

50376
1982
139

N° d'ordre : 965

50376
1982
139

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE 3^e CYCLE

par

J. Miryana BURNOUF-RADOSEVICH

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DU *CHENOPODIUM QUINOA* Willd. :
ANALYSE DES SAPONINES TRITERPENIQUES DANS LA PLANTE ET
DANS DES TISSUS CULTIVES *IN VITRO* ; MULTIPLICATION
VEGETATIVE PAR CULTURE D'APEX**



Soutenue le 4 mai 1982 devant la Commission d'Examen :

Membres du Jury :	M.	R. BOURIQUET	Président
	M.	J.C. CHENIEUX	Rapporteur
	M.	R.J. GAUTHERET	Examineur
	Mle	C. PAUPARDIN	Examineur

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Physiologie végétale de l'Université de Lille, sous la direction de Mademoiselle le Professeur C. PAUPARDIN. Il nous est très agréable de lui exprimer notre plus vive reconnaissance pour l'attention constante qu'elle a su réserver à notre étude ainsi que pour les aides efficaces et les conseils autorisés qu'elle nous a donnés, tant dans le domaine de la culture des tissus végétaux "in vitro" que dans celui de l'analyse des métabolites "secondaires".

Nous sommes très heureuse de pouvoir remercier Monsieur le Professeur R. BOURIQUET, directeur du laboratoire de Physiologie végétale, qui assure la présidence de notre jury de thèse. En tant qu'étrangère, et comme d'autres l'ont lieu écrit avant nous, nous tenons à lui exprimer la très profonde et sincère gratitude de celle qu'il a accueillie au laboratoire de Lille.

Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur J.C. CHENIEUX, dont les travaux sur l'élaboration des alcaloïdes par des tissus végétaux font autorité, qui a eu l'extrême amabilité d'accepter la charge de rapporteur; nous lui en sommes vivement reconnaissante.

Nous prions Monsieur le Professeur R.J. GAUTHERET de trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de juger ce travail, malgré les nombreuses charges qu'il assure à l'Académie des Sciences:

Monsieur P. POUILLARD, de la S.C.A. A. MOMONT & Fils, s'est chargé de l'entretien des plantes obtenues végétativement "in vitro"; nous lui exprimons notre amicale reconnaissance.

Par leur aide durant les phases laborieuses de préparation du manuscrit, Mlle Milka RADOSEVICH et Mrs Michel POULLE et Thierry BURNOUF nous ont soutenue efficacement; nous leur adressons nos chaleureux remerciements.

Enfin, que toutes les personnes, et en particulier Mlle Colette BRASSART et Mr Jean DUBOIS, qui, de près ou de loin, nous ont apporté leur concours trouvant ici l'expression de notre reconnaissance.

S O M M A I R E

<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE ET HISTORIQUE</u>	4
<i>I- LES SAPONINES</i>	5
1- Définition.....	5
2- Classification.....	5
2.1- Classification générale.....	5
2.1.1- Basée sur la nature chimique de l'aglycone.....	5
2.1.2- Basée sur le nombre des chaînes de sucres.....	7
2.2- Saponines triterpéniques.....	8
2.2.1- Généralités.....	8
2.2.2- Classification des génines triterpéniques.....	8
2.2.2.1- Triterpènes à structure tétracyclique.....	8
2.2.2.2- Triterpènes à structure pentacyclique.....	10
3- Propriétés.....	12
3.1- Propriétés physico-chimiques.....	12
3.2- Propriétés biologiques.....	13
3.2.1- Effets sur la croissance et le développement.....	13
3.2.2- Activité hémolytique.....	16
3.2.3- Effets thérapeutiques divers.....	17
3.2.4- Effets hypocholestérolémiques.....	17
3.2.5- Action cancérostatique.....	18
3.2.6- Action spermicide.....	18
4- Métabolisme.....	19
4.1- Biosynthèse.....	19
4.2- Biodégradation.....	20
5- Méthodes d'extraction et de purification.....	21
5.1- Les saponines.....	21
5.2- Les sapogénines.....	22

.../...

6- Déterminations qualitative et quantitative...	23
6.1- Méthodes biologiques.....	24
6.1.1- Essais d'hémolyse.....	24
6.1.2- Essai sur <u>Trichoderma viride</u>	25
6.1.3- Essai sur le poisson.....	25
6.2- Méthodes physico-chimiques.....	25
6.2.1- Mesure de la mousse.....	25
6.2.2- Gravimétrie.....	26
6.2.3- Méthodes spectrophotométriques.....	26
6.2.4- Méthodes chromatographiques.....	26
6.3- Méthodes immunochimiques.....	28
7- Détermination de la structure chimique.....	29
II- RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES.....	30
1- Etudes sur l'élaboration des saponines.....	30
1.1- Caractérisation des saponines triterpéniques chez les Chénopodiacées.....	30
1.2- Répartition dans la plante et localisation cellulaire.....	34
1.3- Rôle physiologique.....	35
1.4- Facteurs régulateurs de la biosynthèse..	37
1.4.1- Facteurs externes.....	37
1.4.2- Facteurs internes.....	38
1.5- Elaboration de saponines par des tissus cultivés "in vitro".....	39
1.5.1- Saponines alcaloïdiques et stéroïdiques.....	39
1.5.2- Saponines triterpéniques.....	42
2- Cultures "in vitro" des Chénopodiacées.....	43
<u>MATERIEL ET METHODES</u>	45
I- MATERIEL.....	45

.../...

.../...

II- METHODES.....	45
1- Culture "in vitro" des tissus.....	45
1.1- Germination des graines.....	45
1.2- Obtention des colonies tissulaires.....	46
1.3- Multiplication végétative.....	46
1.3.1- Explantats primaires.....	46
1.3.2- Induction et développement des bourgeons.....	48
1.3.2.1- Milieux étudiés.....	48
1.3.2.2- Modifications étudiées sur le milieu B5.....	48
1.3.2.2.1- Eléments nutritifs.....	48
1.3.2.2.2- Adjonction d'autres éléments.....	49
1.3.2.2.3- Régulateurs de croissance.....	49
1.3.2.2.4- Echantillonnage.....	49
1.3.2.3- Conditions de culture.....	49
1.3.3- Allongement des tiges.....	50
1.3.4- Enracinement.....	50
1.3.5- Transplantation en terre.....	50
2- Etudes des saponines et de leurs génines.....	51
2.1- Méthode d'isolement.....	51
2.1.1- Protocole d'obtention des saponines.....	51
2.1.1.1- Matériel analysé.....	51
2.1.1.2- Extraction et purification....	52
2.1.2- Protocole d'obtention des génines..	53
2.1.2.1- Hydrolyse des saponines.....	53
2.1.2.2- Extraction des génines.....	53
2.1.2.3- Purification des génines.....	54
2.2- Détection.....	54
2.2.1- Chromatographie sur couche mince...	54
2.2.1.1- Essai sur les saponines des graines.....	54
2.2.1.2- Essai sur les sapogénines.....	55

.../...

.../...

2.2.2- Méthode hémolytique.....	56
2.2.2.1- Protocole expérimental.....	56
2.2.2.2- Détermination de la teneur en saponines hémolytiques.....	56
<u>RESULTATS</u>	58
I- CULTURE "IN VITRO" DES TISSUS	58
1- Germination des graines.....	58
2- Induction des colonies tissulaires.....	59
2.1- Action de la Kinétine combinée au 2,4-D.	59
2.2- Action de la Kinétine combinée à l'acide indole-butyrique.....	60
2.3- Action de la Kinétine combinée à l'acide naphthalène-acétique.....	61
3- Multiplication végétative.....	62
3.1- Induction des bourgeons axillaires.....	62
3.1.1- Essai comparatif de trois milieux de culture.....	63
3.1.2- Modifications du milieu B5.....	64
3.1.2.1- Variations apportées aux éléments nutritifs.....	65
3.1.2.1.1- Composés sucrés et dérivé alcool.....	65
3.1.2.1.2- Macroéléments minéraux...	67
3.1.2.1.3- Composés ferreux.....	69
3.1.2.1.4- Mélanges de composés aminés.....	70
3.1.2.2- Adjonction d'adsorbants ou d'anti-oxydants.....	72
3.1.2.3- Action de diverses concentra- tions en régulateurs de croissance.....	73
3.1.3- Comportement d'autres explantats primaires sur le milieu B5 modifié.....	74
3.2- Allongement des tiges.....	74
3.3- Enracinement.....	76

.../...

.../...

3.3.1- Action de l'ANA associé à une cytokinine.....	76
3.3.2- Action des auxines.....	77
3.3.3- Action de retardateurs de croissance.....	78
3.3.4- Milieu dépourvu de substances de croissance.....	78
3.4- Transfert en terre.....	79
II- ETUDES DES SAPONINES DE QUINOA.....	81
1- Analyse qualitative par chromatographie sur couche mince.....	81
1.1- Les saponines des graines.....	81
1.2- Les sapogénines.....	81
1.2.1- Chez la variété Real de Puno.....	83
1.2.1.1- La plante entière.....	83
1.2.1.1.1- Les graines.....	83
1.2.1.1.2- Les racines.....	83
1.2.1.1.3- Les tiges et les feuilles	84
1.2.1.2- Les tissus cultivés "in vitro"	84
1.2.1.2.1- Les bourgeons.....	84
1.2.1.2.2- Les colonies tissulaires.	86
1.2.2- Chez la variété Blanca de Junin....	86
1.2.2.1- La plante entière.....	86
1.2.2.1.1- Les graines.....	86
1.2.2.1.2- Les racines.....	86
1.2.2.1.3- Les tiges et les feuilles	88
1.2.2.2- Les tissus cultivés "in vitro"	88
1.2.2.2.1- Les bourgeons.....	88
1.2.2.2.2- Les colonies tissulaires.	88
1.2.3- Analyse comparée.....	88
2- Dosage semi-quantitatif par la méthode hémolytique.....	89
2.1- Courbe d'étalonnage.....	89
2.2- Matériel végétal.....	89

.../...

