

Choix d'une méthode d'extraction et de purification pour le dosage des sucres solubles et de l'amidon dans les tissus ligneux de la vigne.

Gaëlle Rolland

LEPSE, INRAE, 2 place Viala, 34060 Montpellier, France
gaelle.rolland@inrae.fr



J'ai toujours été attirée par le travail en laboratoire. J'ai un BTS d'analyses en biologie médicale. Après plusieurs stages et contrats dans le milieu de la recherche environnementale notamment sur la dépollution des sols en métaux lourds au CNRS de Pau, je me suis passionnée pour la recherche. C'est en 1998 que je suis arrivée en stage puis en CDD dans l'UMR Sciences du sol à l'INRA de Montpellier. En 2001 j'ai pu intégrer le LEPSE, laboratoire d'écophysiologie des plantes sous stress environnementaux, par voie de concours externe et je ne l'ai plus quitté. Depuis, je travaille en collaboration avec les chercheurs et les doctorants de mon unité pour répondre au mieux à leurs besoins analytiques. Mettre au point de nouvelles méthodologies, adapter des protocoles existants à une nouvelle matrice végétale, me former à de nouvelles techniques fait partie de mon métier. Le travail présenté ici a pour but de proposer une méthode d'extraction et de purification simple et rapide des sucres solubles dans les bois et les racines de vigne sans utiliser de solvants toxiques. J'espère qu'il vous intéressera. Les résultats présentés sont une synthèse partielle d'une série de nombreux tests réalisés. Si ce travail vous intéresse, n'hésitez pas à me contacter pour échanger avec moi.

Résumé. Le dosage des sucres solubles et de l'amidon dans des bois et racines de vigne est important pour quantifier l'état carboné de la plante. Il existe différentes méthodes d'extraction et de dosage pour ces différents sucres qui ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients. Certains solvants sont très efficaces pour l'extraction des sucres solubles mais entraînent des inhibitions lors de leur dosage, d'autres sont toxiques et cancérigènes. Les solvants qui n'inhibent pas les dosages des sucres solubles entraînent une perte d'amidon, qui est la forme majoritaire de stockage des sucres dans les organes de réserve de la vigne. L'étude menée ici a permis de comparer plusieurs solvants d'extractions des sucres solubles (éthanol, mélange éthanol-eau et eau seule) sur des échantillons de bois et de racines de vigne. Sur les échantillons extraits par le solvant éthanol-eau, différentes techniques de purification (filtration, ajout de PVP et/ou de chloroforme) ont été testées afin de trouver la méthode la plus simple, la plus rapide et la plus adaptée à nos échantillons et à notre méthode de dosage. Au final, l'extraction éthanol-eau suivie d'une purification par ajout de PVP s'est révélée la solution optimale pour doser les sucres solubles sans perte d'amidon dans les bois et racines de vigne.

Mots-clé : Extraction des sucres solubles, glucose, fructose, saccharose, amidon, bois, racines, vigne, purification, PVP.

Abstract. Soluble sugars and starch dosings from wood and root of vine is important to quantify the carbon contained in the plant. Different extraction and dosing methods do exist for each kind of sugar. Each of them has some advantages and inconvenients. Some solvents are very efficient for dosing soluble sugars but give some inhibitions when dosing ; others are toxic and carcinogenic. The solvents that do not inhib the dosing of soluble sugars involve starch loose which is the main form of sugar stocking in the plant. This study allows to compare several soluble sugar extraction solvents (ethanol, mix ethanol-water and only water) on wood and roots of the vine. For the samples extracted by the ethanol-water solvent, different purification techniques were tested (filtration, adding of PVP and / or chloroform) in order to find the easiest, the rapidest and the best fitted method adapted for

our samples and our dosing method. To conclude, the ethanol-water extraction followed by a purification with PVP adding was the best method to dose soluble sugars without starch loose in the woods and roots of vine.

Keywords : extraction of soluble sugar, glucose, fructose, saccharose, starch, wood, root, vine, purification, PVP

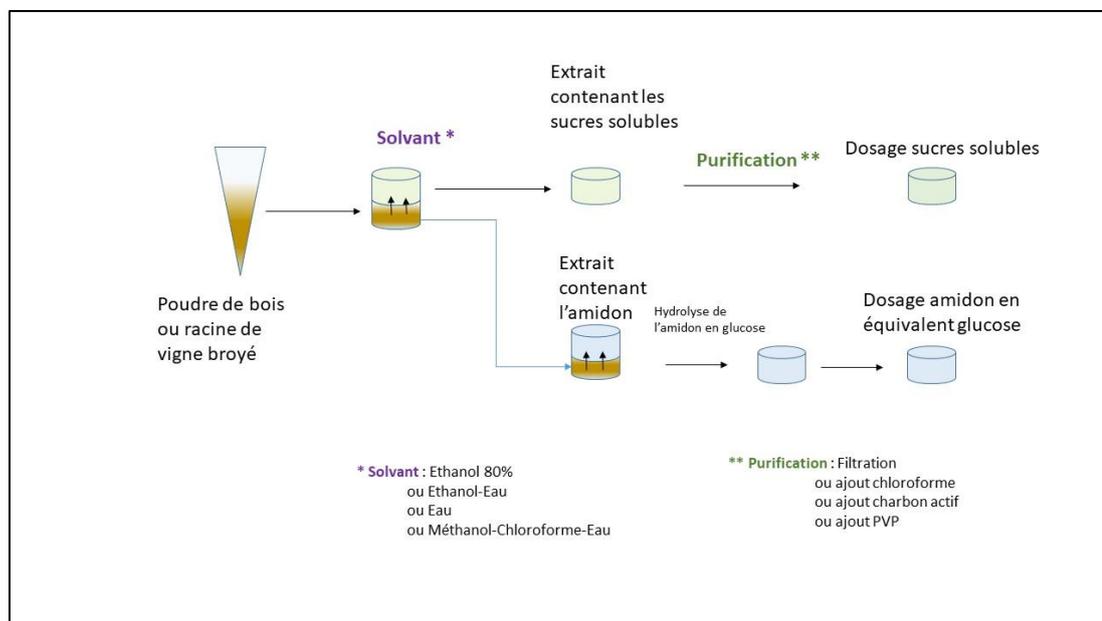
Introduction

Le carbone est l'élément essentiel, qui permet aux plantes de se développer et de se reproduire. Chez les plantes pérennes, comme la vigne, la croissance et la production de baies sont totalement dépendantes de la remobilisation printanière du carbone stocké dans les organes de réserves (racines et bois) [1 ; 2]. Dans le contexte de dépérissement croissant des vignobles, la compréhension des effets des contraintes environnementales et des pratiques culturales sur le stock de réserves carbonées est un questionnement central. Le carbone est stocké chez la vigne principalement sous forme d'amidon. Toutefois, les sucres solubles (glucose, fructose et saccharose) contribuent également de façon significative au pool total de réserve, représentant jusqu'à 6 % de la matière sèche de ce dernier [3] et 40 % des sucres disponibles. Le dosage des sucres solubles, couplé à celui de l'amidon, est donc important pour appréhender le pool total de carbone potentiellement disponible.

