les résultats que nous venons de rapporter ne permettent pas de noter de différences sensibles dans la teneur en tanins des deux sucs considérés. De plus les pulpes de broyage sont encore positives aux sels de fer, le procédé d'extraction est donc insuffisant et nous avons alors pensé qu'il serait préférable de substituer l'acétone à l'eau pour les extractions et d'effectuer celles-ci par chauffage à reflux. Il était vraisemblable que dans ces conditions l'extraction des tanins devait être plus complète et nous étions assurés d'une absence totale de protéines.

Protocole d'une expérience. — 7,730 g. de Pzt et de PzO sont broyés au mortier en présence de sable de Fontainebleau et de 20 ml d'acétone « pure » (Prolabo); le tout est transvasé soigneusement dans un appareil rodé à reflux; on ajoute 80 ml d'acétone « pure » dont une partie sert au lavage du mortier et on effectue l'extraction à l'ébullition pendant une heure puis on refroidit rapidement sous un courant d'eau et on passe sur un filtre Laurent. Dans ces conditions les pulpes ne donnent plus qu'une légère réaction aux sels de fer. On ramène le volume des extraits à 200 ml par l'acétone, on ajoute 1/2 volume d'eau bidistillée et on distille jusqu'à ce que le liquide de distillation ne sente plus l'acétone (on se guide sur le volume du distillat).

Les extraits sont alors troubles et leur pH est: pour Pzt, 4,21-4,38; pour Pzj, 3,50; pour Pza, 2,75. On amène alors à pH 4,90 tous ces extraits par NaOH N/5 après avoir ramené à 200 ml avec de l'eau bidistillée. On prélève 50 ml de ce milieu trouble et on lui adjoint 50 ml d'acétone « pure », ce qui clarifie le milieu; on dose alors selon la technique volumétrique. Le Tableau I indique nos résultats.

TABLEAU I.

| Pzj | | 800,0 | p. 100 |
|-----|-----|-------|--------|
| Pza | 2.5 | | p. 100 |
| Pzt | | 0,010 | p. 100 |

On voit que les valeurs obtenues sont encore pratiquement identiques.

3) Extractions de poudres de tissus par l'acétone et dosage.

Ces résultats sur tissus frais pouvaient être faussés par le fait que les poids auxquels on ramenait les valeurs en tanins étaient des poids BULL. STÉ. CHIM. BIOL., 1949, 31, N° 5-6.

TA

TECHNIQU

Teneui Pourcentage gérania direct exprimé Nature (par con en acide tannique courbes de la solution de la extractive déduite d'acide poudre des courbes étalons des di (a) 0,044 Pza .. 0,050 Pzj...

0,10

0,090

Pzt...

Pzc...

(*) En mg. pour 0,2 mg. de]

TECHNIQU

| Nature de la poudre | Pourcentage direct exprimé en acide tannique de la solution extractive déduit des courbes étalor |
|---------------------------|---|
| | (a) . |
| Pza Pzj Pzt Pzc | 0,057 0,060 0,067 0,062 |

b) Avec acétone 70 p. 100 -

On vient de voir que la di par conséquent une cause d'e plifié le dosage en supprima cherché à voir si, en augmen tion était meilleure. Nous avo qui est celle utilisée par BAW. tanins du Fraisier [11]. Souli encore incomplète dans ces duites comme nous l'avons (

BULL. STÉ. CHIM. BIOL., 1949, 31, 1

de tissus hétérogènes. Cependant les résultats de Gosset, Tchakirian et Magrou [10] sur la teneur en eau des tissus sains et tumoraux (crown-gall de P. zonale) donnent des chiffres pratiquement identiques par rapport au poids. Pour obtenir des résultats réellement comparables entre eux, nous avons pensé détruire les divers tissus à analyser par séchage et pulvérisation, ce qui permettait d'établir une unité pondérale le plus indépendant possible de l'anatomie.