.../...

2.2.1- Echantillons frais.....	91
2.2.2- Matériel lyophilisé.....	93
2.2.3- Extraits bruts.....	93
<u>CONSIDERATIONS GENERALES</u>	95
<u>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	111
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	113

GLOSSAIRE

AMO-1618	:	chlorure de méthyl de 2-isopropyl-4diméthyl amino-5méthyl phényl-1pipéridinecarboxylate
AIA	:	acide indole-acétique
AIB	:	acide indole-butyrique
ANA	:	acide naphtalène-acétique
AG	:	acide gibbérellique
6-BA	:	6-benzyladénine
BJ	:	Blanca de Junin
CCC	:	chlorure de (2-chloroethyl)triméthyl ammonium
2,4-D	:	acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
Kin.	:	kinétine
LB	:	Liebermann-Burchard
MS	:	Murashige et skoog
N°	:	nombre
ppm	:	partie par million (mg/l)
RP	:	Real de Puno
S.C.	:	substance de croissance
var.	:	variété

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le Chenopodium quinoa est une plante très répandue dans les régions andines où elle est cultivée pour l'alimentation humaine. Ses graines sont employées comme céréale depuis des siècles.

L'intérêt de cette plante réside :

-a- dans la nature et la qualité des protéines de la graine. La teneur en protéines est, en moyenne, de 14 % (WEBER, 1978), et la composition en acides aminés, particulièrement bien équilibrée, est en valeur nutritionnelle comparable à celle des protéines du lait (WHITE et al., 1955 ; QUIROS-PEREZ et ELVEHJEM, 1957). Enfin, la proportion d'acides aminés essentiels est égale à 48 % (GORBITZ et LUNA DE LA FUENTE, 1965), en particulier, le contenu en lysine est, ainsi, deux fois supérieur à celui du grain de blé entier (MAHONEY et al., 1975).

-b- dans la qualité alimentaire des protéines des feuilles qui, préparées sous forme de concentré, sont d'une très bonne valeur nutritionnelle pour la consommation humaine, quelles que soient les conditions climatiques des lieux de culture (OSTROWSKI-MEISSNER et al., 1980).

-c- dans ses qualités culturales. Par sa grande souplesse d'adaptation à différents sols, sa grande résistance au froid et à la sécheresse, la quinoa peut croître à des altitudes élevées (2000 à 4000 mètres) (WEBER, 1978). De plus, elle présente un bon rendement en graines (de 1000 à 3000 kgs/ha, en moyenne) (REA et al., 1979).

Ces nombreuses qualités suscitent, principalement en Bolivie et au Pérou, des programmes d'amélioration par sélection génétique classique qui n'en sont qu'à leurs débuts mais qui visent à accroître les rendements de la plante, tout en conservant ses qualités nutritionnelles. Dans ce but, des collections d'écotypes sauvages et cultivés ont été établies (GANDARILLAS, 1979).

Toutefois, les tentatives faites à ce jour pour développer la

culture de cette plante et la consommation de ses graines se heurtent à deux obstacles :

1- La quinoa, qui se multiplie par graines, est un végétal amphidiploïde à hérédabilité de type disomique (SIMMONDS, 1971). La fécondation n'est pas strictement autogame, d'autant qu'une même plante peut présenter des fleurs hermaphrodites, femelles ou mâle-stériles. Aussi, l'homogénéité génétique des variétés nouvellement créées se maintient-elle difficilement.

2- Cette Chénopodiacee élabore des saponines triterpéniques, détectées dans les téguments des graines ; on attribue à ces glucosides la responsabilité du goût amer des semences (BOITEAU et al., 1964). L'élimination des saponines, réalisée industriellement par lavages répétés des graines, pose des problèmes technologiques pour l'obtention de la farine de quinoa (BROWN et PARISER, 1975 ; TAPIA et al., 1979).

Il nous a paru intéressant d'étudier cette plante selon deux orientations qui mettent en oeuvre la méthode des cultures "in vitro" :

1- Nous avons choisi de définir, dans une première phase de ce travail, les conditions de culture "in vitro" adaptées à la multiplication végétative du Chenopodium quinoa. Un tel système peut permettre de maintenir des clones ou des variétés dans un relatif état d'homogénéité génétique et de les reproduire en grand nombre si la nécessité se fait jour; de la même façon, la mise en place d'une banque de génotypes intéressants pourra s'établir, évitant, ainsi, les pertes de matériel que les conservations classiques occasionnent (WESTCOTT et al., 1977).

2- Dans une deuxième partie, nous avons analysé les glucosides de nature triterpénique présents dans les plantes, et comparé graines, tiges, feuilles et racines. Parallèlement, ces mêmes substances ont été recherchées dans des tissus cultivés "in vitro" et comparées à celles détectées dans les plantes d'origine. Ces travaux ont pour objectif une meilleure connaissance de l'en-

semble de ces composés synthétisés par le Chenopodium quinoa, afin de détecter la substance triterpénique (ou les substances triterpéniques) responsable de l'amertume des graines et éventuellement, de sélectionner des lignées pauvres en saponines. Le souci de l'élimination de ces substances ne doit toutefois pas faire perdre de vue les rôles biologiques et pharmacodynamiques de ces métabolites dits secondaires.

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

et

HISTORIQUE

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE ET HISTORIQUE

Exception faite du remarquable ouvrage de BOITEAU et al. (1964), voué, il est vrai, exclusivement aux triterpénoïdes, il n'existe que peu de revues bibliographiques exposant de façon exhaustive les caractéristiques chimiques et physiologiques des saponines.

Il nous est donc apparu utile de définir cette famille de substances, d'en présenter une classification à la fois simple et la plus complète possible. On gardera à l'esprit que la découverte de composés nouveaux est susceptible de modifier cette classification. Nous accorderons une attention particulière aux propriétés biologiques de ces composés. Certaines méthodes d'analyse seront décrites. Nous nous attacherons, enfin, aux recherches de physiologie portant sur la formation des saponines et leur élaboration par des tissus cultivés "in vitro".

I- LES SAPONINES

1- Définition

Ces composés qui sont l'apanage des Echinodermes dans le monde animal sont, par contre, très répandus dans le règne végétal. Ils constituent des produits du métabolisme dit secondaire.

D'un point de vue chimique, les saponines sont des glucosides dont l'aglycone est appelé sapogénine, ou, plus simplement, génine ; celle-ci peut être de nature stéroïdique, stéroïde-alcaloïdique (stéroïde renfermant un atome d'azote dans le cycle) ou triterpénique.

Les saponines possèdent des propriétés physico-chimiques et biologiques particulières. On peut, ainsi, les caractériser par leur capacité à former une mousse stable en solution aqueuse agitée ou par leurs propriétés hémolytiques.

Ces substances naturelles sont caractéristiques d'une espèce, d'une variété, voire, d'un organe et de son stade de développement.

2- Classification

TSCHESCHE et WULFF (1973) ont proposé une classification des saponines, soit en trois groupes, en considérant la nature chimique de l'aglycone, soit en deux, en se rapportant au nombre de chaînes de sucres présentes.

2.1- Classification générale

2.1.1- Basée sur la nature chimique de l'aglycone

- Saponines stéroïdiques

Les glucosides appartenant à ce groupe sont constitués par un aglycone dérivant du noyau cyclopentano-hydrophénanthrène, formé par 27 atomes de carbone.

Commercialement, ces saponines sont utilisées comme précurseurs des corticostéroïdes, des hormones sexuelles et des contraceptifs oraux.

Parmi les sources végétales les plus em-

ployées pour la synthèse des stéroïdes à propriétés pharmacodynamiques, on peut citer les espèces cultivées ou sauvages de Dioscorea, chez lesquelles le principe actif est concentré dans les tubercules. La recherche de nouvelles sources de diosgénine fait l'objet d'études plus récentes menées sur, les graines de Trigonella foenum-graecum et les rhizomes de Costus speciosus (BLUNDEL et al. 1975).

La présence des saponines stéroïdiques est fréquente dans les familles végétales suivantes : Dioscoriaceae, Liliaceae, Solanaceae, et Scrophulariaceae.

Chez les plantes, les stérols, qui sont donc les précurseurs des saponines stéroïdiques, peuvent aussi, par oxydation, se transformer en glucosides cardiotoniques ; ces derniers sont d'une grande valeur médicale par leur effet stimulateur de l'activité cardiaque. Les glucosides cardiotoniques sont, eux aussi, constitués par un noyau stéroïde qui est libéré lors d'une hydrolyse acide ou enzymatique. Ils sont subdivisés en trois types : les Cardénolides, par exemple la digoxigénine, les Bufadiénolides, comme la scillarénine. Les Digiténolides, bien que dépourvus d'activité cardiotonique, sont également, par leur structure chimique, rangés dans cette deuxième classe (MANITTO, 1981). Les Cardénolides ont été jusqu'à présent, détectés chez les familles suivantes : Apocynaceae, Liliaceae, Ranunculaceae, et Scrophulariaceae.

