

AMELIORATION DE LA METHODE D'ANALYSE CHIMIQUE DE L'ACIDE -1- MALONYLAMINOCYCLOPROPANE -1- CARBOXYLIQUE (MACC) DANS UN EXTRAIT BRUT DE FEUILLES DE BLE

BENICHOU, M.,* EL MOURID, M.**
et EL BOUSTANI, E.*

INTRODUCTION

L'acide -1- Aminocyclopropane-1- Carboxylique (ACC) est le précurseur immédiat de l'éthylène au niveau de tous les tissus végétaux (ADAMS et COLL. 1979) . L'ACC peut être aussi converti en sa forme N-Malonyl conjuguée, le MACC (HOFFMAN et COLL. 1982) . Une méthode simple et sensible pour déterminer l'ACC a été décrite par LIZADA et YANG (1979). Cette technique a été largement utilisée par d'autres auteurs pour déterminer le niveau de l'ACC dans les tissus végétaux (Mc KEON et COLL. 1982), évaluer l'activité des enzymes catalysant la production de l'ACC (YU et COLL. 1979) ou de sa forme conjuguée, le MACC (KIONKA et COLL. 1984) et de déterminer la quantité de MACC dans un tissu ou organe végétal donné (HADAS et COLL. 1985, LIU et COLL. 1985) . Pour des études de routine, il serait judicieux d'appliquer la réaction chimique "ACC --> C2 H4" directement dans l'extrait brut sans purification préalable . Cependant, différents constituants de l'extrait pourraient interférer avec cette réaction entraînant ainsi une mauvaise estimation des teneurs en ACC ou en MACC . Dans ce travail, nous allons tester quelques paramètres qui pourraient influencer le rendement de cette réaction et qui sont le

* Laboratoire de Biochimie, Département de Biologie, Faculté des Sciences, BP S15 Marrakech, MAROC.

** Département d'Agronomie, Centre d'Aridoculture, INRA, Settat, MAROC.

temps d'incubation, le catalyseur $HgCl_2$ et le réactif $NaOCl$. Ces facteurs seront testés d'une part sur l'ACC standard et d'autre part sur l'ACC et le MACC extraits à partir des feuilles de blé.

MATERIEL ET METHODES

Préparation de l'Extrait Brut

L'extrait est réalisé sur un gramme de feuilles de blé en poids frais. Les feuilles sont excisées et broyées dans 10 ml d'éthanol à 80% (V/V). Après 3 heures d'incubation à 70°C, nous centrifugeons à 10 000g pendant 15 min.

Le surnageant est évaporé, à sec, à 40°C sous vide. Le résidu obtenu est remis en solution dans 4ml d'eau distillée et 2ml de chloroforme. La solution aqueuse obtenue contient l'ACC et le MACC (Amrhein et Coll. 1981, Hoffman et Coll. 1983). Le rendement de l'extraction ainsi réalisée est estimé à 87%.

Méthodes de Dosage de l'ACC et du MACC

Ces méthodes sont indirectes et consistent à transformer le MACC en ACC puis ce dernier en éthylène. L'éthylène est dosé par chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme. La conversion du MACC en ACC est effectuée par hydrolyse acide (HCl 2N) à 100°C pendant 4 heures suivie d'une neutralisation par $NaOH$ (Satoh et Coll. 1984). La conversion de l'ACC en éthylène est réalisée suivant la méthode de LIZADA et YANG 1979 modifiée au niveau de la concentration d' $HgCl_2$ et $NaOCl$ et au niveau du temps d'incubation.

Les teneurs des extraits en ACC et en MACC sont déterminées directement à partir d'une gamme étalon avec ACC standard. La quantité d'éthylène produite est déterminée par rapport à des étalons d'éthylène. Pour chaque cas étudié, trois répétitions sont effectuées.

