

Quelques données physico-chimiques à propos de l'acide β -indolyl-acétique

Par

Paul-Emile PILET & Marguerite ATHANASIADIS-MERCANTON

Laboratoire de Phytobiologie de l'Université de Lausanne (Suisse)

Avec 4 figures

Reçu le 14 mai 1959

L'amélioration des méthodes d'extraction des auxines à partir de tissus végétaux et l'analyse systématique de l'absorption de substances de croissance par les cellules et les organes des plantes ont mis en évidence un certain nombre de facteurs physico-chimiques jouant un rôle essentiel dans ces phénomènes et dont l'importance a souvent été négligée. C'est l'étude sommaire de deux de ces facteurs (solubilité et dissociation) qui fera précisément l'objet de ce travail consacré à l'acide β -indolyl-acétique (ABIA).

Solubilité

Quelques solvants. L'ABIA est facilement soluble dans l'acétone, l'éther, le chloroforme, l'alcool éthylique et le chlorure d'éthylène, à froid comme à chaud. Il est relativement soluble à chaud dans l'alcool butylique et difficilement soluble dans le benzène bouillant. Il est insoluble à froid dans le toluol, le formol et le xylol. Depuis les premiers travaux qui portèrent sur l'emploi d'ABIA cristallisé, cette substance a toujours été considérée comme difficilement soluble dans l'eau.

Méthodes de dissolution aqueuse. Un certain nombre de techniques ont été proposées pour préparer des solutions aqueuses d'ABIA, nous ne les citerons pas ici (Voir entre autre LARSEN 1955 et LINSER & KIERMAYER 1957). Pour cette étude, nous avons repris une technique proposée ailleurs (PILET 1951) et qui consiste à dissoudre l'ABIA sous forme de sel de K (I) et mis au point une méthode (II) de préparation directe d'ABIA sous forme d'acide libre.

Méthode I: On broye quelques cristaux d'ABIA en présence de 2 ml de KHCO_3 0,1 M. Le bécher est placé sur une plaque chauffante (35°C). L'opération, qui se déroule à l'obscurité et qui dure 15 mn environ, a pour effet de transformer l'ABIA en son sel de K, fortement dissocié et plus soluble. On peut traiter ensuite par HCl (LARSEN 1955) pour ramener

cette solution à un pH physiologique, mais cette méthode est délicate car suivant la quantité d'acide utilisé, l'ABIA peut reprécipiter.

Méthode II: On dissout l'ABIA pur dans de l'eau distillée (pH 5,6) par agitation électromagnétique (obscurité). Pour obtenir une solution de 0,2 mg/ml, il faut attendre au moins 120 mn.

Comparaison des méthodes: Après dissolution de l'ABIA, nous avons comparé le titre des solutions ainsi préparées en procédant à un dosage colorimétrique et en utilisant un réactif chimique basé sur la réaction de SALKOWSKI et dont la composition et l'emploi ont été décrit ailleurs (PILET 1957). Les essais ont porté sur des solutions de 50 γ /ml, préparées 15 mn avant les analyses; les résultats qui figurent dans le tableau I montrent, aux erreurs d'expérience près, que ces méthodes sont comparables. La seconde méthode nous permet en plus d'obtenir de l'ABIA pur et non son sel de K.

Tableau I

Comparaison (dosage colorimétrique) du titre de solutions aqueuses d'ABIA (50 γ /ml) préparées sous forme de sel de K (méthode I) ou d'acide libre (méthode II)

Méthode	Mesures colorimétriques après:			
	60 sec.	120 sec.	480 sec.	
I	1.	125	170	224
	2.	127	190	236
	3.	124	179	231
II	1.	125	183	228
	2.	120	181	226
	3.	124	187	245

Recherche de la solubilité approximative: Nous avons réalisé deux séries d'essais:

Essai I: nous préparons, à l'aide de la méthode II, un certain nombre de solutions d'ABIA (200 à 900 γ /ml); on dilue ensuite ces solutions de manière à ce que leur titre théorique soit compris dans les limites de la courbe étalon. A intervalles réguliers, on prélève quelques ml de chacune de ces solutions et on les dose colorimétriquement. Si les valeurs obtenues continuent à augmenter, c'est que la dissolution n'est pas complète. Dès l'instant où ces résultats sont constants, on peut admettre que la dissolution est achevée et on reporte alors (points isolés) ces valeurs sur le graphique. Les résultats qui sont donnés dans la fig. 1 montrent que cette méthode est satisfaisante. Ajoutons que si l'on continue à agiter les solutions, on remarque que les valeurs colorimétriques baissent, il s'agit ici d'une destruction (oxydation) de l'ABIA.

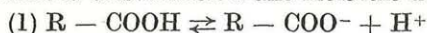
Essai 2: nous mettons un excès d'ABIA (35 mg) dans 25 ml d'eau et nous contrôlons le titre toutes les 60 mn par la méthode précédente. Au bout de 6 h d'agitation, les valeurs obtenues au colorimètre sont devenues constantes. La solution ainsi préparée et maintenue à + 1° C à l'obscurité, a conservé pendant plus de 24 h son titre.

En conclusion, nous avons obtenu par la méthode II une solution approximativement saturée d'ABIA dont la concentration était de 1600 γ /ml. On peut donc dire que la solubilité de l'ABIA dans l'eau (obscurité, 26° C, agitation électromagnétique) après 6 h de dissolution est de 1,6 mg/ml, soit $9,14 \cdot 10^{-3} \text{ M}^1$.

Etant donné la solubilité dans l'eau relativement forte de l'ABIA, on aurait pu la déterminer d'une façon plus rigoureuse en utilisant par exemple la méthode proposée par MATELL 1953 et BURSTRÖM, SJÖBERG & HANSEN 1956 pour la recherche de la solubilité de certaines substances de croissance. Encore aurait-il fallu, dans ce cas, travailler sous atmosphère d'azote.

Dissociation

Constante de dissociation (K^*): On peut représenter schématiquement la dissociation d'une molécule d'ABIA de la façon suivante:



pour simplifier, posons:



la valeur de la constante de dissociation apparente ²⁾ sera:

$$(3) K^* = \frac{[\text{A}^-] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{AH}]}$$

d'où

$$(4) \log K^* = \log [\text{H}^+] + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{AH}]}$$

Par analogie avec la définition du pH:

$$(5) \text{pH} = - \log [\text{H}^+]$$

on peut écrire

$$(6) \text{pK}^* = - \log K^*$$

ce qui donne:

$$(7) \text{pK}^* = \text{pH} + \log \frac{[\text{AH}]}{[\text{A}^-]}$$

¹⁾ Remarquons qu'un certain nombre d'essais furent négatifs, car après un temps relativement court, il apparaissait une coloration rose (uroroséine?) prouvant la dégradation partielle de l'ABIA.

²⁾ Précisons qu'il ne sera fait mention ici que de K^* et non de la constante de dissociation thermodynamique K .

On peut constater, d'après cette formule, que lorsque la dissociation est de 50%, c'est-à-dire que $[AH] = [A^-]$, le pH est égal au pK^* ($= 4,75$). Diverses méthodes ont été employées pour la détermination du pK^* de substances de croissance dissoutes: mentionnons les mesures physico-chimiques de MATELL 1953, de BURSTRÖM, SJÖBERG & HANSEN 1956 et de MATELL & LINDENFORS 1957. Au sujet de l'ABIA, peu de travaux ont été consacrés à la recherche de son pK^* , citons pourtant les expériences de DOLK & THIMANN 1932 qui, bien qu'anciennes, demeurent toujours celles qu'on cite à propos de ces questions:

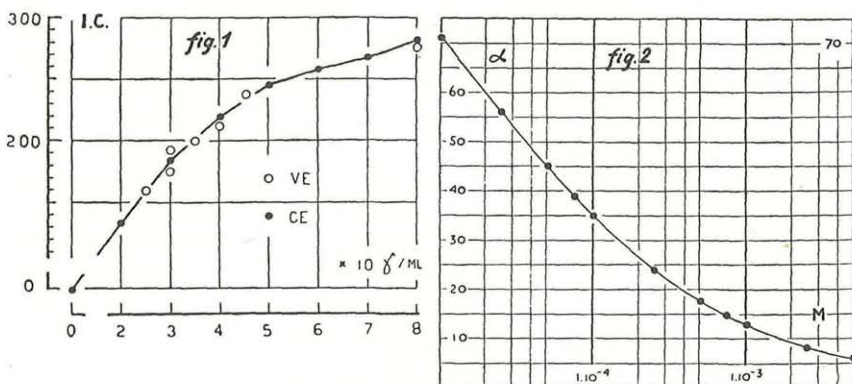


Fig. 1. Indice colorimétrique (IC) en fonction de la concentration de l'ABIA (en $\gamma \cdot 10/ml$). CE: courbe étalon. VE: points obtenus par dilution des solutions préparées par agitation électro-magnétique.

Fig. 2. % de dissociation (α) de l'ABIA pur en solution aqueuse en fonction de sa concentration moléculaire (M).

Une solution aqueuse d'ABIA tamponnée, agitée en présence d'éther fraîchement distillé, donne un extrait étheré d'autant moins actif (Test biologique) que le pH est plus haut. Pour un pH compris entre 5 et 7, cette activité devient même nulle. Ainsi seul l'acide libre passe dans l'éther tandis que les ions de l'acide dissocié, ainsi qu'une certaine quantité d'acide non dissocié qui dépend du coefficient de partage entre l'éther et l'eau, demeurent dans la solutions aqueuse. DOLK & THIMANN, partant de considérations théoriques que nous ne rapporterons pas ici, obtiennent pour le pK^* de l'ABIA, la valeur suivante:

$$pK^* = 4,75$$

ce qui donne pour K^*

$$K^* = 1,78 \cdot 10^{-5} \text{ } ^1)$$

Cette valeur a été adoptée, par un certain nombre d'auteurs dont BONNER 1934 fut l'un des premiers. AVERY, BERGER & SHALUCHA 1941

¹⁾ Cette valeur est pratiquement la même que celle de CH_3COOH ($K^* = = 1,8 \cdot 10^{-5}$).

confirment indirectement les résultats précédents en montrant qu'on peut améliorer l'extraction aqueuse des auxines en travaillant à un pH élevé (par exemple, 9,8). GORDON & NIEVA 1949, en étudiant l'effet du pH sur la récupération par l'éther de l'ABIA en solution aqueuse, arrivent à des conclusions identiques en montrant que c'est à un pH de 2,8 environ qu'on obtient le maximum d'ABIA.

Mentionnons que SIMON & HELBRONNER ont, sur notre demande et par une méthode rigoureuse, déterminé en suivant la technique de SIMON 1958 le pK^* de l'ABIA. Les valeurs obtenues ont été données pour le solvant suivant: méthylcellulose (80%) + eau (20%). Il eût été sans doute préférable de connaître le pK^* pour de l'eau, mais il n'est pas inutile de savoir l'état de dissociation de l'ABIA dans un „substrat“ somme toute assez proche de celui que constitue la membrane cellulaire. Voici les valeurs trouvées:

$$pK^* = 7,21 \quad K^* = 6,16 \cdot 10^{-8}$$

Ces données indiqueraient que la membrane faciliterait, de part sa structure chimique, la régression de la dissociation de l'ABIA.