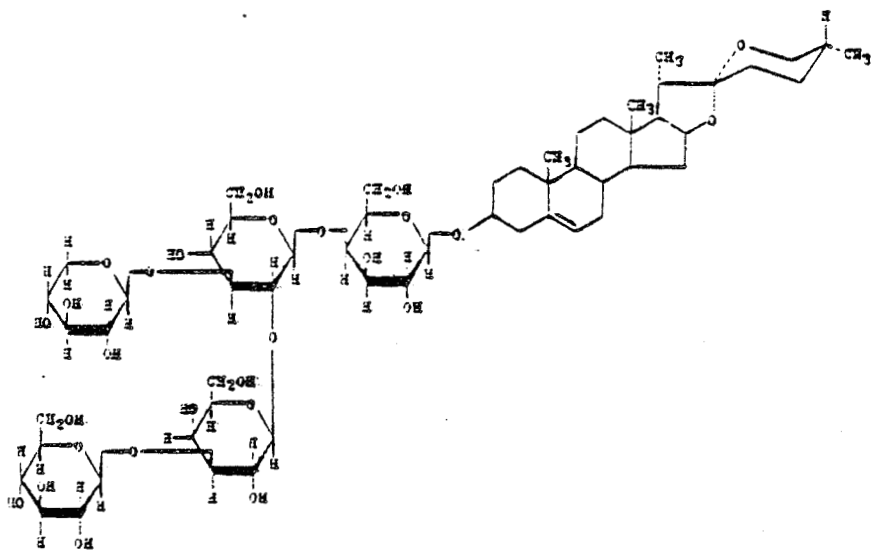
- Saponines stéroïde-alcaloïdiques

Elles comprennent un noyau stéroïde portant un atome d'azote et une partie glucidique composée d'une combinaison de sucres commune aux saponines stéroïdiques et triterpéniques.

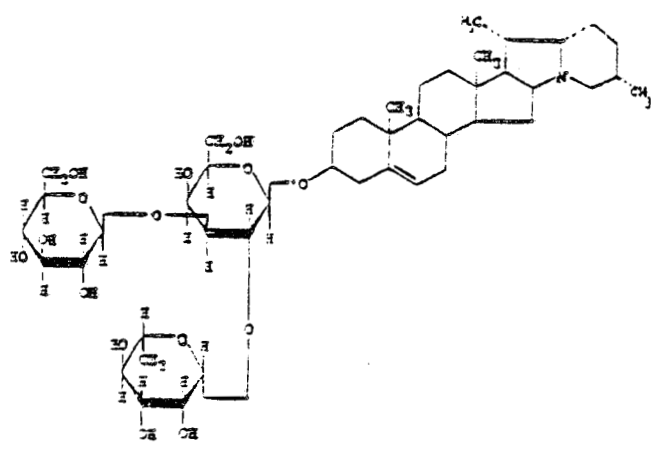
Ainsi, il existe deux glucosides principaux chez Solanum tuberosum appelés solanine et chaconine ; ils ont le même aglycone, dénommé solanidine (KUHN et LOW, 1954), mais différant par une molécule de sucre : le D-galactose à la place du L-rhamnose.

Des composés voisins, comme la tomatine, qui a pour génine la tomatidine, sont aussi identifiés dans les fruits immatures de Solanum lycopersicum. Cette saponine est d'a-

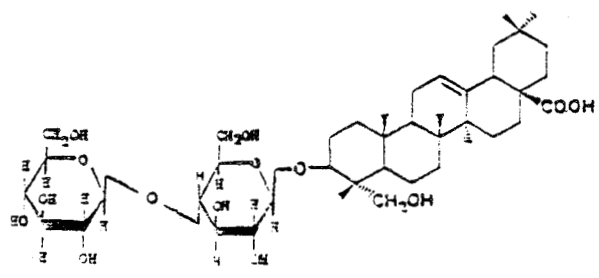
SAPONINES CLASSEES PAR LA NATURE CHIMIQUE DE LEUR GENINE



SAPONINE STEROIDIQUE (Digitonine)



SAPONINE STERODE-ALCALOÏDIQUE (Solanine)



SAPONINE TRITERPENTIQUE (Glucoside de l'hédragénine)



bord élaborée dans les feuilles puis transportée vers les fruits (RODDICK, 1974a).

Il faut noter que certains auteurs considèrent ces mêmes substances comme des alcaloïdes, les désignant plus précisément sous le terme de glycoalcaloïdes (ZITNAK et JOHNSON, 1970 ; RODDICK, 1974a). Leurs propriétés s'apparentent cependant à celles des saponines (JELLEMA et al., 1981).

- Saponines triterpéniques

Cette classe de saponines est caractérisée par la présence d'un aglycone à 30 carbones dérivant du triméthylnaphtalène. Trouvées dans plus de cinq cents genres (VILLAR, 1948 ; BIRK, 1969), elles constituent la majorité des saponines synthétisées par la nature.

2.1.2- Basée sur le nombre des chaînes de sucres

* Saponines monodesmosidiques

Ces substances n'ont qu'une seule chaîne de sucres, quelle que soit la nature de la génine. Cette chaîne, généralement liée au carbone 3 de l'aglycone, peut avoir une à dix unités d'oses. Elles présentent toutes les propriétés physico-chimiques et biologiques des saponines, la capacité d'abaisser la tension superficielle étant la seule propriété commune avec les saponines bidesmosidiques.

* Saponines bidesmosidiques

Deux chaînes de sucres existent chez les composés de ce groupe : l'une d'elles est liée au C3 de l'aglycone l'autre, soit au C26 dans le cas des saponines stéroïdiques, soit au C28 chez les saponines triterpéniques. Parmi ces dernières, nous pouvons mentionner le trichoside A, mis en évidence chez Gypsophylla trichotoma (LUCHANSKAYA et al., 1971).

Leur hydrolyse est réalisée facilement "in vivo"

lors de la blessure ou de l'attaque d'une plante par un agent pathogène. Il est important de noter qu'elles se transforment alors en saponines monodesmosidiques, développant alors une toxicité vis à vis de l'agent infectieux.

2.2- Les saponines triterpéniques

2.2.1- Généralités

Les propriétés manifestées par les saponines triterpéniques, dont la connaissance reste par ailleurs incomplète, ont stimulé l'intérêt des chercheurs pour l'étude des effets curatifs possédés par certaines plantes (MITA et al., 1979 ; POTTER et al., 1979 ; TAKAGI et al., 1980 ; MALINOW et al., 1981).

Au sein d'un même végétal, les saponines existent souvent en mélange et, après hydrolyse, donnent un ou plusieurs aglycones et des molécules de sucres en nombre et en composition divers. Ces variations, aussi minimes soient-elles, confèrent aux saponines leur spécificité. Les chaînes de sucres, fréquemment ramifiées, sont plus généralement liées à l'aglycone par des liaisons C-glucosidiques.

Les sucres suivants sont souvent présents : le D-glucose, le D-xylose, le L-arabinose et le L-rhamnose du clématoside A (KHORLIN et al., 1967) ; le D-galactose et l'acide D-galacturonique dans la saponine B de Koelreuteria paniculata (CHIRVA et al., 1970) ; l'acide D-glucuronique et le L-fucose du dianthoside C (BUKHAROV et al., 1971).

2.2.2- Classification des génines triterpéniques

2.2.2.1 Triterpènes à structure tétracyclique

La quasi-totalité de ces triterpènes dérive du noyau cyclopentanophénanthrène, à l'exception des onocérines qui s'apparentent plutôt aux triterpènes pentacycliques (OURISSON et CRABBE, 1961).

MANITTO (1981) signale que cette classe de triterpènes, en premier lieu le lanostérol et ses dérivés stéroïdiques, est plus fréquente chez les animaux.

Les triterpènes tétracycliques possèdent un grand intérêt, particulièrement dans le domaine pharmaceutique, par leur ressemblance avec les stéroïdes.

- Le groupe dammarane

Les études des relations entre la composition chimique particulière de ces composés et leurs activités biologiques ont été un des thèmes de préoccupation des chercheurs ces dernières années. Indiscutablement, les saponines de ginseng, remarquables par la variété de leurs propriétés (BOITEAU et al., 1964 ; HIAI et al., 1979) en sont une illustration parfaite.

Les ginsénosides sont isolées de plusieurs espèces de Panax à partir des racines ou des parties aériennes. Ces glucosides sont principalement composés de deux aglycones : Le 20(S)-protopanaxadiol et le 20(S)-protopanaxatriol (TANAKA, 1977). Du fait de leur instabilité en milieu faiblement acide, ces sapogénines sont respectivement transformées, lors de leur obtention, en panaxadiol et panaxatriol (SHIBATA et al., 1962).

Récemment, de nouvelles saponines (les pseudoginénosides F8 et F11) ont été purifiées des feuilles de Panax pseudoginseng sous-espèce himalaïcus (TANAKA et YAHARA, 1978).

Les glucosides de l'acide mollique détectés dans les feuilles de Combretum molle (PEGEL et ROGERS, 1976) ainsi que la jujubogénine et la pseudojujubogénine trouvées chez une plante médicinale, Bacopa monneria (KAWAI et SHIBITA, 1978), font aussi partie de ce groupe.