RESULTATS

Détermination du Temps de la Réaction Chimique ACC--> C₂H₄

Conversion de l'ACC standard. Pour des concentrations fixes en ACC standard (une nanomole) et en $NaOCl$ (2,5%), l'utilisation de concentrations variables en $HgCl_2$ (10, 50, et 100mM) ne semble pas changer la cinétique de la réaction chimique ACC --> C₂H₄. En effet, dans ces conditions, la conversion maximale est atteinte à partir de 50 min. (Fig. 1). De même façon, l'hypochlorite de sodium testé au taux de 2,5%, 5% et 7,5% ne modifie pas la cinétique de la réaction dont le maximum de conversion est atteint à partir de 50 min. L'augmentation de la concentration en substrat à 10 puis à 100 n Moles d'ACC standard, ne modifie en rien le temps d'incubation permettant la conversion maximale de l'ACC en éthylène. Dans les différents cas étudiés ici, la réaction

chimique reste stable plus de 24 heures d'incubation dans la glace fondante .

Conversion de l'ACC et du MACC dans l'extrait . Contrairement à la réaction chimique avec l'ACC standard, la conversion de l'ACC en éthylène dans l'extrait brut est plus lente . Le maximum de transformation est détecté à partir de 4 heures d'incubation et reste stable 48 heures après (Fig. 2) . L'hydrolyse du MACC en ACC et la conversion de ce dernier en éthylène suit une cinétique similaire à celle obtenue précédemment (Fig. 3) . Aussi, dans ce cas, ni l'augmentation de la concentration en catalyseur ni celle de l'hypochlorite de sodium ne modifient la cinétique de ces réactions .

Amélioration du rendement de la conversion de l'ACC en éthylène . Pour différentes concentrations en ACC standard et quelle que soit la concentration testée en HgCl₂ et NaOCl, le rendement de la réaction de conversion reste sensiblement le même . Par contre, dans le cas des extraits bruts, l'augmentation aussi bien d'HgCl₂ que du NaOCl semblent améliorer largement le rendement de conversion ACC --> C₂H₄ . Cette influence devient spectaculaire avec des volumes d'extraits relativement importants (>0,1 ml) . En effet, l'augmentation de la concentration en HgCl₂ de 10 mM à 50mM améliore la conversion de l'ACC en éthylène de 30% (Fig. 4) et celle du MACC de 50% (Fig. 5) . La concentration 100mM en HgCl₂ ne semble pas améliorer le rendement de cette réaction . L'augmentation de la concentration en NaOCl à 5% ou à 7,5% implique une amélioration respective de la teneur en ACC d'environ 40% et 65% (Fig. 6) . Des améliorations semblables ont été obtenues dans le cas du MACC (Fig. 7) .

DISCUSSION

Comme le montrent nos résultats, le temps d'incubation de la réaction chimique ACC--> éthylène est indépendant des concentrations en catalyseur HgCl₂ et en NaOCl . Les temps de réaction obtenus, aussi bien pour la conversion de l'ACC standard (50 min.) que pour celle de l'ACC dans l'extrait brut (4 heures), diffèrent complètement de ceux obtenus par Lizada et Yang 1979. Ces auteurs suggèrent que la réaction chimique avec l'ACC standard devient complète à partir d'une minute d'incubation et reste stable jusqu'à 60 min. et que la réaction avec l'ACC dans l'extrait brut de l'avocat montre une réduction après 15 min. d'incubation . Par ailleurs, la réaction chimique ACC --> C₂H₄ sous estime les teneurs en ACC ou en MACC d'un extrait brut lorsqu'on travaille avec des concentrations faibles en HgCl₂ et NaOCl . Cette sous estimation des essais est plus nette avec des quantités relativement importantes d'extrait sans lesquelles les seuils de détection restent difficiles à atteindre . Ceci est dû aux faibles teneurs en ACC et en MACC dans les différents tissus végétaux . La diminution du rendement de la réaction avec les faibles quantités d'HgCl₂ et de NaOCl pourraient s'expliquer par l'interférence de ces agents chimiques avec les constituants de l'extrait ou probablement l'interférence de ces derniers avec l'ACC ou le MACC . En effet, Coleman en 1984 et Means et Coll. en 1971 ont montré que la baisse du rendement avec les faibles concentrations en HgCl₂ serait due à l'action des protéines de l'extrait . Cette action des protéines pourrait expliquer, en partie, l'amélioration nette (50%) que nous avons