Protocole d'une expérience. — Des fragments de Pza et de Pzt sont desséchés à 100° C pendant 24 h. puis broyés au mortier ou au Latapie; 0,5 g. de poudre de chacun des tissus sont introduits dans un extracteur à reflux et mis en présence de 100 ml d'acétone « pure». L'extraction est faite comme précédemment pendant 1 h. On procède ensuite comme il a été dit plus haut. Il est à remarquer que la réaction aux sels de fer effectuée sur le résidu et après filtration est beaucoup plus nette que dans le cas précédent. Le Tableau II indique nos résultats.

TABLEAU II.

| 2 4, | Technique volumétrique | Technique photométrique (écran vert) |
|------|------------------------------|--|
| Pza | 0,012 p. 100 0,024 p. 100 | 0,024 p. 100 0,024 p. 100 |

N. B. — Les résultats obtenus par la technique photométrique sont dus au fait que, pour des concentrations en tanins de cet ordre, nous nous trouvons dans la limite de sensibilité de l'appareil de Meunier. L'extraction incomplète par l'acétone « pure » des tanins contenus

dans les poudres nous a amenés à modifier le liquide d'extraction en lui ajoutant de l'eau.

- 4) Extractions des pondres par l'acétone $+ H_2O$ et dosage.
- a) Avec acétone 50 p. $100 + H_2O$ bidistillée 50 p. 100.

0,2 g. de poudre sont additionnés de 25 ml d'acétone « pure » + 25 ml d'eau bidistillée. Puis on procède comme il a été indiqué ; dans ces conditions la réaction aux sels de fer des pulpes après filtration est bien plus faible que précédemment, c'est donc la présence d'eau qui favorise l'extraction. Les liquides d'extraction sont ramenés à 100 ml par l'acétone « pure », puis on distille jusqu'à ce que le distillat ne sente plus l'acetone. Cette manipulation a été effectuée dans le but de ramener les extraits au même pH; les pH de ces distillats étaient respectivement pour PzO; 5,05; Pzj: 4,45 et Pzc: 4,95. On remarquera que les différences entre ces pH n'ont pratiquement aucune importance en ce qui concerne les dosages volumétriques (Cf. courbes III). Le Tableau III indique nos résultats.

de Gosset, Tchakirian issus sains et tumoraux pratiquement identiques ultats réellement compales divers tissus à anapermettait d'établir une le de l'anatomie.

ments de Pza et de Pzt broyés au mortier ou au ssus sont introduits dans le 100 ml d'acétone « pumment pendant 1 h. On it. Il est à remarquer que résidu et après filtration précédent. Le Tableau II

| | Technique photométrique (écran vert) |
|---|--|
| _ | 0,024 p. 100 |
| | 0,024 p. 100 |

hnique photométrique sont 1 tanins de cet ordre, nous de l'appareil de Meunier. pure » des tanins contenus r le liquide d'extraction en

one + H_2O et dosage.

tillée 50 p. 100.

5 ml d'acétone « pure » + mme il a été indiqué ; dans des pulpes après filtration 'est donc la présence d'eau traction sont ramenés à 100 e jusqu'à ce que le distillat 1 a été effectuée dans le but pH de ces distillats étaient 45 et Pzc : 4,95. On remarn'ont pratiquement aucune s volumétriques (Cf. courbes

TABLEAU III. TECHNIQUE VOLUMÉTRIQUE.

| de la | Pourcentage direct exprimé en acide taunique de la solution extractive déduite des courbes étalons (a) | Teneur totale en acide géraniatannique (par comparaison avcc les courbes étalons d'acide tannique en tenant compte des dilutions) (b) **) | Pourcentage d'acide géraniatannique déduit de b) | Pourcentage d'acide géraniatannique rapporté à la courbe étalon acide géraniatannique (d) |
|--------------------------|--|---|---|---|
| Pza Pzj Pzt Pzc | 0,050 | 17,6 20 40 36 | 8,8 10 20 18 | 5,1 10 9,2 |