- Le groupe lanostane

Une partie des génines de ce groupe est élaborée par des animaux marins ; leur présence paraît être l'exclusivité des seuls Echinodermes puisqu'elle n'a été détectée que chez les étoiles de mer et les holothuries. Astérosaponines et holothurines sont les appellations habituelles de ces glucosides (NIGRELLI, 1952 ; HASHIMOTO et YASUMOTO, 1960).

D'autres saponines provenant des holothuries sont également identifiées : la cucumarioside C trouvée chez

Cucumaria frandatrix et les stichoposides A et C produites par Stichopus japonicus.

Chimiquement, ce sont des glucosides sulfatés portant une fonction lactone (18--->20) qui est considérée comme étant rare au sein des composés triterpéniques (AGARWAL et RASTOGI, 1974).

Les holothurines sont, comme les astérosaponines, des métabolites fortement hémolytiques et cytolytiques pouvant intervenir dans les mécanismes de défense de l'organisme. D'autre part, les variations quantitatives des astérosaponines dans les gonades d'Asterias rubens évoquent un rôle possible dans la reproduction (VOOGT et HUISKAMP, 1979).

Les végétaux, quant à eux, élaborent un petit nombre de saponines dérivées du lanostérol. A titre d'exemple des cucurbitacines ont été isolées des fruits de Momordica charantia (OKABE et al., 1980), ainsi que des graines et des plantules de Cucurbita maxima (CATTEL et al., 1979).

- Le groupe onocérane

Numériquement, il s'agit d'un groupe apparemment plus restreint, peu de composés s'y rattachant ayant été identifiés, jusqu'ici, dans la nature. Il serait constitué uniquement par deux représentants : les α et β -onocérines isolées des racines d'Ononis spinosa (OURISSON et CRABBE, 1961).

Dans une publication récente, TSUDA et al. (1980) rangent ces deux génines au sein du groupe serratane qui comprend plus de 30 triterpènes mis en évidence dans le genre Lycopodium.

Par sa structure, il annonce le groupe des triterpènes pentacycliques.

2.2.2.2 Triterpènes à structure pentacyclique

Possédant également des propriétés pharmacologiques, ces triterpènes sont, contrairement aux saponines tétracycliques, plus fréquemment répandus dans le règne végétal.

Ils peuvent se trouver à l'état libre ou bien, comme c'est le cas le plus souvent, combinés aux molécules de sucres, constituant ainsi les saponines.

Etant donné la complexité de structure de ces composés, une classification stricte est difficile à établir. Les diverses classifications utilisées jusqu'à présent ne sont pas rigoureuses et sont remises en cause lors de l'identification de nouvelles molécules. Pour notre part, nous avons retenu celle suivie par CONOLLY (1979).

- Le groupe oléanane

Tous ces glucosides triterpéniques dérivant de la β -amyrine sont rassemblés dans ce groupe.

Les génines les plus connues sont l'acide oléanolique (AOKI et al., 1976) ou ses dérivés (MASOOD et al., 1981). Les sojasapogénols (GESTETNER et al., 1966), l'acide médicagénique accumulé chez Médicago sativa (GESTETNER, 1971), les hédéragénines concentrées dans les feuilles de Hedera helix (SCHLOSSER, 1973), les cyclamirétines détectées chez Cyclamen hederifolium, l'acide échinocystique (KONOSHIMA et al., 1980), l'acide glycyrrhétique (LYTHGOE et TRIPPETT, 1960 ; MARSH et LEVY, 1956), etc...

- Le groupe ursane

Il comprend les composés dérivant de la α -amyrine tels que l'acide ursolique (BUKHAROV et KARNEEVA, 1970), l'acide quinovique chez Cinchona calisaya (BASU et RASTOGI, 1967) de même que les acides iflaionique et dulcioique de Scoparia dulcis (MAHATO et al., 1981).

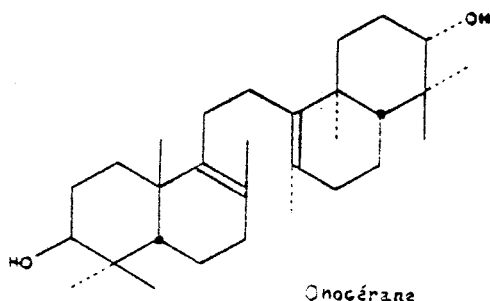
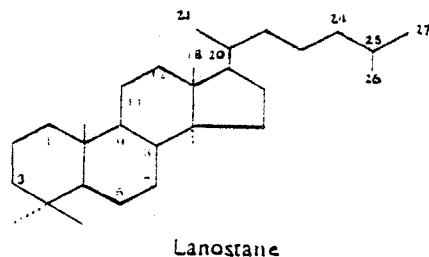
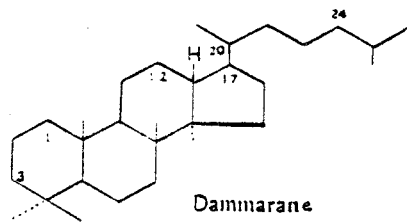
- Le groupe lupane

Ces génines, dérivant de l' α -lupène sont très limitées dans la nature.

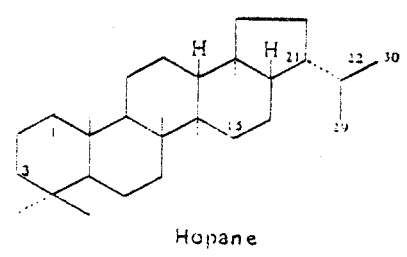
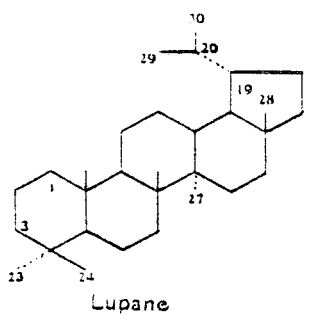
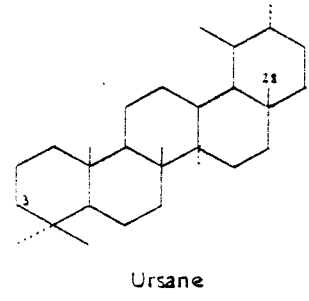
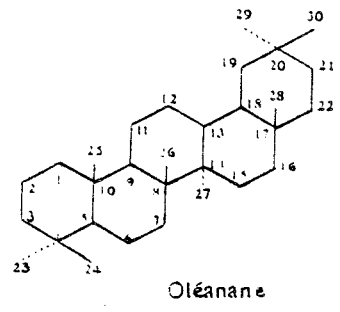
La bétuline, aglycone des saponines de Sophora japonicus (SOKOL'SKAYA et MAGZUMOV, 1958) et l'acide bétulinique identifié chez Lavandula dentata (KHALIL et al., 1979) appartiennent à ce groupe ; de même, la thurbérogénine et la stellatogénine présentes chez les cacti géants de la sous-tribu Cereanae (SHAVER et al., 1964).

- Le groupe hopane

En 1964, PELLETIER et al. signalent l'existence de deux composés : les mollugogénols A et B. Quelques autres substances ont été isolées également ; ainsi en est-il de la



GENINES TRITERPENIQUES A STRUCTURE TETRACYCLIQUE



GENINES TRITERPENIQUES A STRUCTURE PENTACYCLIQUE

spergulagénine A extraite des racines de Mollugo spergula (KITA-GAWA et al., 1975).

3- Propriétés

3.1- Propriétés physico-chimiques

Les saponines peuvent avoir un goût très amer ; ceci constitue un obstacle pour l'utilisation alimentaire et fourragère de certaines espèces qui les renferment mais qui, par ailleurs, peuvent être retenues pour leur richesse en protéines (VARMA et SINGH, 1979) ou bien pour leur résistance aux insectes (RICE et al., 1981).

Les propriétés mentionnées ci-dessous s'appliquent aux saponines monodesmosidiques, sauf mention particulière ; en effet, on retiendra des saponines bidesmosidiques leur seule propriété intéressante décelée à ce jour, qui est celle d'abaisser la tension superficielle des liquides, caractéristique qu'elles possèdent en commun avec les saponines monodesmosidiques.

Ces composés, une fois purifiés, se présentent sous la forme d'une poudre blanchâtre à structure généralement amorphe. Ces glucosides sont difficilement cristallisables et peu dialysables (BIRK, 1969) puisqu'ils forment des pseudo-solutions dans l'eau.

Leur molécule comprend une partie hydrophobe et une partie hydrophyle. Cette structure bipolaire confère aux saponines le caractère moussant des détergents. La stabilité de la mousse formée en solution aqueuse agitée dépend du pH (MANGAN, 1959).

Les propriétés de précipitation des saponines par les acétates de plomb neutre et basique sont à la base de l'ancienne distinction faite entre les saponines acides (précipitant avec l'acétate basique) et les saponines neutres (précipitant avec l'acétate neutre). Une autre caractéristique est leur propriété de se combiner avec certains réactifs en donnant un dérivé coloré. Ces réactifs sont généralement composés d'acide sulfurique, de tétrachlorure stanneux, d'acide phosphotungstique ou de trichlorure d'antimoine (BOITEAU et al., 1964).