Les méthodes d'extractions des sucres

Le dosage des sucres solubles et de l'amidon dans des tissus végétaux repose sur trois étapes essentielles : l'extraction des sucres solubles avec différents solvants et la purification des extraits, l'extraction de l'amidon sur le culot de poudre restant, et le dosage de ces éléments par différentes méthodes. Le tableau 1 schématise les différentes étapes de ces processus.

Tableau 1. Schématisation des différentes étapes depuis l'échantillon en poudre jusqu'aux dosages des sucres solubles et de l'amidon



En 2015, une comparaison inter-laboratoire de différents de types d'extractions et de dosage des sucres totaux (sucres solubles et amidon) a été réalisée [4]. Les vingt-neuf laboratoires à travers le monde ayant participé à cette étude, dont le LEPSE, ont combiné sept méthodes d'extractions et sept méthodes de dosages sur le même matériel végétal. L'étude a montré une diversité de résultats importante entre les laboratoires. L'étude a conclu sur l'importance d'une standardisation et de l'utilisation d'une seule et même méthode pour pouvoir comparer les données produites. Dans une étude plus récente [5], différentes méthodes de préparation d'échantillons, d'extractions des sucres solubles (eau et éthanol) et de dosages (chromatographie ionique, méthode enzymatique, méthode acide) ont été comparées au sein de six laboratoires. Les auteurs recommandent ainsi d'utiliser l'extraction des sucres solubles à l'éthanol 80 % ('Ethanol 80 %') à chaud par plusieurs bains successifs comme méthode de référence.

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2020 (100)

Lors de ces extractions successives, 92 % des métabolites solubles sont extraits dans le premier bain, 7 % dans le second et 1 % dans le troisième [6]. Néanmoins, en plus d'extraire les sucres solubles, l'éthanol 80% facilite également l'extraction des pigments et des tanins (polyphénols) des échantillons végétaux qui interfèrent par la suite avec le dosage des sucres solubles. De plus, quand l'éthanol est présent à plus de 40% dans l'extrait, il inhibe le fonctionnement des enzymes utilisées pour le dosage des sucres. Une autre étude a comparé l'extraction à l'eau contre l'extraction à l'éthanol [7]. Si les auteurs concluent que l'extraction à l'eau est la méthode la plus compatible avec le dosage des sucres solubles, ils mettent néanmoins en évidence une hydrolyse partielle de l'amidon.

D'autres études préconisent d'utiliser du chloroforme pour neutraliser les pigments et du charbon actif ou du Polyvinylpyrrolidone (PVP) pour neutraliser les polyphénols ([8 ; 9 ; 10]). Les études menées par Gomez *et al.* (2002 ; 2003) [10 ; 1] comparent différentes méthodes de préparation des échantillons et d'extraction des sucres solubles adaptées aux plantes ligneuses. Ces auteurs suggèrent (i) d'extraire les sucres solubles par un mélange de solvants 'Méthanol-Chloroforme-Eau' ; (ii) d'évaporer les solvants, (iii) de reprendre les extraits dans de l'eau puis (iv) de purifier les extraits obtenus via un ajout de PVP, un passage en colonne C-18 et une filtration à 0.45 µm avant le dosage des sucres par CLHP (chromatographie liquide sous haute pression).

L'objectif de notre étude est de développer une méthode plus simple et plus rapide à mettre en œuvre tout en réduisant les risques d'exposition aux produits chimiques toxiques et cancérigènes. A partir des différentes méthodologies synthétisées dans le tableau 2, nous comparerons d'abord l'impact des solvants d'extraction ('Ethanol 80 %' ; 'Ethanol-eau' ; 'Eau') sur le dosage de l'amidon. Au LEPSE, nous mettons en œuvre la méthode 'Ethanol-Eau' qui consiste en trois bains successifs à chaud (90°C), le premier dans de l'éthanol à 80 %, le second dans de l'éthanol à 30 %, le troisième dans de l'eau ultra pure. Le pourcentage final d'éthanol dans la matrice est alors de 36 % et permet le dosage enzymatique. Nous testerons ensuite différentes méthodes de purification des extraits (filtration, chloroforme, PVP) pour les adapter aux tissus ligneux de la vigne, bois et racines, riches en polyphénols.

Tableau 2. Synthèse des avantages et inconvénients des méthodes de référence d'extraction et de dosage des sucres solubles et de l'amidon dans les tissus ligneux

	Méthode 'Ethanol 80 %' (Degli Agosti, 1985)	Méthode 'Eau' (Edwards et al., 2011)	Méthode 'Ethanol-Eau' utilisée au LEPSE	Méthode 'Méthanol-Chloroforme-Eau' (Gomez et al., 2002 et 2003)
Solvant d'extraction	Ethanol 80 % (x3) à chaud	Eau (x3) à chaud	Ethanol 80 % (x1) Ethanol 30 % (x1) Eau (x1) à chaud	Méthanol-Chloroforme-Eau à 4°C
Purification des extraits	Sans	Sans	Sans	Evaporation, filtration, ajout de PVP, purification sur colonne C18
Mode d'extraction de l'amidon	Autoclavage et hydrolyse	Autoclavage et hydrolyse	Autoclavage et hydrolyse	Autoclavage et hydrolyse
Méthode de dosage des sucres solubles	Enzymatique	Enzymatique	Enzymatique	CLHP et enzymatique
Avantages	Efficace pour l'extraction des sucres et de l'amidon	Efficace pour l'extraction des sucres. Peu ou pas d'extraction des polyphénols	Efficace pour l'extraction des sucres	Efficace pour l'extraction des sucres et de l'amidon. Neutralisation des polyphénols
Inconvénients sur les tissus ligneux	Inhibition du dosage des sucres solubles (polyphénols et éthanol 80 %)	Hydrolyse partielle de l'amidon	Inhibition du dosage des sucres solubles (polyphénols)	Toxicité des solvants. Traitements de purification lourds à mettre en œuvre

Matériel et méthode

Matériel végétal

Des échantillons de bois et de racines de vigne (Sauvignon blanc) ont été récoltés au champ. Ces derniers ont été plongés dans l'azote liquide puis congelés à -50°C . Les échantillons ont ensuite été cryo-lyophilisés à -112°C par sublimation et broyés avec un broyeur à billes Qiagen dans 2 bols de 30mL par des billes inox de 28 mm de diamètre pendant 1min 30 à la fréquence maximum de 30 mouvements/s jusqu'à l'obtention d'une poudre fine de granulométrie inférieure à 0.2 mm.

Extraction des sucres solubles

L'extraction des sucres solubles a été réalisée sur des aliquotes d'environ 20 mg de poudre de bois ou de racines. Pour l'extraction 'Ethanol-eau', chaque aliquote a été mis en contact avec 200 μL d'éthanol 80 % à 90°C et centrifugé 3 min à température ambiante à 13000 tr/min. Cette étape est ensuite répétée avec de l'éthanol 30 % puis avec de l'eau ultra pure. Les trois surnageants ont été rassemblés et forment l'extrait à doser dont la concentration finale en éthanol est de 36%.

Pour l'extraction 'Eau', nous avons suivi le même protocole avec de l'eau ultra pure uniquement.

Pour l'extraction à 'Ethanol 80 %', nous avons utilisé de l'éthanol 80 % uniquement. Pour cette dernière extraction, les extraits ont ensuite été évaporés dans un évaporateur Speed-Vac sous vide et repris dans 600 μL d'eau ultra pure.