TABLEAU III. TECHNIQUE PHOTOMÉTRIQUE. (écran vert).

| Nature de la poudre | Pourcentage direct exprimé en acide tannique de la solution extractive déduite des courbes étalons | Teneur totale en acide géraniatannique (par comparaison avec les courbes étalons d'acide tannique en tenant compte des dilutious) en mg. pour 0,2 g. de poudre | Pourcentage d'acide géraniatannique déduit de (b) (c) |
|---------------------------|---|---|--|
| Pza Pzj Pzt Pzt | 0,057 | 22,8 | 11,4 |
| | 0,060 | 24 | 12 |
| | 0,067 | 26,8 | 13,4 |
| | 0,062 | 24,8 | 12,4 |

b) Avec acétone 70 p. 100 + H_2O bidistillée 30 p. 100.

On vient de voir que la distillation était une opération superflue, par conséquent une cause d'erreurs supplémentaires. Nous avons simplifié le dosage en supprimant la distillation; de plus nous avons cherché à voir si, en augmentant le pourcentage d'acétone, l'extraction était meilleure. Nous avons choisi la concentration de 70 p. 100 qui est celle utilisée par Bawden et Kleczowski pour l'extraction des tanins du Fraisier [11]. Soulignons, des à présent, que l'extraction est encore incomplète dans ces conditions. Les opérations ont été conduites comme nous l'avons déjà dit et les dosages pratiqués immé-

diatement après extraction et refroidissement. Les résultats ci-dessous (Tableau IV) montrent que les valeurs obtenues sont pratiquement égales à celles obtenues par extraction à l'acétone 50 p. 100 $^{+}$ H $_{2}$ O 50 p. 100 suivie de distillation.

TABLEAU IV. TECHNIQUE VOLUMÉTRIQUE.

| Nature de la poudre | Pourcentage direct exprimé en acide tannique de la solution extractive déduite des courbes étalons | Teneur totale en acide géraniatannique (par comparaison avec les courbes étalons d'acide tannique en tenant compte des dilutions (h en mg. pour 0,2 g. de poudre | Pourcentage d'acide géraniatannique déduit de (b) |
|---------------------------|---|---|---|
| Pza | 0,050 | 20 | 10 |
| | 0,053 | 21,2 | 10,6 |
| | 0,091 | 36,4 | 18,2 |
| | 0,090 | 36 | 18. |

TABLEAU IV. TECHNIQUE PHOTOMÉTRIQUE. (écran vert).

| Nature de la poudre | Pourcentage direct exprimé en acide tannique de la solution extractive déduite des courbes étalons | Teneur totale en acide géraniatannique (par comparaison avec les courbes étalons d'acide tannique en tenant compte des dilutions (b) | Pourcentage d'acide géraniatannique déduit de (b) |
|---------------------------|---|---|---|
| | (a) | en mg. pour 0,2 g. de poudre | (c) |
| Pza Pzj Pzt Pzc | 0,060 0,061 0,065 0,060 | 24 24 26 24 | 12 12,2 13 12 |

Remarque. — Quel que soit le procédé d'extraction utilisé, le raptanins totaux est toujours supérieur dans les tumeurs, poids humide ou sec or la masse de cellules vivantes est très différente dans les tissus sains et les tissus tumoraux ; nous avons alors cherché à évaluer le rapport tanins totaux azote total

BULL. STÉ. CHIM. BIOL., 1949, 31, N° 5-6.