Les saponines monodesmosidiques, ainsi que les saponines bidesmosidiques ont la capacité de réduire la tension superfi-

cielle des liquides, propriété qui permet de les employer pour la stabilisation des émulsions (KREMNEV et KUIBINA, 1957).

Enfin, ces composés glucosidiques sont capables de former des complexes insolubles avec les stérols et les stéroïdes comme le cholestérol. Les saponines sont parfois isolées au moyen de stérols d'origine animale ou végétale (GESTETNER et al., 1971).

3.2- Propriétés biologiques

L'extrême richesse des propriétés biologiques des saponines découle de la diversité de leur structure et de leurs fonctions substituantes. Vouloir effacer cette diversité pour accorder à chaque saponine une même panoplie d'effets biologiques serait abusif. Toutefois, les saponines extraites de différentes sources végétales ont tendance à présenter certaines propriétés biologiques communes.

3.2.1 Effets sur la croissance et le développement

- Chez l'homme

D'une façon générale, les saponines présentent une action irritante sur les muqueuses. La sensibilité de l'homme à l'ingestion des saponines est heureusement limitée par la plus grande résistance et la faible perméabilité aux saponines de l'endothélium gastro-intestinal. Néanmoins, l'influence des saponines sur la physiologie humaine est manifeste.

La réglisse, qui est employée dans l'alimentation ou dans des préparations pharmaceutiques contre les maux d'estomac, contient une saponine triterpénique, appelée acide glycyrrhizinique. Il peut provoquer la formation d'oedèmes en cas d'administration prolongée et à dose élevée. Cet effet sur les muqueuses membranaires s'estompe dès l'arrêt de sa consommation (REVERS, 1956).

D'autre part, l'ingestion de certains aliments riches en saponines cause des intoxications aiguës. Ainsi, naguère, la consommation de pain contenant des quantités importantes de graines d'Agrostemma githago (la nielle, "mauvaise herbe" compagne des céréales et particulièrement riche en saponines) se traduisait par l'apparition de vertiges, de vomissements, voire, un état

comateux (BOITEAU et al., 1964).

Certaines saponines possèdent des activités icterogéniques ; elles agissent par blocage de l'excrétion des pigments biliaires chez les cellules hépatiques en affectant la perméabilité membranaire. Une saponine icterogène extrêmement toxique est contenue dans une espèce de Madagascar, le Kalanchoe schizophylla (BOITEAU et al., 1964).

Chez les enfants, l'ingestion de quantités même minimales de saponines peut entraver les synthèses protéiques surtout lorsque l'apport nutritionnel en acides aminés est juste suffisant (BOITEAU et al., 1962).

- Chez les animaux

Les animaux d'élevage nourris avec certains fourrages ou divers types de graines peuvent présenter des anomalies de croissance. PETERSON (1950) les attribue aux saponines de la luzerne.

Des pertes de poids peuvent se produire ; elles traduiraient soit une réduction de l'absorption du cholestérol (KODRAS et al., 1951), soit un simple rejet par les animaux d'une nourriture présentant l'amertume (BOITEAU et al., 1964).

Le ralentissement de la croissance peut s'expliquer par l'inhibition de certains enzymes comme l'illustrent les études de CHEEKE et OLDFIELD (1970). Les enzymes digestifs peuvent être aussi partiellement, altérés comme cela a été établi en présence de saponines de soja (ISHAAYA et BIRK, 1965).

La réponse à une même dose de saponine présente dans la ration alimentaire varie énormément d'une espèce animale à l'autre. On constate ainsi que, nourries avec de la luzerne, les volailles sont plus sensibles que les lapins ou les rats, les porcs n'étant pas affectés (CHEEKE, 1971). Il est donc probable que la toxicité de ces produits est liée tant à la nature chimique de la saponine qu'à la sensibilité propre de l'espèce animale. Mais, on retiendra aussi les possibilités d'accoutumance constatées depuis longtemps chez les animaux habitués à consommer progressivement d'importantes quantités de saponines (BOITEAU et al., 1964)

L'action des saponines sur les animaux à sang

froid paraît plus marquée ; ainsi les poissons et les batraciens sont frappés par des intoxications aigues, voire mortelles, sous l'action sur les branchies des saponines dissoutes dans l'eau (JONES et ELLIOT, 1969), à tel point que, jadis, ces propriétés ichtyotoxiques furent employées comme poisons de pêche dans l'Océan Indien.

- Chez les végétaux

La très large répartition des saponines à travers les groupes taxinomiques les plus divers, leur apparition éventuelle à certains stades de développement, l'élaboration possible de composés différents au sein des organes d'une même plante s'opposent à l'idée que ces substances soient inutilisables par la plante. Grâce à quelques travaux, on a, à présent, un meilleur aperçu de l'influence des saponines exogènes sur la croissance et le développement des végétaux.

BALANSARD et PELLISIER (1943) signalent une stimulation ou une inhibition de la germination selon les concentrations de saponines employées ; mais, chez le blé, le maïs, la tomate et le pois, les effets peuvent se poursuivre pendant la croissance végétale.

Les travaux de HELMKAMP et BONNER (1953) démontrent que la vitesse de croissance des embryons isolés de blé ou de pois s'accroît en présence de saponines (stéroïdiques).

Par contre, l'action des saponines semble plutôt inhibitrice de la croissance des racines comme on l'observe chez la tomate ou l'orge. On rapporte aussi une nécrose de l'apex racinaire de l'oignon sous l'effet des holothurines (HEFTMANN, 1963).

Plus récemment, HUI et ZEE (1980) constatent une augmentation du pourcentage de régénération et une vigueur accrue des plantules régénérées lorsque des explantats de Brassica oleracea sont cultivés "in vitro" en présence d'extraits de ginseng.

- Chez les microorganismes

Les champignons présentent une sensibilité marquée. Divers types de saponines sont fongicides ou fongistatiques

(WOLTERS, 1968).

Parmi les bactéries sensibles à quelques saponines, MAIZEL et al., (1964) mentionnent le Mycobacterium tuberculosis inhibé par l'avénacine.

D'autre part, rares sont les saponines aux propriétés anti-virales. C'est pourtant le cas d'une saponine concentrée dans les feuilles de Gymnema sylvestre (SINSHEIMER et al., 1968).

3.2.2- Activité hémolytique

L'une des propriétés qui caractérisent le mieux les saponines est certainement leur pouvoir hémolytique. Cette capacité de lyser les globules rouges est liée à l'altération de la perméabilité cellulaire des hématies, par combinaison des saponines avec les stérols membranaires (GLANERT, 1962).

Chez les animaux, les saponines administrées par voie orale perdent leur activité hémolytique ; on imagine qu'elles subissent une hydrolyse menée par la microflore intestinale (GESTETNER, 1968) ou bien que, n'étant pas dialysables, elles ne sont que très peu absorbées par les parois de l'intestin.

Des relations entre certaines caractéristiques structurales des saponines et leurs capacités hémolytiques semblent exister. D'après SCHLOESSER et WULFF (1969) les activités les plus élevées sont observées chez les composés présentant des groupements polaires sur le cycle A de la génine et des groupements moins polaires sur les cycles D et/ou E.

La présence d'une chaîne de sucres sur les cycles D ou E supprime le pouvoir hémolytique (cas des saponines bidesmosidiques). Parallèlement, l'effet hémolytique des saponines monodesmosidiques diminue avec la longueur et la ramification de la chaîne glucidique (ROMUSSI et al., 1980).

Notons, en outre, que parfois la génine n'est pas aussi hémolytique que la saponine correspondante. L'absence de molécule de sucre réduirait l'absorption de la saponine par la membrane de l'hématie ; l'action hémolytique ne commencerait qu'ultérieurement, après hydrolyse enzymatique de la saponine (SEGAL et al., 1974).

A ce jour, et ainsi que le constate déjà CHEEKE (1971), aucune relation n'a pu être établie entre les effets hémolytiques des saponines et leurs autres propriétés biologiques.

3.2.3- Effets thérapeutiques divers

Depuis quelques années, les propriétés thérapeutiques des saponines ont attiré la curiosité des chercheurs. Parmi les plus remarquables, on retiendra les activités anti-inflammatoires (SUGA, 1978 ; KIZU et al., 1979 ; TAKAGI, 1980 ; FORGACS et PROVOST, 1981) et anti-diabétiques (OKABE et al., 1980 ; MAHATO et al., 1981) illustrées par l'usage de certaines plantes en médecine traditionnelle : Asparagus gonocladus (MANDLOI et SANT, 1981) ; Gleditsia japonicus (OKADA et al., 1980) ; etc...

D'autres effets ont été mentionnés tels que vermifuges (OKABE et al., 1980), stimulants ou inhibiteurs de la réponse immunitaire (MITA et al., 1979), diurétique et expectorant (OKADA et al., 1980 ; KONOSHIMA et al., 1981), adjuvant des vaccins (AGARWALL et RASTOGI, 1974), sédatif (BECCHI et al., 1979), fébrifuge (ENCARNACION et al., 1981) et analgésique (KIZU et TOMIMORI, 1979).

3.2.4- Effets hypocholestérolémiques

Outre ces effets thérapeutiques, certaines saponines, en premier lieu les dérivés des triterpènes pentacycliques réduisent la teneur en cholestérol des mammifères et d'autres vertébrés.

Ainsi, la saponine de Gypsophila (de même que la digitonine) abaisse le niveau de cholestérol sanguin des poulets (MORGAN et al., 1972).