Lors d'une des expérimentations, des tests au lugol ont été réalisés à chacune des trois étapes d'extraction des sucres solubles. 10 μL d'extrait ont été mis en contact avec 10 μL de lugol (Référence 62650-100ML Sigma Aldrich). Le lugol est de couleur jaune-orangé. En présence d'amidon, il se colore en bleu-violet. Grâce à ce test simple à mettre en œuvre, on peut facilement voir si de l'amidon (insoluble) est extrait lors de la phase d'extraction des sucres solubles.

Purification des extraits

Lors d'un premier essai, les extraits de bois et de racines ont été mélangés puis divisés en lots pour tester les effets de différentes purifications sur la concentration finale en sucres solubles. Nous avons réalisé au moins 2 répétitions techniques pour chaque type de purification. Le premier lot (témoin) n'a reçu aucun traitement. Les traitements appliqués sur les cinq autres lots consistaient en une filtration (filtre de cellulose 0.45 μm - Sartorius Minisart RC15) et/ou l'ajout de polyvinylpyrrolidone (PVP : 3 mg / 600 μL de volume d'extrait) ou de chloroforme (150 μL / 600 μL d'extrait).

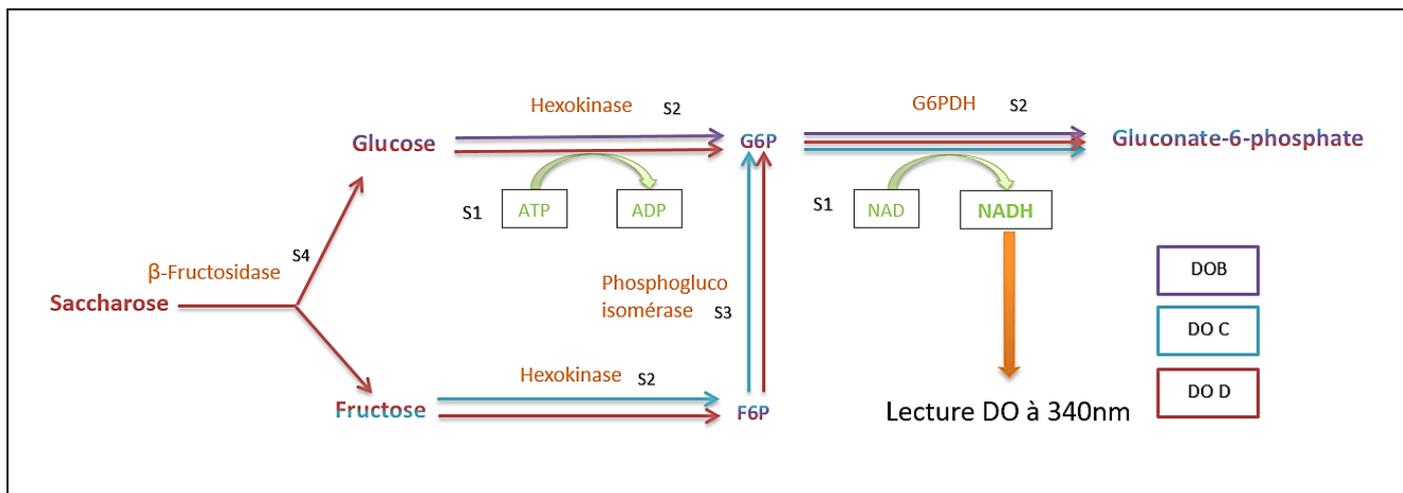
Les traitements appliqués sont les suivants :

T=Témoin ; F=Filtre 0.45 μm ; F_PVP : Filtration et ajout de PVP ; PVP=ajout de polyvinylpyrrolidone ; PVP_F = ajout de PVP suivi d'une filtration ; PVP-C=ajout de PVP et de chloroforme.

Par la suite, les analyses par type de tissus ont été individualisées (bois et racine séparément) et seules les purifications par ajout de PVP, Chloroforme (C) ou combinaison des deux PVP-Chloroforme (PVP-C) ont été conservées.

Les dosages des sucres solubles (glucose, fructose et saccharose) sont réalisés en cascade (Tableau 3). Après avoir fait une première lecture d'absorbance (DO A) correspondant au blanc réactif S1 (extrait à doser et co-enzymes ATP et NAD), on mesure l'augmentation d'absorbance (DO B) liée à l'ajout d'hexokinase et G6PDH dans le milieu réactionnel. Ces enzymes en transformant le glucose vont permettre la formation de NADH dont on mesure l'absorbance à 340 nm et qui est proportionnelle à la concentration de glucose dans l'extrait. On ajoute ensuite la phospho-gluco-isomérase qui permet l'augmentation d'absorbance du NADH liée au fructose (DO C) et enfin l'ajout de β -fructosidase permettra de lire l'augmentation d'absorbance du NADH liée au saccharose (DO D). Le protocole détaillé est disponible en annexe 1.

Tableau 3. Schéma des réactions lors des dosages enzymatiques des sucres solubles glucose, fructose et saccharose.



Extraction d'amidon

L'extraction d'amidon a été réalisée après l'extraction des sucres solubles en ajoutant 500 μ L d'eau ultra-pure sur le culot de poudre restant. L'extraction est faite par autoclavage à 110°C pendant 1h30 et l'hydrolyse de l'amidon en glucose par de l'amyloglucosidase dans un tampon acide acétique à 56°C pendant 1h30. Le protocole détaillé est donné en annexe 2. L'amidon étant transformé en glucose, le dosage est réalisé comme précédemment pour les sucres solubles. On ne dosera ici que le glucose en mesurant l'augmentation d'absorbance à 340 nm liée à la formation de NADH. L'amidon est exprimé en équivalent glucose.

Résultats et discussion

Impact des solvants d'extraction 'Eau', 'Ethanol' et 'Ethanol-Eau' sur la quantification de l'amidon dans les racines de vigne.

Un échantillon de poudre de racines de vigne a été extrait en utilisant les trois solvants 'Ethanol 80 %', 'Ethanol-Eau' et 'Eau'. Cinq répétitions d'extraction ont été réalisées ; les résultats sont présentés dans la Figure1. La concentration en amidon après une extraction des sucres solubles par les solvants 'Ethanol 80 %' ou 'Ethanol-Eau' est la même. La concentration en amidon diminue significativement si le solvant est de l'eau seule. Nos résultats confirment ceux trouvés dans la bibliographie [7]. Des tests au lugol durant les différentes phases de l'extraction ont confirmé qu'une partie de l'amidon, pourtant insoluble, était bien extraite lors de l'extraction des sucres solubles. Si le solvant n'est que de l'eau, la perte d'amidon lors de l'extraction des sucres est ici de 34 %.