Degré de dissociation (α): En utilisant les symboles de (2) nous pouvons écrire:

$$(8) \quad \alpha = \frac{[A^-]}{[AH] + [A^-]}$$

Il nous faut distinguer entre le degré de dissociation de l'ABIA pur et celui de l'ABIA qui serait dissous en présence de substances étrangères (par exemple en solution tampon).

Dans le premier cas, α ne dépend que de la concentration C de l'ABIA et de son K^* , et la loi de dilution d'OSTWALD nous permet d'écrire:

$$(9) \quad K^* = \frac{\alpha^2 \cdot C}{1 - \alpha}$$

d'où l'on tire

$$(10) \quad \alpha = \frac{\sqrt{K^* (K^* + 4C)} - K^*}{2C}$$

La fig. 2 donne les valeurs théoriques de α (en %) en fonction de C (en M). On peut voir par exemple que pour $\alpha = 50\%$, la concentration d'ABIA est égale à $3,56 \cdot 10^{-5}$ M.

Dans le second cas, α dépend de la concentration des (H^+), donc du pH, et de K^* , et la loi d'action de masse nous permet d'écrire en reprenant (3) et (8):

$$(11) \quad K^* = [H^+] \cdot \frac{\alpha}{1 - \alpha}$$

d'où l'on tire

$$(12) \quad \alpha = \frac{K^*}{[H^+] + K^*}$$

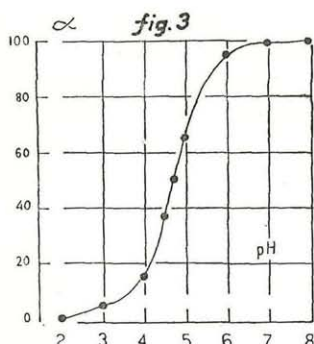


Fig. 3. % de dissociation (α) de l'ABIA en fonction du pH de la solution dans laquelle il est dissous.

La fig. 3 donne les valeurs théoriques de α (en %) en fonction du pH.

Étant donné le pH et la concentration C d'ABIA d'une solution tamponnée, il peut être utile de connaître la concentration des molécules d'ABIA non dissociées $[AH]$, présentes dans la solution. Certains auteurs (DOLK & THIMANN 1932, BONNER 1934, SANTEN 1938 et BENNET 1955...) ont en effet insisté sur l'importance de ces questions en signalant par exemple que l'ABIA devait pénétrer dans les cellules essentiellement sous forme de molécules non dissociées.

Si l'on reprend la formule (3), on peut poser :

$$[A^-] = C - [AH]$$

et l'on a :

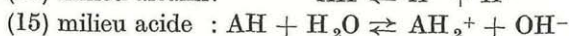
$$K^* = \frac{(C - [AH]) \cdot [H^+]}{[AH]}$$

ce qui nous donne :

$$(13) \quad [AH] = \frac{C \cdot [H^+]}{K^* + [H^+]}$$

Pour une concentration de $3 \cdot 10^{-5}M$ et un pH de 5,5, la formule précédente nous permet de trouver $[AH]$ qui vaut $4,52 \cdot 10^{-6}M$ ou $-\log [AH] = 5,345$. A l'aide de la formule précédente, on peut reporter graphiquement les valeurs de $[AH]$ en fonction de $[H^+]$ et de C . Pratiquement, on exprimera ces trois grandeurs au moyen de leur logarithme changé de signe (Fig. 4). En reprenant l'exemple précédent, on trouvera rapidement que $-\log [AH] = 5,35$.