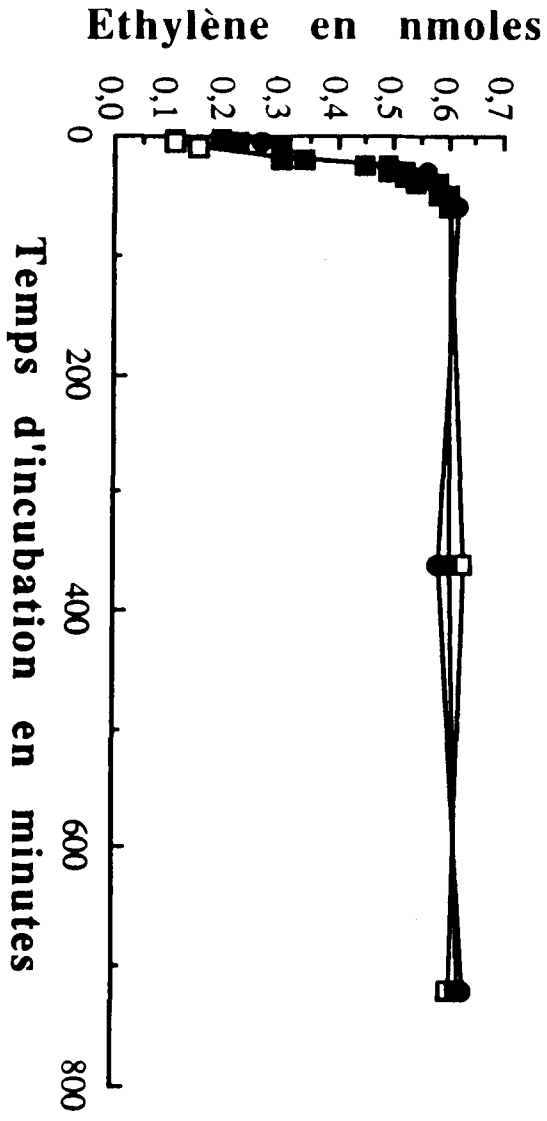


Figure 1 : Cinétique de conversion de l'ACC standard en éthylène en présence de:
 10 (□), 50 (●) et 100 (■) mM HgCL₂.