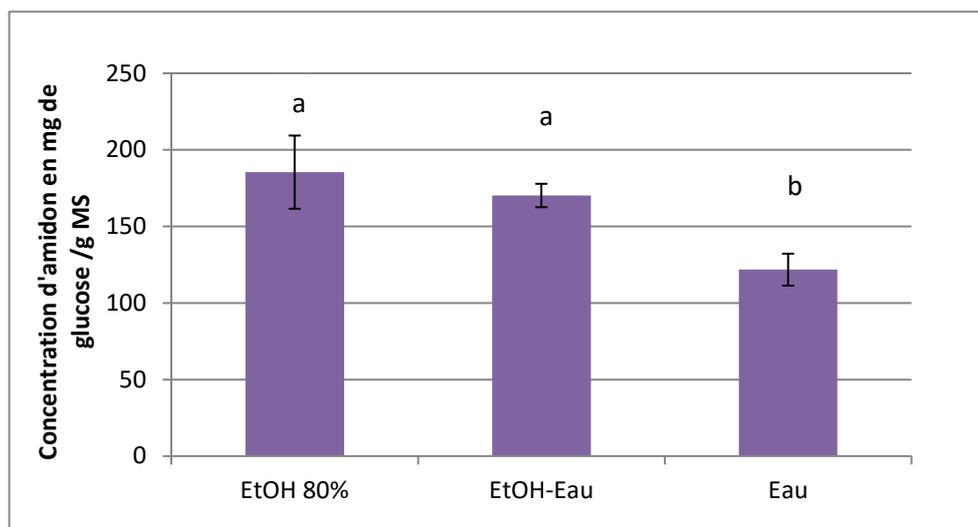


Figure 1. Comparaison de concentration d'amidon selon le solvant utilisé lors de l'extraction des sucres solubles. Les barres représentent la moyenne de cinq extractions différentes du même échantillon. Les barres d'erreur correspondent aux écart-types. Les lettres a et b correspondent à des moyennes différentes à $P < 0.01$ (Test de Turkey)

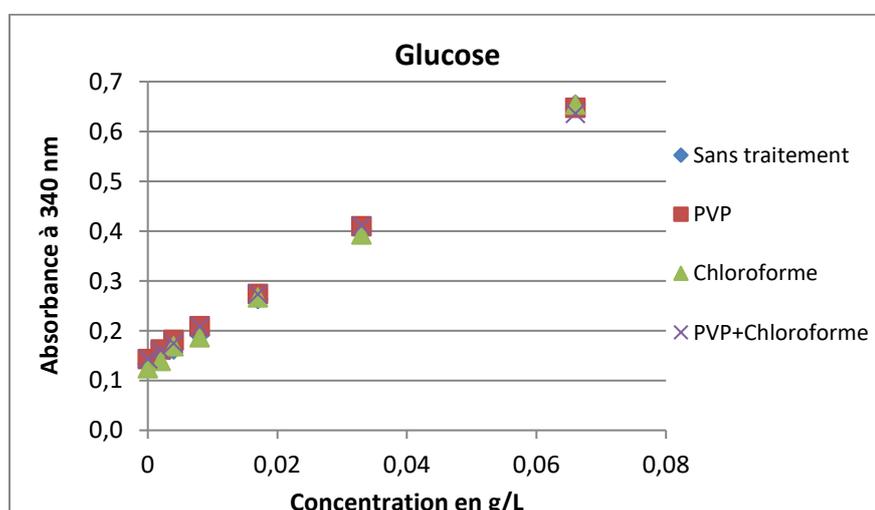
Le solvant utilisé lors de l'extraction des sucres solubles a bien un impact sur la détermination de l'amidon.

L'extraction 'Ethanol-eau' semble être un bon compromis entre une extraction 'Ethanol 80 %' efficace mais qui comporte une étape obligatoire d'évaporation et de reprise dans de l'eau ultra pure pour la réalisation du dosage des sucres solubles et une extraction 'Eau' qui peut provoquer la perte de 30 % d'amidon.

Efficacité de différents traitements de purification d'extraits 'Ethanol-Eau' issus de tissus ligneux sur la quantification des sucres solubles

Nous avons ensuite cherché à purifier les extraits 'Ethanol-Eau' en vue du dosage des sucres solubles. La bibliographie préconise d'utiliser du chloroforme pour neutraliser les pigments et du charbon actif ou du Polyvinylpyrrolidone (PVP) pour neutraliser les polyphénols ([8 ; 9 ; 10]) qui peuvent interférer lors du dosage enzymatique.

Dans un premier temps, nous avons testé l'impact du PVP et du chloroforme sur la quantification du glucose, fructose et saccharose à différentes concentrations (gamme étalons de 0,002 à 0,066 g/L). Les résultats présentés en figure 2 montrent que les différents traitements n'interfèrent pas avec le dosage enzymatique de ces sucres solubles.



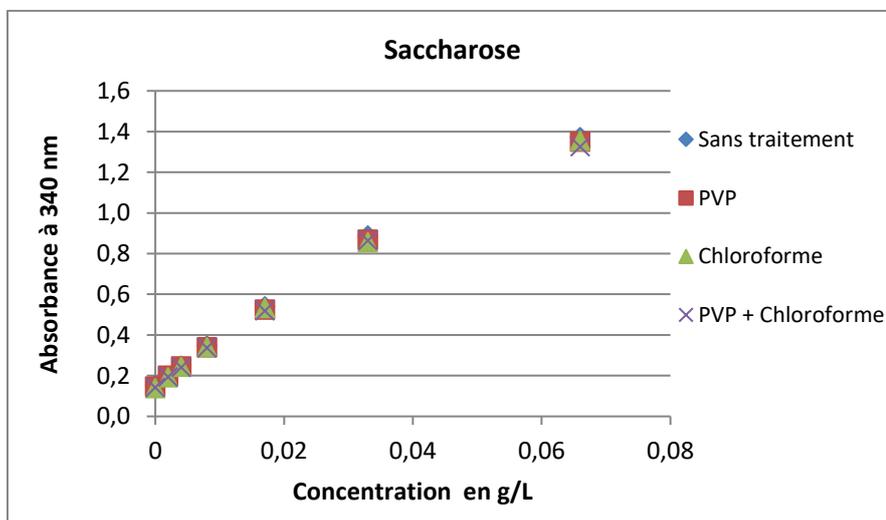
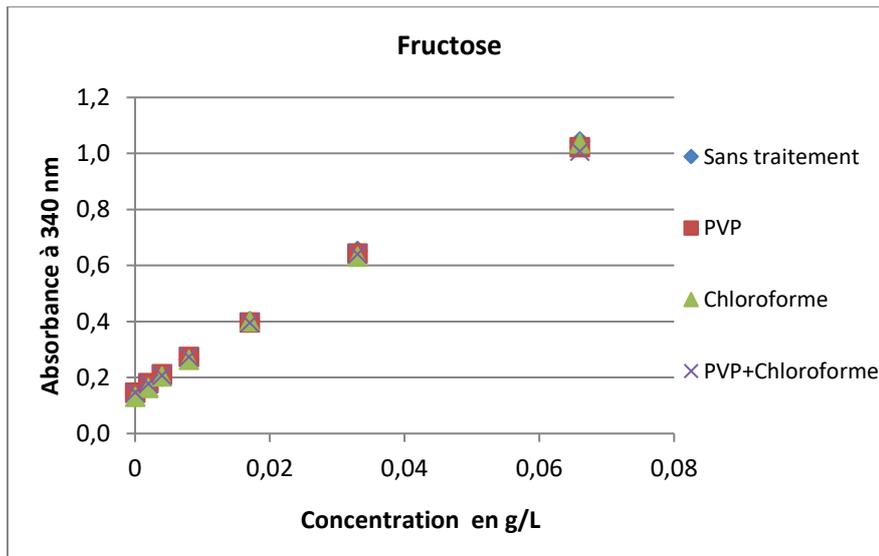


Figure 2. Impact des purifications au PVP, chloroforme et combinaison des deux sur les gammes étalons de glucose, fructose et saccharose.