SAUTIER et al., (1979) trouvent que les saponines de soja favorisent l'excrétion des stérols neutres et diminuent le taux en cholestérol du foie et de l'aorte des rats. De même, des singes auxquels on procure une alimentation riche en lipides, mais contenant aussi des saponines de racines de luzerne, ne présentent pas d'augmentation du taux de cholestérol plasmatique (MALINOW et al., 1977a).

De l'expérimentation menée par MALINOW et al. (1977b) chez le rat, il ressort que les saponines agissent probablement en réduisant l'absorption intestinale du cholestérol et en augmentant l'excrétion des acides billaires.

Plus tard (1980), ces mêmes auteurs mettent en évidence que l'ingestion de graines de luzerne, pendant trois semaines peut abaisser sensiblement le contenu en cholestérol sanguin des êtres humains, sans qu'apparaissent des signes de toxicité. Extrapolant à l'homme les résultats qu'ils observent sur le porc, qui constitue un bon modèle d'études du fait de la similitude des lipoprotéines humaines et porcines, TOPPING et al. (1980) suggèrent que la consommation d'aliments riches en saponines soit à même de réguler le taux de cholestérol humain des adultes, pour autant que, nous semble-t-il, des effets secondaires néfastes ne soient pas observés.

3.2.5- Action cancérostatique

Certaines saponines manifestent une activité antitumorale. C'est le cas de l'holothurine qui ralentit la multiplication des cellules du sarcome 180 chez les souris (NIGRELLI 1952).

Il est intéressant de signaler que les saponines de Cyclamen persicum ralentissent la croissance des cellules dérivant d'un carcinome humain de la zone naso-pharyngée (HARVALA et HYLANDS, 1978).

3.2.6- Action spermicide

Comparant les propriétés spermicides de trois saponines stéroïdiques et de trois saponines triterpéniques, ELBARY et NOUR (1979) établissent que la saponine de Gypsophila paniculata présente l'activité la plus élevée ; à la concentration de 1% en solution aqueuse, elle tue les spermatozoïdes humains en trois minutes et demie. Les auteurs ajoutent que cette saponine n'a qu'une faible action irritante sur les muqueuses membranaires.

Les saponines stéroïdiques des racines de Phyto-

lacca americana, ainsi qu'un glucoside triterpénique de Gleditsia horrida présentent le même type d'action (SHAABAN et AHMED, 1959 ; CHOU et al., 1971).

4- Métabolisme

4.1- Biosynthèse

Il existe peu de travaux touchant à la biosynthèse des saponines. La formation de l'aglycone débute très probablement par l'acétyl-Coenzyme A ; en effet, l'incubation des graines de soja en germination dans un substrat contenant de l'acétyl-Coenzyme A marqué au ^{14}C permet de mettre en évidence la répartition de ce composé radioactif au niveau des sapogénines et des stérols (ARIGONI, 1958).

Un composé à six carbones, l'acide mévalonique est formé ensuite. Cette substance est employée comme précurseur marqué dans deux milieux d'incubation : l'un contenant des graines de soja en germination et l'autre de jeunes plantules de luzerne. La radioactivité est incorporée dans les sapogénoles chez le soja et, essentiellement, dans l'acide médicagénique chez la luzerne (PERI et al., 1979).

Un intermédiaire, le farnésyl pyrophosphate, conduit à la formation du squalène qui subit des cyclisations successives catalysées par des cyclases. D'après WEETE (1973), ces réactions s'effectuent selon des processus différents chez les champignons et les végétaux supérieurs.

Le squalène est, dans les cellules végétales, rapidement transformé en 2,3-époxy-squalène ; ce dernier composé subit des cyclisations pour donner le protostérol.

D'après MULHEIRN (1980) par deshydrogénation du protostérol se forment ensuite soit le lanostérol, qui est à l'origine des stérols chez les animaux, soit le cycloarténol, composé dont dérivent les phytostérols et les triterpènes chez les organismes photosynthétiques.

Les études de la biosynthèse des triterpènes dans les feuilles de Calendula officinalis montrent que la cyclisation du squalène, à l'origine de la synthèse de la β -amyrine, s'effectue

dans le réticulum endoplasmique des feuilles. La β -amyrine est ensuite transformée par oxydation en acide oléanolique, qui, après glucosidation, peut-être :

-transporté sous forme de pentaglycoside, vers les racines où il s'accumule dans le cytosol ;

- ou bien incorporé dans le plasmalemma ou la paroi cellulaire (JANISZOWSKA et KASPRZYK, 1977).

Des expériences "in vitro" ont mis également en évidence que le réticulum endoplasmique intervient dans la synthèse des triterpènes : ELDER et al. (1977) incubent le 2,3-époxy-squalène en présence d'une fraction microsomale obtenue à partir des cellules de Ruscus fruticosus en suspension ; les analyses des produits d'incubation confirment la formation de la α -amyrine.

On pense que le noyau de type alcaloïdique dérive de celui de type stéroïdique, de même conformation chimique (DEFAGO, 1977) ; l'origine de l'atome d'azote est encore inconnue.

D'autre part, il est possible que les saponines soient synthétisées par chaque organe végétal de façon indépendante. Prenons comme exemple les racines d'Avena sativa qui produisent des saponines monodesmosidiques de nature triterpénique, alors que les feuilles élaborent des saponines bidesmosidiques à noyau stéroïdique (LUNING et SCHLOSSER, 1976).

De même, en étudiant la distribution des saponines dans des fractions chromatographiques obtenues de cultivars de Medicago sativa BERRANG et al. (1974) s'aperçoivent qu'il n'y a pas deux fractions identiques, ce qui suggère un mécanisme de biosynthèse spécifique à chaque cultivar.

SUGA et al. (1980) envisagent la possibilité d'une participation des acides aminés dans la biosynthèse des triterpènes. Ces chercheurs trouvent, chez les graines en germination de Pisum sativum, une incorporation de la L-leucine et de L-valine marquée dans le squalène et la β -amyrine, confirmant les travaux de RUDNEY (1959).

4.2- Biodégradation

Les saponines subissent un processus de biodégradation qui se manifeste lors de la sénescence végétale. La dégradation est produite par l'hydrolyse enzymatique de la molécule de saponi-

ne elle-même, ou par décomposition de la sapogénine (ZACHARIUS et al., 1975).

A titre d'exemple, les plants de tomate ne dégradent la tomatine qu'après le début de la maturation des fruits, stade physiologique où le système enzymatique correspondant est probablement synthétisé ou activé (HEFTMANN et SCHWIMMER, 1972).

Les mécanismes cataboliques ne sont pas encore éclaircis.

5- Méthodes d'extraction et de purification

5.1- Les saponines

Préalablement à l'extraction, le matériel contenant les saponines est soumis à une délipidation par des solvants non polaires tels l'hexane, l'éther éthylique ou l'acétone qui extraient simultanément une grande partie des pigments (SHANY et al., 1970 ; AOKI et al., 1981 ; FORGACS et PROVOST, 1981).

L'extraction proprement dite de ce type de substances naturelles implique l'emploi de solvants à polarité moyenne ou très forte tels que les alcools ou mieux, de gradients alcooliques en solutions aqueuses ; ces derniers permettent une extraction efficace des mélanges de saponines présentant une polarité relativement différente au sein d'une même plante ou d'un même organe (BASU et RASTOGI, 1967).

La solubilité de ces glucosides est accrue avec la température ; c'est pourquoi, ils sont généralement extraits à chaud dans un système à reflux par exemple (KUSZLIK-JOCHYM et MAZUR, 1973 ; KIZU et TOMIMORI, 1979).

A la fin de cette étape, on obtient un extrait brut qui contient en plus des saponines, des sucres, des composés phénoliques simples ou complexes (LUTOMSKI et NHAM, 1977b) et des pigments divers (ASADA et al., 1980) en quantités plus ou moins importantes selon l'origine du matériel. Si on cherche à isoler et à quantifier les saponines, il convient d'éliminer ces substances contaminantes en purifiant l'extrait au moyen de procédés chimiques ou physico-chimiques. Une façon simple consiste à utiliser l'éther éthylique en milieu alcoolique concentré qui précipite les saponines (BARUA et BASAK, 1972).

L'étape suivante correspond au passage de l'extrait sur des colonnes contenant des absorbants (MORRIS et al., 1961), des résines échangeuses d'ions (JACKSON et SHAW, 1959), ou encore de gels de tamisage moléculaire (PASCUAL TERESA et al., 1980).

Cependant, l'emploi des solvants chimiques ou de la chromatographie sur absorbants pour la purification des saponines ne constitue pas une panacée ; ainsi, la purification chimique des glucosides triterpéniques de Ficaria ranunculoïdes n'élimine pas complètement les autres sucres (POURRAT et al., 1979). Aussi, ces mêmes auteurs expérimentent-ils une méthode qui, bien que longue peut-être intéressante ; elle consiste à cultiver des souches de champignons sur des substrats contenant l'extrait brut. On tire ainsi profit de la capacité de ces microorganismes à consommer sélectivement les sucres libres présents dans l'extrait.

Différentes saponines sont le plus fréquemment présentes, en mélange, dans une même plante ; dans ce cas, l'isolement de chacune d'elles est réalisé par les techniques chromatographiques sur couche mince (JURZYSTA et NOWACKI, 1979) ou sur colonne (LUTOMSKI et NHAM, 1977b).