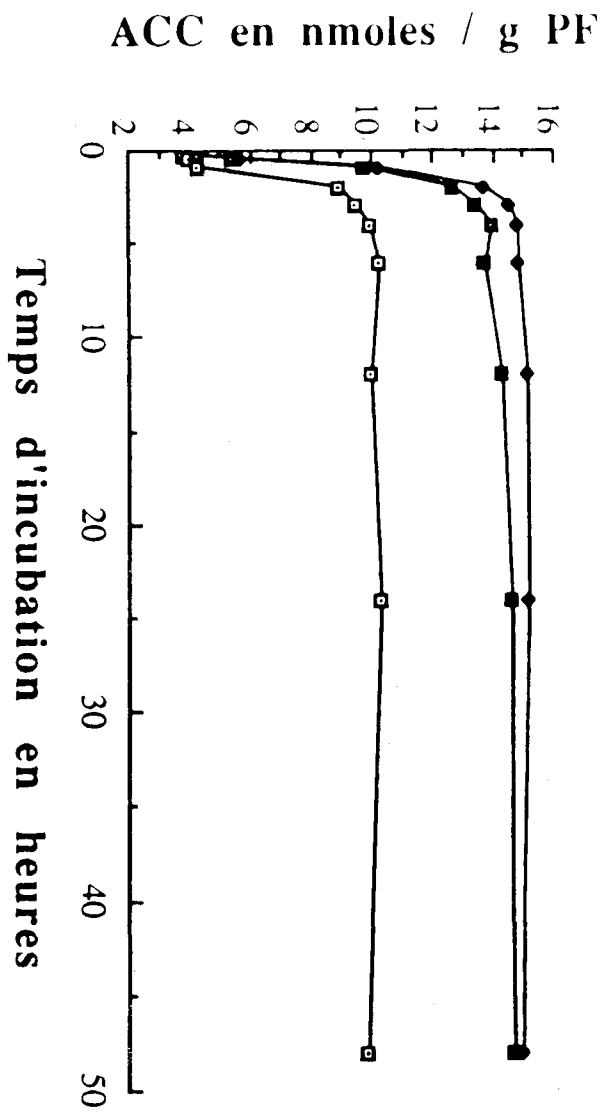


Figure 2 : Cinétique de conversion de l'ACC en éthylène dans l'extrait végétal en présence de :
 10 (□), 50 (●) et 100 (■) mM HgCl₂.

MACC en nmoles / g PF

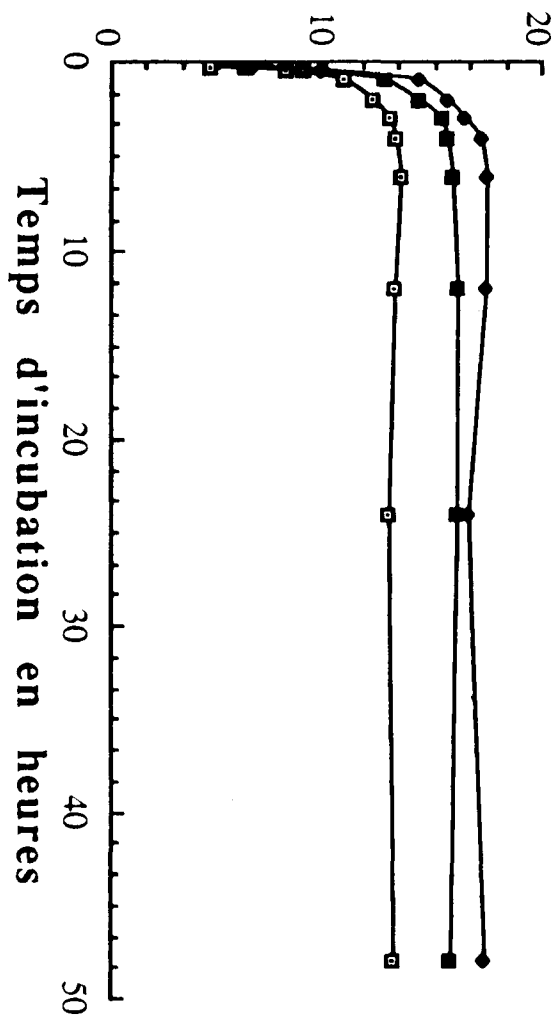


Figure 3 : Cinétique de conversion du MACC en éthylène dans l'extrait végétal en présence de :
10 (□), 50 (●) et 100 (■) mM HgCl₂.