Cette étude a porté sur par micro-Kjeldahl. Elle a (

| Nature de la poudre | N total (*) |
|---------------------------|-------------|
| Pzj | 15,8 p. 100 |
| Pza | 9,3 p. 100 |
| Pzc , | 7,4 p. 100 |
| Pzt | 15,2 p. 100 |

(*) Moyennes de 5 à 7 dosa (**) Valeurs de la technique v tions des poudres par acétone (section c Tableau III). (***) Mêmes valeurs que dans é:alon d'acide géraniatannique

D

Nous remarquerons en prei par les techniques volumétriq différences. Ces différences son ficient angulaire de la courbe la courbe photométrique) et d' ques sont en réalité très différe ce texte que la coloration tanin indicateur de pH; par contre l dépendante du pH initial étai sont constatées pour des pH in

Insistons sur le fait que les ployons pour l'extraction des extractions totales : une faible reste fixée aux pulpes et échap nous avons données ne sont doi quera toutefois qu'elles sont to donné que les tanins paraissent pourrait penser à réaliser un t protéolytiques.

L'examen de nos résultats noi de valeur tout à fait générale d par Allison et Hoover [12], BE

sement. Les résultats ci-dessous 's obtenues sont pratiquement $_{1}$ à l'acétone 50 p. 100 + $\mathrm{H}_{2}\mathrm{O}$

1ÉTRIQUE.

| totale en acide niatannique comparaison les courbes ons d'acide que en tenant des dilutions (b. | Pourcentage d'acide géraniatannique déduit de (b) | |
|--|---|--|
| r. de poudre | · (c) | |
| 20 21,2 36,4 36 | 10 10,6 18,2 18 | |

OMÉTRIQUE. et).

| totale en acide niatannique comparaison les courbes ons d'acide que en tenant des dilutions | Pourcentage d'acide géraniatannique déduit de (b) | |
|---|---|--|
| mg. pour g. de poudre | (e) | |
| 24 24 26 24 | 12 12,2 13 12 | |

édé d'extraction utilisé, le rapours supérieur dans les tumeurs, s différente dans les tissus sains ors cherché à évaluer le rapport

Cette étude a porté sur les poudres broyées et a été effectuée par micro-Kjeldahl. Elle a donné les résultats suivants (Tableau V).

TABLEAU V.

| Nature de la poudre | N total (*) | Rapport p. 400 tanins totaux azote total (**) | Rapport p. 100 tanins totaux azote total |
|---------------------------|-------------|---|--|
| D-i | 15,8 p. 100 | 10 - 0.63 | $\frac{5,1}{15,8}=0,32$ |
| Pzj | 10,0 p. 100 | $\frac{10}{15,8} = 0,63$ | |
| Pza | 9,3 p. 100 | $\frac{8,8}{9,3} = 0,94$ | $\frac{4}{9,3} = 0,43$ |
| Pzc , | 7,4 p. 100 | $\frac{18,0}{7,4} = 2,43$ | $\frac{9,2}{7,4}=1,24$ |
| Pzt | 15,2 p. 100 | $\frac{20}{15,2} = 1,31$ | $\frac{10}{15,2} = 0,65$ |

(*) Moyennes de 5 à 7 dosages.

(**) Valeurs de la technique volumétrique obtenues à partir des extractions des poudres par acétone 50 p. 100 + H20 bidistillée 50 p. 100 (section c Tableau III).

(***) Mêmes valeurs que dans la note (**) mais rapportées à la courbe étalon d'acide géraniatannique (section d).

DISCUSSION.

Nous remarquerons en premier lieu que les étalonnages obtenus par les techniques volumétriques et colorimétriques présentent des différences. Ces différences sont d'une part liées à la sensibilité (coefficient angulaire de la courbe volumétrique plus grand que celui de la courbe photométrique) et d'autre part au fait que les deux techniques sont en réalité très différentes ; nous avons montré en effet dans ce texte que la coloration tanins-fer pouvait être considérée comme un indicateur de pH; par contre la technique par décoloration est moins dépendante du pH initial étant donné que toutes les décolorations sont constatées pour des pH inférieurs à 1.