Point isoélectrique (pHi): L'ABIA est, d'après ce qui précède, un acide relativement dissocié; pourtant sa structure nous conduit à lui supposer un caractère d'ampholyte faiblement basique. Des recherches (GUERN 1958) consacrées à l'analyse par électrophorèse de composés indoliques semblent confirmer cette hypothèse. Nous introduirons les équations suivantes; voir (2):



Nous aurons ainsi deux constantes de dissociation, l'une pour la forme acide (K^*_a) et l'autre pour la forme basique (K^*_b), qu'on obtient comme précédemment (3)

$$(16) K^*_a = \frac{[A^-] \cdot [H^+]}{[AH]}$$

$$(17) K^*_b = \frac{[AH_2^+] \cdot [OH^-]}{[AH]} \quad 1)$$

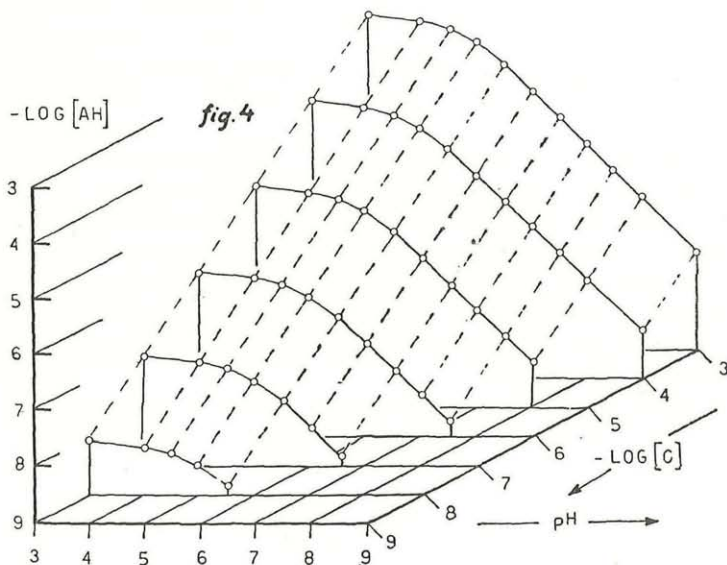


Fig. 4. Relations entre le nombre des molécules non dissociées ($[AH]$), le pH et la concentration totale (C) en ABIA d'une solution tamponnée.

Au point isoélectrique (pHi), $[A^-] = [AH_2^+]$ et l'on a :

$$(18) [H^+] = \frac{K^*_a}{K^*_b} \cdot [OH^-]$$

mais on sait que :

$$(19) [H^+] \cdot [OH^-] = k_e \text{ et } -\log k_e = 14 \quad (22^\circ C)$$

d'où

$$(20) -\log [H^+] = \frac{1}{2} (\log K^*_b - \log K^*_a - \log k_e)$$

mais dans le cas choisi :

$$(21) pHi = -\log [H^+]$$

On peut ainsi trouver :

$$(22) pHi = 7 + \frac{pK^*_a - pK^*_b}{2}$$

¹⁾ La concentration d' (H_2O) est comprise dans la valeur de K_b .

pK^*_a étant égal au pK^* (donc 4,75), pHi ayant été reconnu être voisin de 4,78 (GUERN 1958), on peut trouver pK^*_b et on a calculé qu'il valait 9,19 (soit $K^* = 6,46 \cdot 10^{-10}$), K^*_b étant beaucoup plus petit que K^*_a ; on voit ainsi que la fonction basique de l'ABIA est très faiblement dissociée par rapport à la fonction acide, c'est pourquoi, le plus souvent, l'ABIA est considéré plus comme un acide que comme une substance ampholyte.

Discussion

On ne pourra saisir clairement le mode d'action de l'ABIA que dans la mesure où l'on connaîtra avec précision toutes ses caractéristiques physico-chimiques non seulement dans la solution où on l'a dissous, mais encore au niveau cellulaire. Jusqu'à maintenant peu de travaux ont été consacrés à l'analyse de ces propriétés et les quelques données que nous avons ne concernent que l'ABIA en solution. Les valeurs dont il est fait mention dans le présent travail sont rapportées dans le tableau 2; elles pourront servir de base à la discussion de certains résultats expérimentaux.