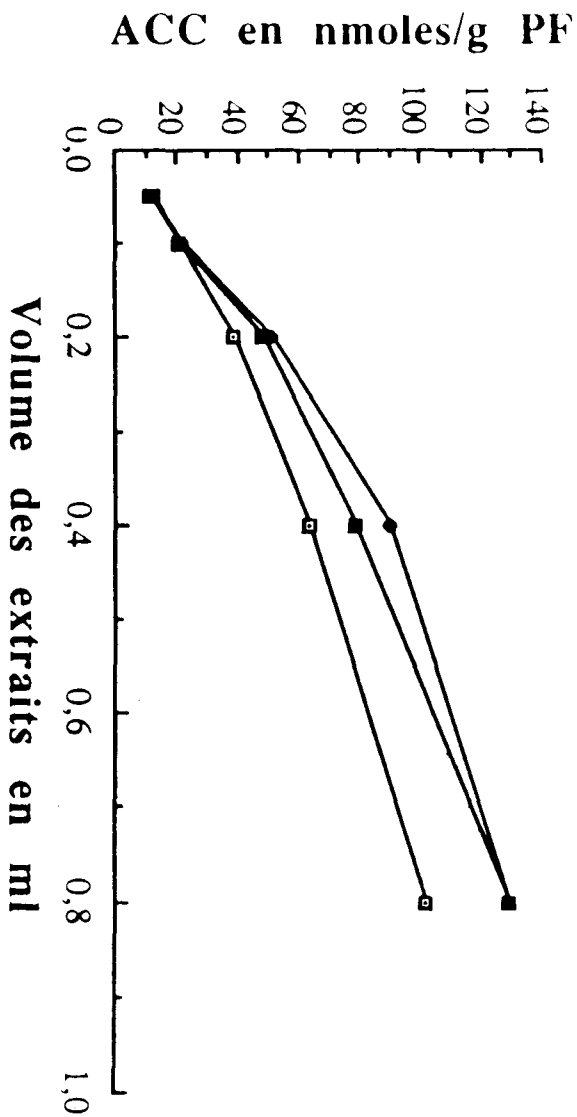


Figure 4 : Action de HgCl₂ sur la teneur en ACC de l'extrait végétal utilisé à différents volumes : 10 (□), 50 (●) et 100 (■) mM HgCl₂.

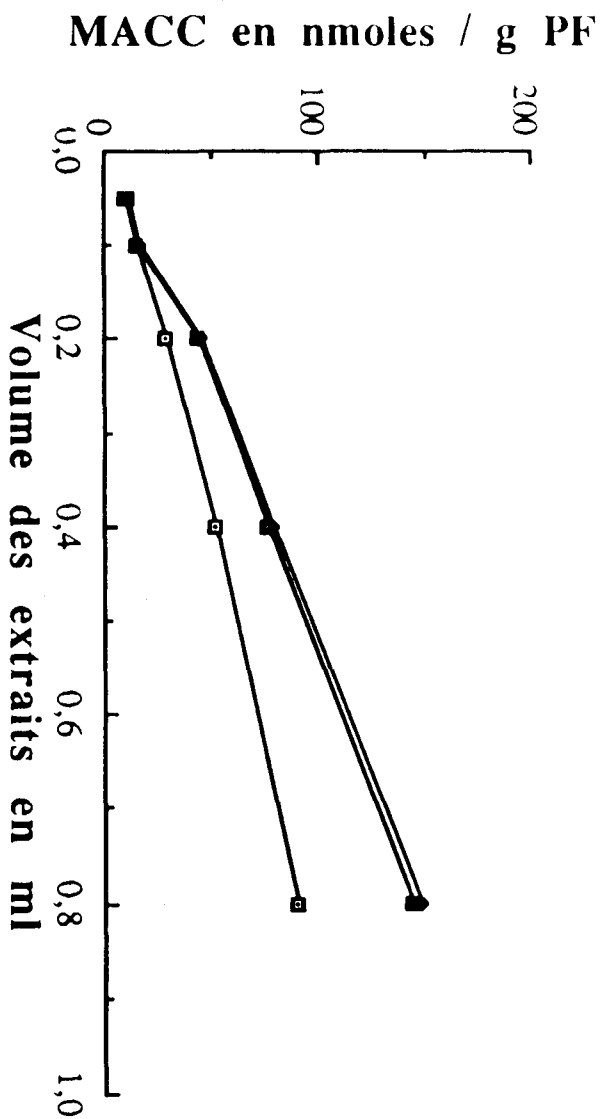


Figure 5 : Action de $HgCl_2$ sur la teneur en MACC de l'extrait végétal utilisé à différents volumes :
 10 (□), 50 (●) et 100 (■) mM $HgCl_2$