Insistons sur le fait que les différentes techniques que nous employons pour l'extraction des tanins ne nous ont pas permis des extractions totales : une faible quantité, d'ailleurs variable, de tanins reste fixée aux pulpes et échappe ainsi aux dosages. Les valeurs que nous avons données ne sont donc pas des valeurs absolues, on remarquera toutefois qu'elles sont toujours comparables entre elles. Etant donné que les tanins paraissent surtout adsorbés sur les protéines, on pourrait penser à réaliser un traitement préalable par des enzymes protéolytiques.

L'examen de nos résultats nous a conduits à insister sur une règle de valeur tout à fait générale dont la nécessité avait déjà été perçue par Allison et Hoover [12], Beremblum, Chain et Heatley [13] dans

d'autres cas. C'est ainsi que si l'on considère le pourcentage de tanins par rapport au poids sec pulvérulent des différents tissus, on remarque que les tumeurs renferment le plus de tanins et que les tissus sains connexes aux tumeurs en renferment moins. Chimiquement on concoit qu'il en soit ainsi puisque les tumeurs sont constituées en majeure partie par un parenchyme et que les tanins paraissent localisés surtout dans les vacuoles des cellules de ce tissu (signalons toutefois que la zone cambiale des tiges saines présente très souvent un noircissement après section au scalpel en fer), mais physiologiquement il en va autrement.

Lorsque nous définissons la quantité de tanins non plus par rapport à la valeur pondérale, qui est une valeur globale, mais par rapport à une autre coordonnée : azote total ou aminé, phosphore total ou autre, etc..., on définit les tanins physiologiquement. Ainsi comme

on l'a vu, quand on établit le rapport tanins totaux , on constate que les tumeurs ont un indice beaucoup plus petit que celui des tissus sains connexes. Etant donné que le poids d'azote total rend compte de la quantité de substances nutritives et vivantes, les indices montrent que les cellules tumorales possèdent métaboliquement moins de tanins que les tissus sains connexes.

En conclusion il ne suffit pas en biochimie de définir chimiquement un tissu mais il faut encore l'e définir physiologiquement : les dosages doivent être conduits tant par rapport au poids total que par rapport à certaines substances qui auront été choisies comme étant les plus significatives ; ainsi se constitue la notion d'indice physiochimique. Si on effectue un dosage sans tenir compte de ces indices et ceci particulièrement en technique cancérologique —, on établit des comparaisons entre des tissus qui en réalité ne sont nullement comparables étant donné leurs différences anatomiques et métaboliques.

RÉSUMÉ.

- 1) Deux nouvelles techniques de dosage des tanins galliques ont été mises au point. L'une, photométrique, utilise la coloration bleue produite par ces tanins et l'alun de fer et d'ammonium, coloration dont l'intensité est fonction de la concentration en tanins. On établit des courbes étalons avec de l'acide tannique ordinaire (sensibilité 120 à 140 y). L'autre, volumétrique, est fondée sur la décoloration par acidification de la couleur bleue utilisée dans la technique photométrique. On établit également un étalonnage avec l'acide tannique ordinaire et l'acide géraniatannique dont on donne la technique d'extraction à partir de P. zonale (sensibilité 40 γ).
- 2) Ces techniques nous ont permis d'évaluer l'acide géraniatannique du Pelargonium zonale sain et tumoral (Crown gall). Différentes extractions de cet acide ont été examinées : a) par tampon boraté, b) par diffusion à chaud (à reflux) par l'acétone à partir de tissus frais, c) par diffusion à chaud par l'acétone à partir de tissus séchés et pulvérisés, d) par diffusion par un mélange acétone + eau (pro-

portions variables) à partir totale dans ces conditions.