5.2- Les sapogénines

Une fois isolées, les saponines sont soumises à une hydrolyse qui libère les génines par rupture des liaisons C-glycosidiques. Trois types d'hydrolyse sont possibles : acide, microbienne et enzymatique.

- L'hydrolyse acide, la plus couramment employée, est pourtant assez délicate à mener. Elle peut entraîner la formation d'artefacts telles que les structures diéniques des saponines (SAUVAIRE et BACCOU, 1978) si l'hydrolyse est intense ou prolongée, mais aussi la libération incomplète des aglycones si elle est partielle. Des hydrolyses partielles mais successives sont préconisées pour caractériser les constituants glucidiques.

Dans certains cas, la mise en oeuvre d'une hydrolyse alcaline permet l'obtention d'une prosapogénine (saponine dépourvue de quelques molécules de sucres) dont on détermine la structure chimique. Dans un deuxième temps, une dégradation poussée par l'hydrolyse acide sert à confirmer les résultats trouvés (KONOSHIMA et al., 1981).

- L'hydrolyse microbienne est réalisée sur des composés instables en milieu faiblement acide ; ainsi, YOSIOKA et al. (1966) séparent les génines intactes des saponines de Panax hydrolysées par les bactéries du sol.

Toutefois, l'efficacité de cette méthode biologique semble liée au choix de la souche bactérienne qui est fonction de la nature chimique des saponines. Des hydrolyses comparatives menées sur un mélange de saponines racinaires de Mollugo spergula indiquent que, si l'hydrolyse bactérienne facilite l'isolement de sapogénines non modifiées, elle n'est pas tout à fait complète (KITAGAWA et al., 1977).

- Pour pallier ces inconvénients, il est possible d'extraire des microorganismes ou des végétaux eux-mêmes, les enzymes hydrolytiques. Leur activité est, ainsi, mieux contrôlée.

L'application de l'hydrolyse enzymatique peut donner des résultats très satisfaisants ; l'hydrolyse des saponines de la luzerne par des β -glucosidases extraites des levures ou d'amandes, permet la récupération des constituants non modifiés puis leur caractérisation chimique (GESTETNER, 1971). D'autres enzymes ont été essayés avec succès : la naringinase sur les saponines de feuilles de Panax japonicus (YAHARA et al., 1978) et l'hespéridinase sur celles de Panax ginseng (YAHARA et al., 1976).

Après hydrolyse, les sapogénines sont extraites du milieu au moyen de solvants apolaires ; le chloroforme est le plus couramment employé. Les composés glucidiques, ainsi récupérés, sont passés au travers d'une colonne d'amberlite (OH^-) pour assurer leur complète neutralisation avant d'être séparés par chromatographie de partage sur papier (AOKI et al., 1976) ou sur couche mince (LEE et DER. MARDEROSIAN, 1981).

6- Déterminations qualitative et quantitative

Les différentes méthodes de détection et de dosage des saponines et de leurs constituants s'appuient sur leurs propriétés physiques, chimiques ou biologiques.

6.1- Méthodes biologiques

6.1.1- Essais d'hémolyse

Pour ce type d'essai, on utilise fréquemment un concentré globulaire obtenu à partir du sang de mammifère. Les méthodes hémolytiques sont pratiquées selon deux protocoles.

- L'hémolyse en tube

On procède généralement de la façon suivante : les saponines à analyser sont diluées dans des solutions isotoniques et mélangées avec un concentré de globules rouges. Après un temps donné, de 30 minutes à plusieurs heures selon la température d'incubation, l'intensité de l'hémolyse est déterminée, après centrifugation, par lecture spectrophotométrique du surnageant à une longueur d'onde de 415 nm (AGUILAR et al., 1979).

Il est aussi possible d'apprécier la concentration en saponines d'un extrait liquide en mesurant l'ampleur de l'hémolyse (volume) d'une solution d'érythrocytes. On définit ainsi l'indice hémolytique caractéristique de chaque type de saponine (KUSZLIK-JOCHYM et MAZUR, 1973).

- L'hémolyse en plaque

Des plaques sont préparées en coulant sur une surface en verre un mélange d'érythrocytes et d'agent solidifiant (gélatine, gélose, etc...) en solution isotonique. Un anneau d'hémolyse apparaît après dépôt dans des puits d'une solution de saponines ; la taille des anneaux est proportionnelle à la quantité de saponines déposées pour une certaine gamme de concentration. Une courbe-étalon est établie à l'aide d'une saponine dont l'activité hémolytique est connue (JURZYSTA, 1979).

Le principe de cette méthode est aussi utilisé pour localiser les composés hémolytiques présents dans un mélange de saponines séparées par chromatographie sur couche mince. Ces composés sont révélés par immersion de la chromatoplaque dans le mélange sang-gélose (LUTOMSKI et NHAM, 1977a).

6.1.2- Essai sur le Trichoderma viride

La croissance de plusieurs espèces de champignon est, à des degrés divers, inhibée en présence de saponines de luzerne ; ZIMMER et al. (1967) constatent que les saponines à la concentration de 2 mg par ml de milieu de culture ralentissent la croissance de tous les champignons étudiés. Toutefois, à la concentration de 1 mg/ml, seule le T. viride est nettement affecté. Cette espèce de Trichoderma est une des plus sensibles à l'action de diverses saponines et sert donc souvent à la détection et au dosage de ces composés. Il faut pourtant garder à l'esprit qu'à une concentration égale ou inférieure à 0,01 mg/ml de milieu, ces glucosides semblent plutôt stimuler la croissance des champignons.

6.1.3- Essai sur le poisson

La teneur en saponines peut être appréciée par l'intensité de leur pouvoir toxique sur les poissons. Le temps de survie, de quelques minutes à quelques heures, d'un poisson placé dans une solution saponinée est déterminé (KOFLER et SCHRUTKA, 1925). Par cette technique, l'indice ichtyotoxique de nombreuses saponines triterpéniques a été établi ; la méthode n'est cependant pas d'usage courant car elle nécessite d'entretenir un matériel animal homogène.

6.2- Méthodes physico-chimiques

6.2.1- Mesure de la mousse

La teneur en saponines d'un matériel végétal est mesuré par la capacité de formation d'une mousse stable apparue après un temps donné d'agitation en solution aqueuse (KOFLER 1922). Cette méthode n'a donné, généralement, que des résultats approximatifs qui résident dans l'imprécision de quelques étapes de l'expérimentation (SCHUTZ, 1942). En outre, la présence dans le matériel analysé d'autres composés ayant des propriétés moussantes ne peut être exclue.

6.2.2- Gravimétrie

Le dosage pondéral est limité aux échantillons suffisamment bien purifiés, disponibles en quantités adéquates (VAN ATTA et al., 1961 ; WALL et al., 1952). Elle implique la mise à disposition d'une masse de matériel végétal importante.

6.2.3- Méthodes spectrophotométriques

La spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet ou le visible peut servir à la détermination quantitative des saponines.

Toutefois, il est souvent nécessaire d'obtenir, par traitement chimique, des dérivés présentant des chromophores dosables par ces méthodes. Les réactions s'effectuent en présence d'acide sulfurique seul (KARTNIG et MIKULA, 1970 ; GENKINA et al., 1977) ou combiné à la vanilline (HIAI et al., 1976).

Bien que les méthodes spectrophotométriques soient assez sensibles et adaptées au dosage des saponines non hydrolysées, elles ne sont pas spécifiques des différents groupes de saponines et nécessitent des produits bien purifiés.

6.2.4- Méthodes chromatographiques

La chromatographie constitue un des outils les plus utilisés pour l'analyse qualitative et quantitative des saponines. Selon la nature de la phase stationnaire, on distingue les méthodes suivantes :

- La chromatographie sur papier (CP)

La CP permet surtout la séparation de substances fortement polaires ; c'est pourquoi, elle est souvent employée pour l'identification des molécules glucidiques des saponines

- La chromatographie sur couche mince (CCM)

Au cours des dernières années, la CCM a supplanté en grande partie la CP grâce à ses avantages : rapidité de migration, très bonne résolution des composés, facilité d'éluion des substances chromatographiées (MAHUZIER et HAMON, 1978).

Un composé est identifié par étude simultanée de la valeur du R_f et de la coloration de la tache. Les saponines et leurs produits d'hydrolyse étant incolores, ils doivent être révélés par des réactifs donnant des taches colorées caractéristiques. Plusieurs types de réactifs sont employés : l'acide chlorosulfonique, le pentachlorure d'antimoine, l'acide phosphorique, (RANDERATH, 1962) ainsi que le mélange d'acide sulfurique et d'anhydride acétique qui constitue les éléments de la réaction de Liebermann-Burchard, très couramment utilisée (SASTRY et VENKATA RAO, 1976). La simple pulvérisation d'eau peut aussi permettre de visualiser les composés saponinés, dont les taches se distinguent bien, par leur opacité, sur le fond de la chromatoplaque (AHMAD et al., 1980). Ceci est intéressant pour la récupération des composés chromatographiés, les molécules n'étant pas transformées par des réactions de coloration.

Le dosage des substances séparées par CCM est réalisable par densitométrie après révélation du chromatogramme. TAKINO et al. (1979) déterminent ainsi le contenu en acide glycyrrhétique des racines de Glycyrrhiza gabra.