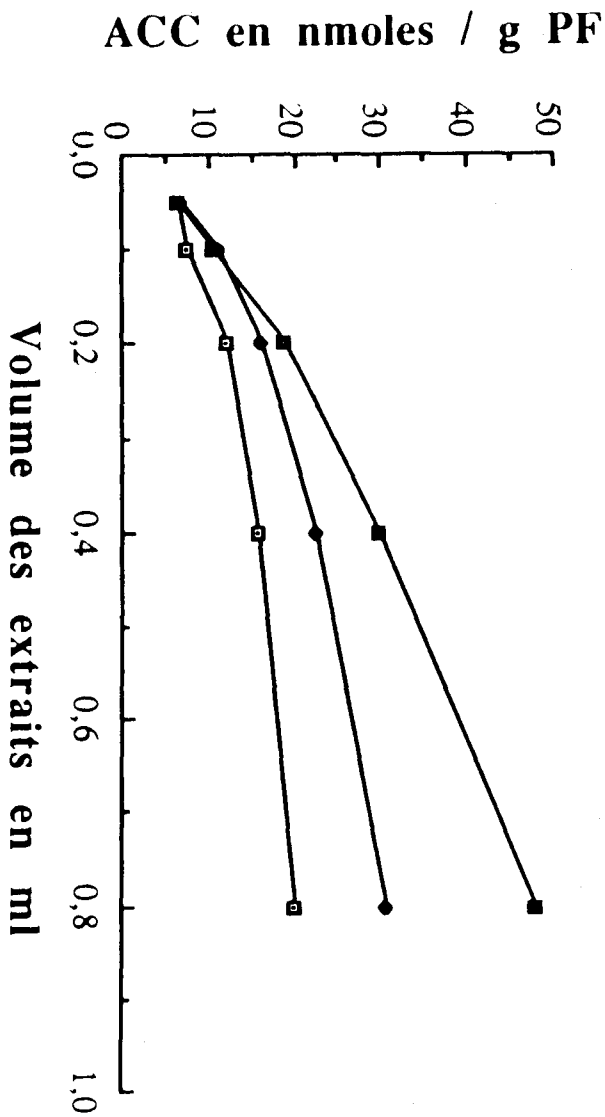


Figure 6 : Action de NaOCl sur la teneur en ACC de l'extrait végétal utilisé à différents volumes : 2,5 (□), 5 (●) et 7,5 (■) % NaOCl

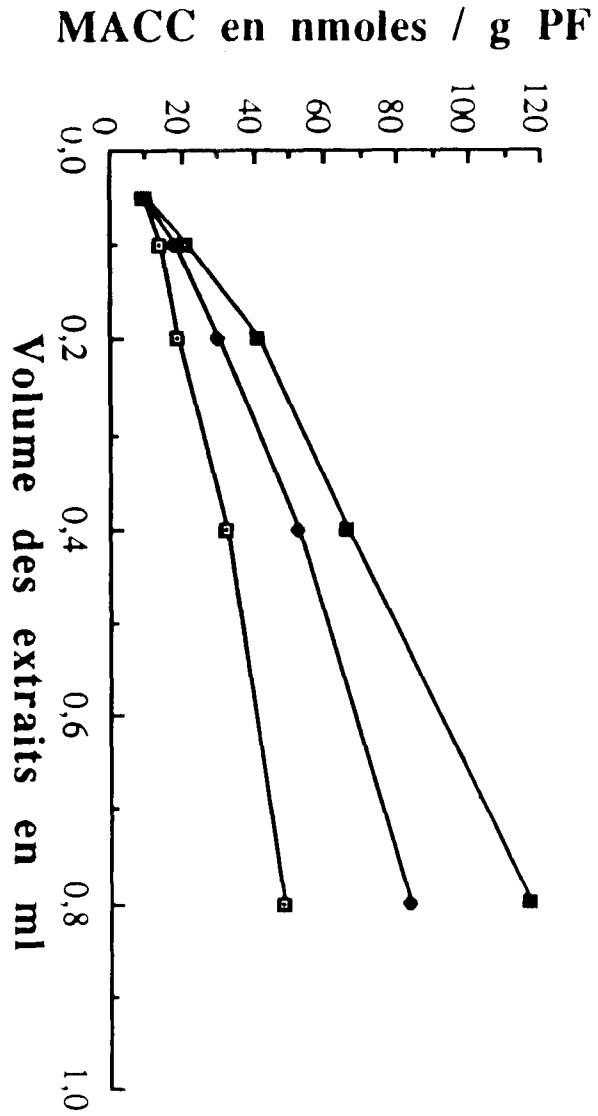


Figure 7 : Action de NaOCl sur la teneur en MACC de l'extrait végétal utilisé à différents volumes : 2,5 (□), 5 (●) et 7,5 (■) % NaOCl.