Nous avons ensuite appliqué différentes purifications (filtration, ajout de PVP avec ou sans chloroforme) à des extraits 'Ethanol-Eau' de tissus ligneux de vigne (mélange racines + bois) (Figure 3). Pour l'extrait ayant été traité par filtration, on mesure les mêmes quantités de sucres que dans l'extrait témoin non traité. L'ajout de PVP qu'il soit couplé avec une filtration ou un ajout de chloroforme augmente les concentrations en sucres en particulier pour le glucose (x3) et le saccharose (x6). Les combinaisons de purifications, PVP et filtration ou PVP et chloroforme, n'apportent rien par rapport au PVP seul (le traitement par du chloroforme seul n'a pas été testé ici). L'extrait préparé présente une concentration faible en fructose, qui est ici moins impacté par ces traitements de purification que le glucose et le saccharose. L'efficacité pour le fructose serait à vérifier sur des échantillons plus concentrés.

Le PVP seul est donc suffisamment efficace pour permettre le dosage des sucres solubles dans ce mélange d'extrait de bois et de racines.

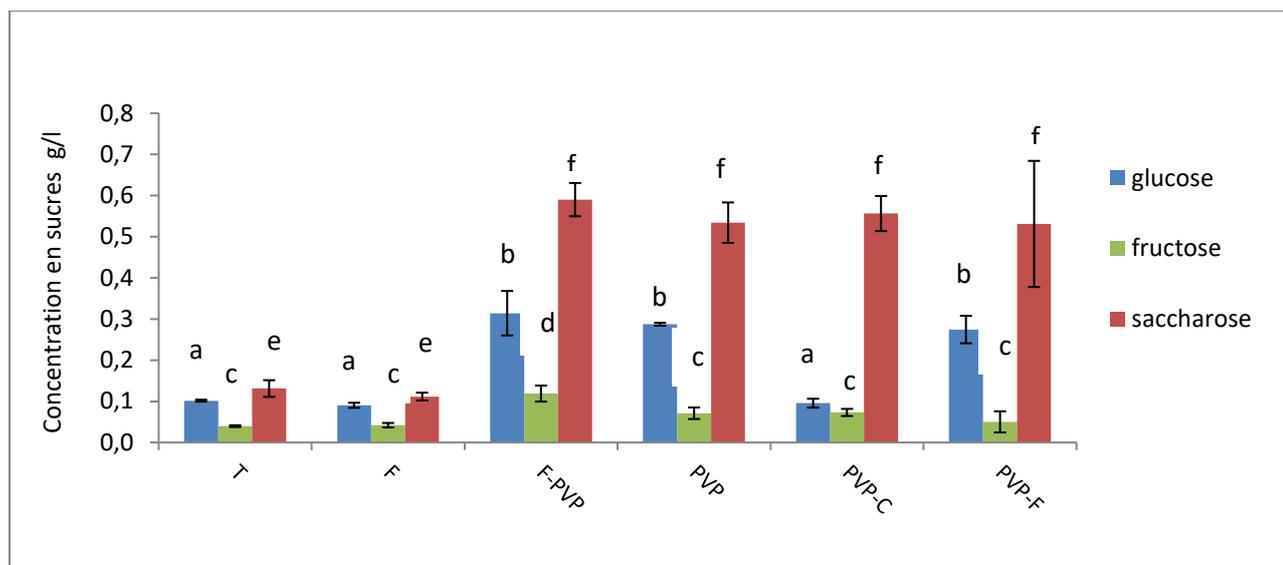
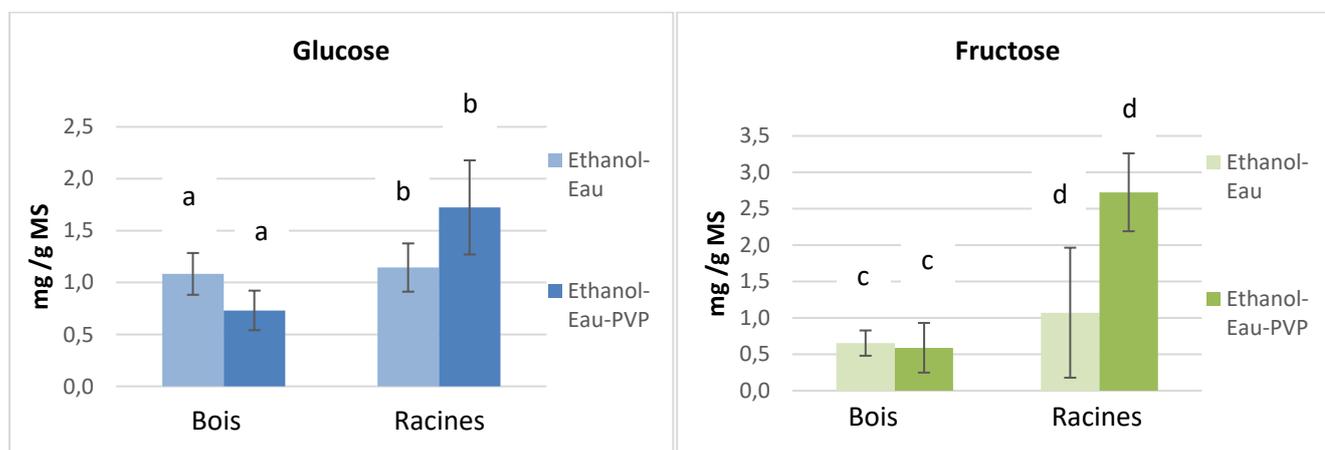


Figure 3. Impact de la purification d'extraits 'Ethanol-Eau' de tissus ligneux de vigne (bois et racines mélangés) à l'aide de filtre 0.45 μm (F), ajout de Polyvinylpyrrolidone (PVP) ou de Chloroforme (C) sur le dosage des sucres solubles comparé au témoin (T) non traité. Chaque barre représente les moyennes de 3 à 8 répétitions de dosage d'un même extrait d'échantillon, les barres d'erreur correspondent aux écarts-types. Les lettres correspondent à des moyennes différentes à $P < 0.01$ (Test de Turkey) (a et b pour le glucose, c et d pour le fructose, e et f pour le saccharose)

Des essais ont ensuite été réalisés pour étudier l'impact de la purification par du PVP sur des extraits individuels 'Ethanol-Eau' de bois et de racines, et non plus sur un mélange d'extraits (Figure 4). Dans le bois, le dosage des sucres n'est pas significativement impacté par l'ajout de PVP. Dans les racines, on peut faire la même analyse que dans le bois pour le glucose et le fructose. Le PVP n'a pas d'impact sur le dosage si ce n'est, peut-être, de réduire les écarts-types pour ces échantillons. Par contre pour le saccharose, l'ajout de PVP permet de limiter significativement l'interférence des polyphénols avec ce dosage.