Si on rapporte la quantitissus, on trouve que c'est la posé, mais si on rapporte la total (qui rend compte de l'e ces fondamentales cellulaires nexes à la tumeur qui ont l'

3) On discute certains poin dicas physiochimiques qui se figurer un dosage biochimiqu

BIF

- 1. Rybak (B.). Ann. Inst. P
 2. Hirth (L.) et Rybak (B.). —
 3. Handtke (R.). J. prakt.
 4. Wildenstein (R.). Ztschr
 5. Rae (J.). Pharm. J., 193(
 6. Gillot (P.), Cordebard (H.)
 41, 137.
 7. Mitchell (C. A.). Analyst
 8. Mitchell (C. A.). Analyst
 9. Rosenblatt (M.) et Peluso
 24, 170.
- 24, 170. 10. Gosset (A.), Tchakirian (A. 208, 474.
- 11. BAWDEN (F. C.) et KLECZOW 21, 1-7.
- 12. ALLISON et HOOVER (S. R.). soil Sc., 1939, vol. A, 32. 13. BEREMBLUM (I.), CHAIN (E)
- 33, 68.

re le pourcentage de tanins. différents tissus, on remarle tanins et que les tissus t moins. Chimiquement on meurs sont constituées en les tanins paraissent locade ce tissu (signalons tous présente très souvent un fer), mais physiologique-

tanins non plus par rapleur globale, mais par rapou aminé, phosphore total ologiquement. Ainsi comme ns totaux ote total, on constate que petit que celui des tissus d'azote total rend compte vivantes, les indices monmétaboliquement moins de

umie de définir chimiqueir physiologiquement : les port au poids total que par été choisies comme étant la notion d'indice physioenir compte de ces indices cancérologique -, on étai en réalité ne sont nulleences anatomiques et méta-

e des tanins galliques ont utilise la coloration bleue et d'ammonium, coloration ation en tanins. On établit e ordinaire (sensibilité 120 sur la décoloration par acis la technique photométriivec l'acide tannique ordionne la technique d'extrac-

uer l'acide géraniatannique rown gall). Différentes ex-: a) par tampon boraté, acétone à partir de tissus e à partir de tissus séchés ange acétone + eau (proportions variables) à partir de poudres. L'extraction n'a jamais été totale dans ces conditions.

Si on rapporte la quantité d'acide géraniatannique au poids de tissus, on trouve que c'est la tumeur qui renferme le plus de ce composé, mais si on rapporte la quantité d'acide géraniatannique à l'azote total (qui rend compte de l'ensemble : substances nutritives - substances fondamentales cellulaires), on trouve que ce sont les tissus connexes à la tumeur qui ont l'indice le plus élevé.

3) On discute certains points et on met en évidence la notion d'indices physiochimiques qui se dégagent des coordonnées choisies pour figurer un dosage biochimique.

BIBLIOGRAPHIE.

- 1. Rybak (B.). Ann. Inst. Pasteur, 1948, 75, 351.
 2. Hirth (L.) et Rybak (B.). Rev. gén. Bot. (sous presse).
 3. Handtke (R.). J. prakt. Chem., 1861, 82, 345.
 4. Wildenstein (R.). Ztschr. f. anal. Chem., 1863, 2, 137.
 5. Rae (J.). Pharm. J., 1930, 125, 451
 6. Gillot (P.), Cordebard (H.) et Turcakov (Y.). Bull. Sc. Pharm., 1934,
- 41, 137.

 7. MITCHELL (C. A.). Analyst, 1923, 48, 2.

 8. MITCHELL (C. A.). Analyst, 1924, 49, 162.

 9. ROSENBLATT (M.) et PELUSO (J. V.). J. Ass. off. agric. chem., 1941,
- 10. GOSSET (A.), TCHAKIRIAN (A.) et MAGROU (J.). C. R. Acad. Sci., 1939, 208, 474.

- 208, 474.

 11. BAWDEN (F. C.) et KLECZOWSKI (A.). J. Pomol. et Hort. Sc., 1945, 21, 1-7.

 12. ALLISON et HOOVER (S. R.). Trans. third Commission Inter. Soc. of soil Sc., 1939, vol. A, 32.

 13. BEREMBLUM (I.), CHAIN (E.) et HEATLEY (N. B.). Biochem. J., 1939, 23, 68