obtenue en présence de 50mM de HgCl₂ dans les extraits bruts hydrolysés . L'action des protéines serait atténuée éventuellement dans notre cas par leur dénaturation sous les effets combinés de l'acide et de la chaleur utilisés dans l'hydrolyse du MACC en ACC . D'autres composés peuvent être à l'origine de la baisse du rendement de ces réactions tels que les oléfines (Bach 1970) et les composés phénoliques qui peuvent réagir soit avec les métaux lourds (dont Hg) (Sitrit et Coll. 1988) soit avec des agents oxydants comme le NaOCl (Juard et Coll. 1969, Pascal 1972, Thomson 1964) . L'ensemble de ces travaux antérieurs ont montré que les extraits doivent être purifiés afin d'éliminer toutes interférences possibles . Cependant, vu son coût et l'équipement qu'elle exige, la purification reste difficile et fastidieuse lorsqu'on a affaire à des analyses de routine . Devant cette difficulté pratique, et dans l'objectif d'utiliser une technique simple et sensible, la détermination de l'ACC et du MACC par la voie chimique peut être largement améliorée en augmentant les concentrations en HgCl₂ et en NaOCl directement au niveau de l'extrait végétal brut . Ceci pour un temps d'incubation supérieur ou égal à 4 heures dans les conditions optimales de température (0°C) et de pH (>10).

RESUME

Pour mesurer le MACC dans un extrait brut de feuilles de blé, nous avons retenu la méthode mise au point par LIZADA et YANG (1979) dans la mesure où cette technique est la plus simple et la plus sensible . Cependant, la modification de certaines conditions de réaction chimique a été indispensable du moment où elle est réalisée directement au niveau de l'extrait brut où le rendement de la réaction était très faible . Les résultats obtenus montrent que l'estimation de la teneur en MACC de l'extrait brut peut être améliorée de 70% en augmentant les concentrations en HgCL₂ et en NaOCl . Aussi, pour atteindre le maximum de détection, le temps d'incubation a été largement modifié .

MOTS CLES : MACC, ACC, analyse chimique, extrait brut, blé .

ABSTRACT

To measure the MACC in a natural leaf extract of wheat, we used the method of Lizada and Yang (1979) since this technique is simpler and sensitive . However, modification of certain conditions of the chemical reaction were necessary since the level of the yield of natural extract was very weak . The results obtained showed that the estimate of the amount of MACC of the natural extract could be increased 70% by increasing the concentrations of HgCL₂ and NaOCl . Also, to obtain the maximum level, the time of incubation was greatly modified .

KEY WORDS : MACC, ACC, chemical analysis, natural extract, wheat .

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Mr Lahcen HASSANI pour ses conseils fructueux le long de ce travail et pour son assistance technique lors de la mise en forme de ce document.

Cette recherche a été financée partiellement par le Projet INRA/MIAC USAID : USAID Project N 608-0136 et en partie par la bourse FIS-Stokholm Suede NC/1237-1 .

ملخص

لقياس (MACC) في مستخلص أوراق حبوب القمح، استعملنا الطريقة الموضوعية من طرف (Lizada and Yang.1979) وذلك لأنها تكون الطريقة السهلة والأكثر دقة .

إن تغيير بعض الظروف التي تتم فيها التفاعلية الكيميائية يعتبر محتما لأن هذه الأخيرة تحقق مباشرة في المستخلص وذلك مع ضالة محصول التفاعلية. النتائج المحصل عليها أظهرت قدر MACC في المستخلص يمكن تحسينه بـ 70 ٪ وذلك برفع في قدر مركز Hgc12 و Na ocl . و للحصول على أعلى مقدار من الكشف، وقت الحضانة يكون جد متغير.