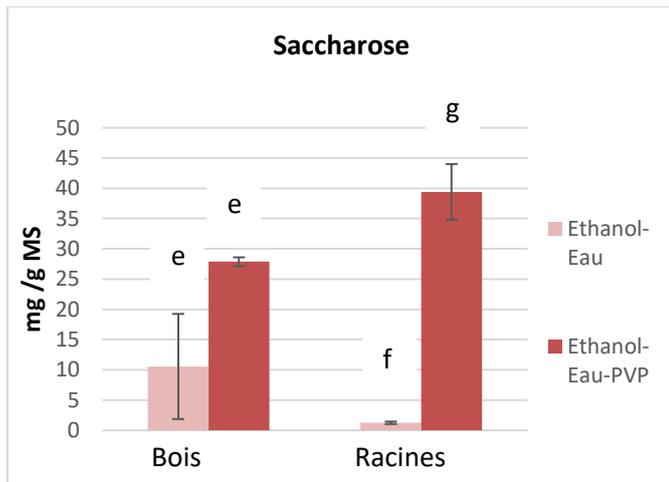
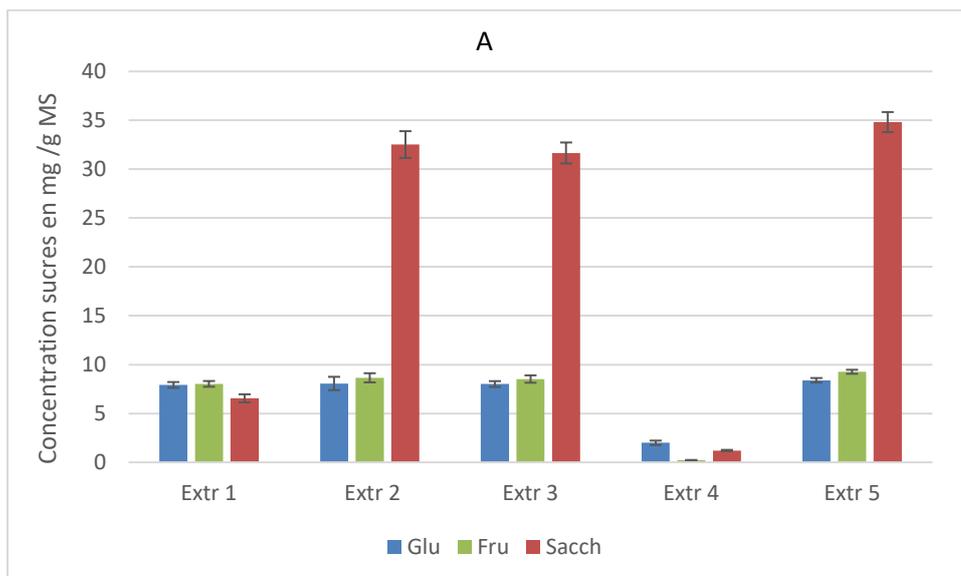


Figure 4. Comparaison de l'impact d'ajout de PVP à des extraits de bois et de racines de vigne. Les trois figures représentent respectivement les concentrations en Glucose, Fructose et Saccharose. Chaque barre représente les moyennes de deux extractions d'un même échantillon de bois ou de racines, les barres d'erreur correspondent aux écart-types. Les lettres correspondent à des moyennes différentes à $P < 0.01$ (Test de Turkey).

Des essais complémentaires ont été réalisés, en augmentant la quantité de PVP jusqu'à 6 mg / 600 μ L.

Un échantillon de racines de vigne a été extrait 5 fois avec le solvant « Ethanol-eau » et purifié avec 3 mg (+/- 1mg) de PVP. Les résultats, présentés sur la figure 5A, montrent une répétabilité des dosages sauf pour le saccharose de l'extrait 1 et l'ensemble des sucres de l'extrait 4.

3 mg supplémentaires de PVP ont été ajoutés dans les extraits 1, 2 et 4 qui ont été dosés une seconde fois. La figure 5B montre que l'ajout de PVP supplémentaire dans les extraits 1 et 4 a permis de retrouver des concentrations en sucres équivalentes à celles obtenues pour les autres extractions. Le PVP est donc efficace dès lors qu'il est ajouté en quantité suffisante dans les extraits 'Ethanol-eau' de racines qui contiennent certainement plus de polyphénols que le bois.



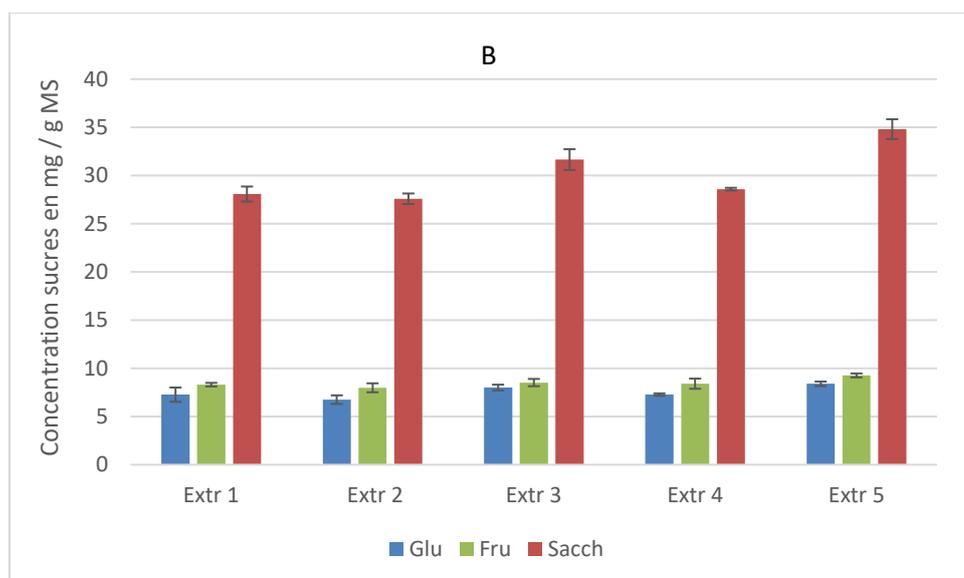
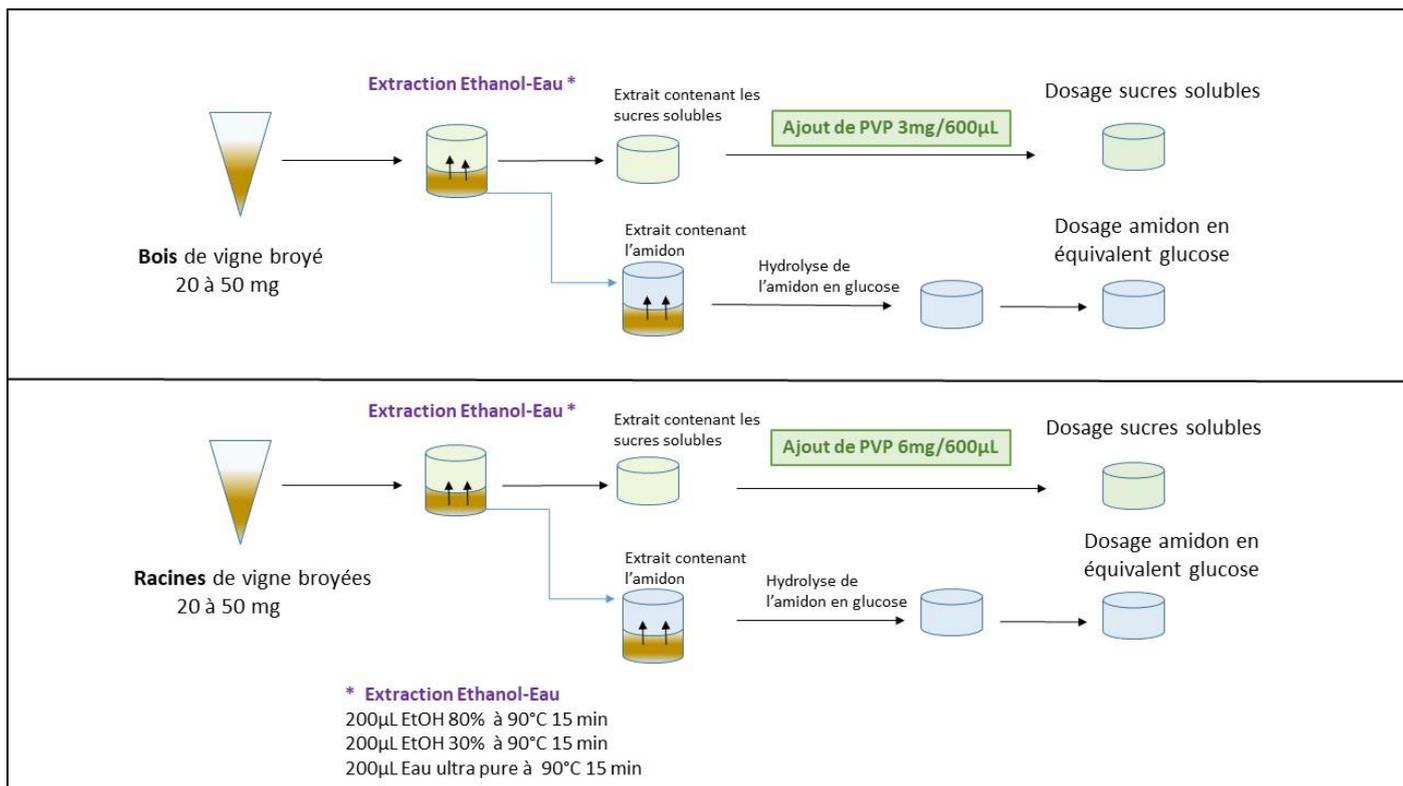