Tableau 2

Quelques caractéristiques physico-chimiques de l'ABIA

Solubilité: Constante de solubilité C (dans l'eau, dissolution par agitation électromagnétique, obscurité, 26° C, détermination après 6 h.)

$$C = 9,14 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

Dissociation: Constante de dissociation

1) dans l'eau $pK^* = 4,75$ $K^* = 1,78 \cdot 10^{-5}$

2) dans le solvant: méthylcellulose 80% + eau 20%
 $pK^* = 7,21$ $K^* = 6,16 \cdot 10^{-8}$

Degré de dissociation

pour une concentration de $3,56 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ($pH = pK^* = 4,75$)

$$\alpha = 50\%$$

Point iso-électrique

$$pHi = 4,78$$

$$pK^*_a = 4,75 \quad K^*_a = 1,78 \cdot 10^{-5}$$

$$pK^*_b = 9,19 \quad K^*_b = 6,46 \cdot 10^{-10}$$

Bibliographie

- AVERY G. S., BERGER J. & SHALUCHA B. 1941. The total extractions of free auxins and auxins precursor from plant tissue. *Am. J. Bot.* 28 : 596.
- BENNET M. C. 1955. The influence of the cell membrane on some toxicity effects of growth substances in *Nitella*. *J. exp. Bot.* 6 : 276.
- BONNER J. 1934. The relation of Hydrogen ions to the growth rate of *Avena* coleoptile. *Protoplasma*, 21 : 406.
- BURSTRÖM H., SJÖBERG B. & HANSEN B. A. M. 1956. The plant growth activity of phénoxythioacetic acids. *Acta Agricult. scand.* 6 : 155.

- DOLK H. E. & THIMANN K. W. 1932. Studies of the growth hormones of plants. Proc. natl. Acad. 18 : 35.
- GORDON S. A. & NIEVA F. S. 1949. Biosynthesis of auxins in the vegetative pine-apple. I & II. Arch. Biochem. and Biophys. 20 : 356.
- GUERN J. 1958. Etude comparée des méthodes de séparation et d'extraction des substances de croissance. Dipl. Et. sup. (Sc. nat.), Fac. Sc. Paris.
- LARSEN P. 1955. Growth substances in higher plants. In: PEACH & TRACEY, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, 3 : 565.
- LINSER H. & KIERMAYER O. 1957. Methoden zur Bestimmung pflanzlicher Wuchsstoffe. Wien.
- MATELL M. 1953. Stereochemical studies on plant growth substances. Kungl. Lantbrukshögsk. Ann. 20 : 207.
- & LINDENFORS S. 1957. Thermodynamic dissociation constants of 2-4-dichlorophenoxyacetic acid (2-4, D) and some related plant growth regulators. Acta chem. scand. 11 : 324.
- PILET P. E. 1951. Contribution à l'étude des hormones de croissance (auxines) dans la racine du Lens. Mém. Soc. vaud. Sc. nat. 10 : 137.
- 1957. Dosage photolorimétrique de l'acide β -indolyl-acétique: applications à l'étude des auxines-oxydases. Rev. gén. Bot. 64 : 106.
- SANTEN A. M. H. van. 1938. Influence (ion hydrogen) on the growth rate of the *Avena* coleoptile (preliminary note). Proc. Acad. Sc. Amsterdam, 41 : 513.
- SIMON W. 1958. Zur Microtitration organischer Verbindungen: Standardmethodik für die Microbestimmung von scheinbaren Dissoziationskonstanten im System 80 Gew. Proz. Methylcellosolve/20 Gew. Proz. Wasser. Helvet. chim. Acta, 41 : 1836.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn](#)

Jahr/Year: 1959

Band/Volume: [8_3_4](#)

Autor(en)/Author(s): Pilet Paul Emile, Athanasiades-Mercanton Marguerite

Artikel/Article: [Quelques données physio-chimiques à propos de l'acide \$\beta\$ -indolyl-acétique. 210-218](#)