الكلمات المفتاحية : MACC – ACC – تحليل كيميائي – مستخلص – قمح .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAMS, D. O. and YANG, S. F. 1979 . Ethylene biosynthesis : identification of 1- Aminocyclopropane -1- Carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene . Proc. Natl. Acad. Sci. 76 : 170-174 .
- AMRHEIN, N., SCHEEBEEK, D., SCORUPKA, S. and TOPHOF, S. 1981 . Identification of major metabolite of the ethylene precursor 1- Aminocyclopropane -1- Carboxylic acid in higher plant . *Naturwissenschaften* 68: 619-620 .
- BACH, R. D. 1970 . A molecular approach to the mechanism of electrophilic additions to olefins . *J. Am. Chem. Soc.* 92 : 5589-5602 .
- COLEMAN, L. W. 1984 . Determination of ACC synthase in *Poa pratensis* induced by mechanical or biotic factors and characteristics of the assay for ACC. PHD Hort . IOWA State University Ames .
- HADAS, S. P., MEIR, S. and Aharoni, N. 1985 . Autoinhibition of ethylene production in tobacco leaf discs : enhancement of ACC conjugation . *Physiol . Plant.* 63 : 431-437 .
- HOFFMAN, N. E. and YANG, S. F. 1982 . Identification of MACC as a major conjugate of ACC, an ethylene precursor in higher plants . *Bioch. Bioph. res. com.* 104 : 765-770 .
- HOFFMAN, N. E., LIU, Y. and YANG, S. F. 1983 . Changes in MACC content in wilted wheat leaves in relation to their ethylene production rates and ACC content . *Planta* 157 : 518-523 .
- JUARD, L. and GEISSMAN, T. A. 1969 . Absorption spectra of metal complexes of flavonoids compounds . 105 : 492-495 .
- KIONKA, C. and Amrhein, N 1984 . The enzymatic malonylation of ACC in homogenates of mung bean hypocotyls . *Planta* 162 : 226-235 .
- LIU, Y., SU, L. Y. and YANG, S. F. 1985 . Ethylene promotes the capability to malonylate ACC and D-amino acids in preclimacteric tomato fruits . *Plant Physiol.* 77 / 891-895 .
- LIZADA, M. C. C. and YANG, S. F. 1979 . A simple and sensitive assay for Aminocyclopropane Carboxylic Acid. *Bioph. Bioch*100 : 140-145 .
- McKEON, T. A., HOFFMAN, N. E. and YANG, S. F. 1982 : The effect of plant hormone pretreatments on ethylene production and synthesis of ACC in water stressed wheat leaves . *Planta* 155 : 437-443 .
- MEAS, G. E. and FREENEY, R. E. 1971 . Chemical modification of proteins . In : PHD Hort. IOWA State University Ames . Coleman, L. W. 1984 .

Pascal, R. G. 1972. Chemistry of phenols . Application to natural products . In : VH Heywood . ed. Plant Phenolics . Oliverand Boyds, Edinburgh 23-53 .

SATOH, S. and ESASHI, Y. 1984 . Changes in ethylene production and in ACC and MACC contents of cocklebur seeds during their development . Plant Cell Physiol . 25 : 1277-1283 .

SITRIT, Y., RIOVE, J . and BLUMENFELD, A. 1988 . Interference of phenolic compounds with the ACC assay . Plant Physiol . 86 : 13-15.

THOMSON, R. H. 1964 . Structure and reactivity of phenolic compounds . In : J B Harborne, ed. Biochemistry of phenolic compounds . Academic press . New York . 1-32.

YU, Y., ADAMS, D. O. and YANG, S. F. 1979 . ACC synthase a key enzyme in ethylene biosynthesis . Arch . Bioch . Bioph . 198 : 280-286 .