Figure 5. Comparaison de deux dosages de sucres sur les mêmes extraits. Sur la figure 5A, les extraits de racines avec un solvant « Ethanol-eau » contiennent 3mg/600 μ L de PVP. Sur la figure 5B, 3mg de PVP supplémentaires ont été ajoutés dans les extraits 1, 2 et 4. Chaque barre représente les moyennes des 3 répétitions techniques des dosages, les barres d'erreur correspondent aux écart-types.

Conclusion

Le pool de sucres stockés dans les organes ligneux de la vigne est constitué majoritairement d'amidon. Les sucres solubles, en particulier le saccharose, représentent toutefois une contribution significative au pool total et ne peuvent être ignorés. Les méthodes de référence d'extraction 'Ethanol' ou 'Ethanol-Eau' des sucres solubles s'avèrent problématiques dans le cas de tissus ligneux, du fait de la présence d'éthanol et de polyphénols qui inhibent les dosages enzymatiques. L'extraction des sucres solubles à l'eau est une solution si on ne dose que les sucres solubles, mais n'est pas envisageable si l'on dose également l'amidon. Afin de pouvoir quantifier simultanément les sucres solubles et l'amidon, une extraction 'Ethanol-Eau' suivie d'une purification au PVP a été identifiée comme la solution la plus pertinente (Tableau 4). Le pourcentage final d'éthanol est compatible avec le dosage enzymatique des sucres et peut ainsi être réalisé directement sur les extraits. La purification grâce à un traitement au PVP en quantité suffisante (jusqu'à 6 mg / 600 μ L d'extrait pour les racines) permet d'éliminer les polyphénols qui interfèrent avec les dosages. Les réactifs chimiques utilisés ne sont pas toxiques pour les utilisateurs et ne génèrent que peu de déchets chimiques.

Tableau 4. Bilan schématique des préconisations pour l'extraction et la purification d'extraits de bois et de racines de vigne en vue du dosage des sucres solubles et de l'amidon par une méthode enzymatique.



Perspectives

Dans cette étude, il a été montré que l'extraction avec un solvant 'Ethanol-eau' était pertinente. L'extraction se fait aujourd'hui en trois étapes, il pourrait être intéressant d'étudier des variations du ratio éthanol/eau pour ne faire l'extraction qu'en deux étapes.

Remerciements

Je tiens à remercier ici, Mmes Kelly ZARKA et Lucie DUCORNET, stagiaires de deuxième année de BTS Biotechnologie et BTS Bio-analyses et contrôles pour leurs contributions à certaines des expérimentations présentées ici et à de nombreux autres tests complémentaires qui, bien qu'ils ne fassent pas partie de cette publication, ont été déterminants dans la compréhension des processus en jeu.

Je tiens également à remercier Mme Anne PELLEGRINO et M. Florent PANTIN, enseignants-chercheurs à Montpellier-SupAgro pour leurs nombreuses corrections et propositions ainsi que l'équipe du « Cahier des Techniques ».

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA).



<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Le Cahier des Techniques de l'Inra », la date de sa publication et son URL).

Bibliographie

1- Gomez L, Jordan M O, Adamowics S, Leiser H et Pagès L (2003) Du prélèvement au dosage : réflexions sur les problèmes posés par la mesure des glucides non structuraux chez les végétaux ligneux. Cahiers Agricultures. Vol. 12 : 369-386.

2- Holzapfel B P, Smith J P, Field S K, Hardie W J (2010) Dynamics of carbohydrate reserves in cultivated grapevines and vine growth. Horticultural Reviews. Vol. 37 : 143-211.

- 3- Zufferey V, Murisier F, Vivin P, Belcher S, Lorenzini F, Spring J I et Viret O (2012) Réserves en glucides de la vigne (cv. Chasselas): influence du rapport feuille-fruit. *Revue suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture*. Vol. 44 : 216-225
- 4- Quentin A G et al. (2015) Non-structural carbohydrates in woody plants compared among laboratories. *Tree Physiology*. Vol. 35 : 1146–1165.
- 5- Landhäusser S M, Chow PS, Turin Dickman L, Furze M E, Kuhlman I, Schmid S, Wiesenbauer J, Wild B, Gleixner G, Hartmann H, Hoch G, McDowell N G, Richardson A D, Richter A, Adams HD (2018) Standardized protocols and procedures can precisely and accurately quantify non-structural carbohydrates. *Tree Physiology*. Vol. 38 : 1764–1778
- 6- Degli Agosti R (1985) Etude du contenu en sucres de l'épinard (*Spinacia oleracea* L. cv. Nobel) et d'autres plantes, pendant la variation de photopériode. Thèse de doctorat : Univ. Genève, 1985, no. 2174
- 7- Edwards EJ, Downie A.F. et Clingeleffer P.R. (2011) A simple microplate to quantify nonstructural carbohydrates of grapevine tissues. *American Journal of Enology and Viticulture*. 62 : 382-385.
- 8- Loomis W D, Battaile J (1966) Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochemistry*. Vol. 5 : 423-438
- 9- Hendrix DL, Peelen KK (1987) Artifacts in the analysis of plant tissues for soluble carbohydrates. *Crop Science*. Vol. 27 : 710-715
- 10- Gomez L, Rubio L, Auge M (2002) A new procedure for extraction and measurement of soluble sugars in ligneous plants. *Journal of Science of Food and Agriculture*. Vol. 82 : 360-369.

Dosage du GFS en microplaque (Protocole UMR PSH Avignon)

Glucose – Fructose - Saccharose

Toutes les préparations de réactifs sont à faire sous la hotte.

Préparation de la plaque 96 puits (possible la veille en la laissant couverte à 4°C) :
Dans chaque puits, mettre 150µL de standard ou d'échantillon (extrait Ethanol-Eau)

Préparation des enzymes le jour du dosage :

S1 Pour 1 plaque

Dans un tube de 2 mL, peser 25 mg de NAD et ajouter 1.25 mL d'eau ultra-pure

Dans un tube de 2mL, peser 125mg de NaHCO₃.

Dans un tube de 15 mL (noté S1), peser 125 mg d'ATP. Verser le NaHCO₃ en poudre dans le tube contenant l'ATP et ajouter 1.25 mL d'eau ultra pure.

Y ajouter rapidement le NAD en solution.

Ajouter 10 mL de tampon Triéthanolamine (TEA) pH 7.6

= 12.5 mL au total, 9.6mL sont nécessaires.

(références Sigma Aldrich NAD: 10127981001 ; NaHCO₃ : S8875-500G ; ATP : 10127523001-5G ;)

S2 (glucose) Pour 1 plaque

Dans un tube de 5 mL :

33µL G6PDH (Référence Sigma : 10165875001 – 1000U – 1mL)

33µL HexoKinase (Référence Sigma : 11426362001 – 1500U – 1mL)

940µL (NH₄)₂SO₄ (Référence Sigma : A4418)

2 mL d'eau ultra-pure

= 3mL au total , 1.920 mL sont nécessaires

Mettre **100 µL de S1 dans chaque puits** et faire une lecture à 340 nm : DO_A

Ajout de **20µL de S2 dans chaque puits**. Laisser la plaque couverte à l'obscurité à température ambiante. Faire une lecture 2h30 à 3h00 après : DO_B

La lecture s'arrête là pour le dosage de l'amidon en équivalent glucose.

S3 (fructose) Pour 1 ou 2 plaques

20µL PGI (phosphogluco-Isomérase) + 14 mL d'eau ultra-pure (Référence Sigma : 10128139001 – 10 mg / ML)

Ajout de **20 µL de S3 dans chaque puits**. Laisser la plaque couverte à l'obscurité à température ambiante. Faire une lecture 1h à 1h30 après : DO_C

S4 (saccharose) Pour 1 plaque

15mg de β -fructosidase + 3mL d'eau ultra-pure (Référence Sigma : I4504 – Invertase 300U/ mg)

Ajout de **20 µL de S4 dans chaque puits**. Laisser la plaque couverte à l'obscurité à température ambiante. Faire une lecture 3h après : DO_D

Préparation des tampons :

Tampon Triéthanolamine pH 7.6 (pour S1) - Se conserve 3 semaines à 4°C

Peser 11.18 g de TEA/HCL (Référence Sigma TEA/HCL : T1502-250G)

Tarer un tube avec bouchon. Mettre le réactif sous la hotte dans le tube, fermer le tube et peser.

Sous hotte, transférer la poudre dans une bouteille 250mL à l'aide d'un entonnoir sans ajouter d'eau. Rincer l'entonnoir avec un peu d'eau ultra-pure.

+ 0.5g de MgSO₄·7H₂O

Ajouter environ 60mL d'eau ultra-pure

Ajuster le pH à 7.6 avec NaOH 1M (presque 20mL)

Compléter à 100mL .

(NH₄)₂SO₄ - Sulfate d'ammonium 2.5M (pour S2) - Se conserve à 4°C

Peser 33.4 g de (NH₄)₂SO₄ PM 132.14g/mol (Référence Sigma : A4418)

Tarer un tube avec bouchon. Mettre le réactif sous la hotte dans le tube, fermer le tube et peser.

dans 100mL d'eau ultra-pure

Gamme étalon :

Préparer une solution-mère des 3 sucres : glucose - fructose - saccharose à 2 g/l pour chacun.

Peser 0.2 g de chaque sucre dans 100mL d'eau ultra-pure. (conserver à -20°C)

Points de gamme : (stock à conserver à -20°C)

0.066 g/l dilu 1/30 de la sol mère 2g/l

0.033 g/l dilu au ½ de la 0.066g /l

0.017 g/l dilu au ½ de la 0.033 g/l

ou bien dilu au 1/4 de la 0.066g/l

0.008 g/l dilu au ½ de la 0.017 g/l

dilu au 1/8 de la 0.066g/l

0.004 g/l dilu au ½ de la 0.008 g/l

dilu au 1/16 de la 0.066g/l

0.002g/l dilu au ½ de la 0.004 g/l

dilu au 1/32 de la 0.066g/l

Annexe 2

Extraction de l'amidon à partir de poudres végétales
Protocole UMR PSH Avignon

Toutes les préparations de réactifs sont à faire sous la hotte.

NB : Si l'extraction d'amidon est faite le jour même ou le lendemain, conserver les culots à -20°C tels quels. Si l'extraction d'amidon ne peut pas être faite rapidement après l'extraction des sucres solubles, conserver les culots dans 50µl d'éthanol 100% si l'extraction se fait la semaine suivante ou dans 200µl d'éthanol 100% si l'extraction est encore plus tardive. Dans tous les cas les culots sont à conserver à -20°C. Il faudra ensuite évaporer l'éthanol au Speed-Vac avant de procéder à l'extraction ci-dessous.

Sur le culot restant après l'extraction des sucres solubles

Ajouter 500µL d'eau milliQ. Ne pas vortexer.

Percer les bouchons avec une aiguille.

Envelopper les portoirs avec du papier absorbant + papier alu. Les numéroter. Les emballer dans des sacs autoclavables et fermer au soude-sac.

Autoclave 120°C – 1h30.

Cette étape sous pression et chaleur permet le ramollissement des tissus, la lyse cellulaire et le débobinage des molécules d'amidon. L'amidon est accessible pour l'étape suivante.

Ajouter 150µL d'amyloglucosidase 35U/mL (ref sigma 10113 1G – 120U/mg) Reprendre l'enzyme dans du tampon acétique (voir en fin de document). Laisser tiédir avant de mettre l'enzyme autour des 60°C.

Vortexer

Bain à sec 56°C , 1h30 (ou bain marie)

Bain à sec 100°C , 5 minutes (ou bain marie)

Laisser refroidir 5 minutes

Centrifuger 5 minutes à 4°C 13000 Tr/min (mettre la centrifugeuse dans la chambre froide)

Récupérer le surnageant. Stocker à -20°C (ou à 4°C si dosage le lendemain)

Dosage du glucose sur microplaque (voir dosage des sucres glucose-fructose-saccharose) Attention, le volume d'extraction est ici de 650µL.

Tampon acide acétique :

400mL d'eau ultra-pure

12 g d'acide acétique glacial (100%) liquide

4.9 g de NaOH (soude)

Normalement ce mélange est à pH 4.6. Si besoin ajuster avec HCl ou NaOH.

Ajuster à 500mL.