Un des solvants de migration chromatographique les plus utilisés pour la séparation des saponines est le mélange chloroforme-méthanol-eau (61:32:7) (LUTOMSKI et NHAM, 1977). La chromatographie des sapogénines requiert des solvants moins polaires comme les systèmes suivants : acétate d'éthyle-n-hexane (30:20), chloroforme-méthanol (93:7), benzène-méthanol-acétate d'éthyle (119:14:7), etc... ; ce dernier est préconisé pour la séparation de l' α -amyrine, la β -amyrine, l'acide ursolique et l'acide oléanolique et de leurs dérivés méthylés et acétylés respectifs (SHARMA et MAKKAR, 1980).

- La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

L'extrême sensibilité, l'automatisation de l'analyse, la rapidité, les modifications aisées des conditions opératoires sont des atouts qui ont contribué au grand développement de cette technique.

Certains composés, tels que les constituants des saponines sont préalablement transformés soit par silylation en dérivés triméthyl silylés par exemple (IKEKAWA et al., 1965), ou bien par alcoylation en utilisant comme réactif le diazométhane

qui permet l'obtention des dérivés méthylés en présence de groupements carboxyliques (KERNAN et al., 1973).

Pour analyser des aglycones en CPG, on emploie fréquemment des colonnes en verre type SE-30 à 1,5 % sur DMCS chromosorb W ; SANADA et al. (1974) identifient ainsi le protopanaxatriol dans les saponines de ginseng.

Les parties glucidiques des saponines sont déterminées en utilisant des colonnes en acier remplies d'OV-17 à 5 % sur chromosorb (FORGACS et PROVOST, 1981) ou bien des colonnes en verre contenant soit de l'OV-17 à 2 % sur chromosorb W (KIM et al., 1981), soit du SE-52 à 5 %, également sur chromosorb W (SUGA et al., 1978).

- La chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

Ce type de chromatographie présente les avantages suivants : grande sensibilité, possibilité d'analyses d'extraits bruts, rapidité, capacité d'analyse d'un grand nombre d'échantillons, conditions de travail non dénaturantes.

Cette technique a servi à identifier des prosapogénines après hydrolyse alcaline des saponines triterpéniques bidesmosidiques de Fatsia japonica (AOKI et al., 1981). La CLHP a aussi été appliquée à l'étude des saponines de Bupleurum spp, à partir d'un extrait brut (KIMATA et al., 1979), ainsi qu'à la détermination des saponines de ginseng (BESSO et al., 1979). Les constituants glucidiques des saponines, peuvent également être identifiés et dosés au moyen de la CLHP (KIM et al., 1981).

6.3- Méthodes immunochimiques

Il existe une nouvelle méthode analytique semi-automatisée : l'essai radioimmunologique (ERI). Il commence à se développer grâce à :

- sa grande sensibilité ;
- sa spécificité quasi-absolue par l'emploi des anti-corps ;
- sa rapidité d'analyse d'un nombre considérable d'échantillons (extraits bruts).

Cette technique est adaptée à des tris rapides des échantillons dans des recherches sur la biosynthèse et la distribution des composés, ainsi que pour la détermination des métabolites synthétisés en faibles quantités (WEILER, 1977).

A titre d'exemple, WEILER et al. (1980), en utilisant cette méthode radioimmunologique, mise au point pour la détection de solasodine sous forme glucosylée, arrivent à cloner 250 espèces de Solanum ; ils repèrent ainsi les plantes les plus riches en solasodine et précisent leur distribution dans les tissus et les organes des individus d'une même espèce. Notons en outre, que l'ERI permet de détecter la présence d'un composé présent en quantités minimales dans un matériel végétal frais ou sec (quelques milligrammes).

7- Détermination de la structure chimique

En plus des méthodes chimiques qui sont très employées (PANOSYAN et MNATSAKANYAN, 1977), il existe des méthodes physiques qui permettent une détermination précise de la structure et de la stéréochimie des constituants des saponines. On peut en citer quelques-unes :

- La spectrométrie dans l'infra-rouge qui met en évidence certains groupements tels que les hydroxyles, les carbonyles, les lactones, les doubles liaisons et précise leur position dans la molécule triterpénique. Ainsi, COLE et al. (1956) réalise des études sur les spectres infra-rouge des triterpènes tétracycliques et pentacycliques. L'analyse de ces spectres a permis de définir la structure chimique de la saponine du thé (CONSTABLE et al., 1960).

- La résonance magnétique nucléaire (RMN) qui présente de nombreux avantages dans l'identification des saponines et la détermination de leur structure moléculaire. On emploie dans ce cas deux types de RMN : Le RMN du ^{13}C et celle du proton ^1H . ASAKAWA et al. (1977) définissent la structure des génines de Panax ginseng ainsi que leur stéréochimie en interprétant les signaux observés par RMN ^{13}C ; de la même façon, la structure de la partie glucidique est mise en évidence après hydrolyse enzymatique et en s'appuyant sur les analyses par RMN- ^1H (TANAKA, 1977).

- la spectrométrie de masse qui permet l'étude de la conformation moléculaire d'un composé, elle est basée sur la fragmentation progressive d'un certain nombre d'unités de masse constituant une série de fractions caractéristiques du composé. Le spectre

de masse des saponines triterpéniques pentacycliques présente une séquence de fragments communs qui caractérise une rétrofragmentation de Diels-Alder (BUDZIKIEWICZ et al., 1963).

- La chromatographie en phase gazeuse-liquide couplée à la spectrométrie de masse permet aussi l'étude structurale des saponines (BOMBARDELLI et al., 1976).

II- RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES

1- Etudes sur l'élaboration des saponines

1.1- Caractérisation des saponines triterpéniques chez les Chénopodiacées

Des plantes d'importance alimentaire, telles que la betterave, la quinoa, les épinards appartiennent à la famille des Chénopodiacées. La plupart des genres de cette famille étant, généralement, très riches en saponines, l'élimination de ces composés peut alourdir le processus d'industrialisation des espèces économiquement intéressantes ; cela explique l'initiation des travaux se référant à ces triterpènes glucosylés, bien avant la fin du siècle dernier.

• Genre Beta

Les variétés sucrières, potagères et fourragères de Beta vulgaris renferment des saponines triterpéniques.

Les saponines des betteraves fourragères et potagères (la bête ou poirée), dont on consomme les pétioles et les feuilles, ont comme génine l'acide oléanolique (BOITEAU et al., 1964

Chez les betteraves sucrières, ces substances se concentrent dans les racines, plus précisément dans la périphérie. On les retrouve dans les mélasses des sucreries. L'acide oléanolique constitue l'aglycone de ces saponines (MARSH et LEVY, 1956).

D'après KRETSU et LAZUR'EVSKII (1970), il existe trois types de saponines chez Beta vulgaris : le glycoside A, formé d'oléanolate de méthyle et d'une molécule de glucose ; les glucosides B et C formés tous les deux d'acide oléanolique, mais qui se distinguent, toutefois, par la présence de glucose pour le premier et

d'acide glucuronique pour le deuxième.

• Genre Spinacia

Chez Spinacia oleracea, légume d'usage courant, on a mis en évidence la présence de saponines au moyen de la méthode hémolytique. Par ce biais, KOFLER (1931) constate que ces glucosides sont localisés dans l'épiderme des feuilles.

De même, en suivant la répartition des saponines dans la plante au cours de l'année, HERDA cité par BOITEAU et al. (1964) détecte dans les racines des quantités particulièrement élevées au printemps et au début de l'été.

L'épinard élabore deux saponines triterpéniques : la première, constituée d'acide oléanolique, est appelée spinasaponine A et la deuxième, contenant de l'hédéragénine, est dénommée spinasaponine B (TSCHESCHE et al., 1969).

• Genre Atriplex

Parmi les espèces de ce genre, on dénombre une plante potagère, l'Atriplex hortensis (l'arroche), qui contient des saponines dans les bractées, les fleurs et les fruits.

NORD et VAN ATTA (1960) isolent, après hydrolyse des saponines de A. canescens, l'acide oléanolique.

• Genre Anabasis

Deux espèces d'Anabasis ont été étudiées par SANDBERG et SHALABY (1960). Ils mettent en évidence quatre saponines chez Anabasis articulata, et cinq dans le cas d'A. setifera.

Plus tard, un acide triterpénique, aglycone des saponines d'A. articulata sera dénommé acide anabasique (SANDBERG et MICHEL, 1962).

• Genre Kochia

Les graines de Kochia scoparia sont aussi riches en saponines qu'en protéines. Ces propriétés ont amené KERNAN et al. (1973) à mettre au point une technique de chromatographie en phase gazeuse applicable à la détermination qualitative et au dosage des saponines contenues dans une seule graine ; une telle méthode est directement destinée à des programmes de sélection génétique. Il est précisé, également, qu'un seul aglycone est identifié chez cette espèce : l'acide oléanolique.

• Genre Salsola

Une saponine triterpénique est distribuée dans toute la plante chez Salsola kali (SIMES et al., 1959).

• Genre Chenopodium

- Chenopodium anthelminticum

Les racines de cette espèce, connues en médecine populaire par ses effets sédatifs et analgésiques, renferment des glucosides triterpéniques qui manifestent aussi des propriétés vermifuges (JENTZSCH et al., 1961).

En étudiant la chimie de ces composés, CHIRVA et al. (1971) décèlent deux substances qu'ils appellent chénopodiumsaponines A et B ; elles ont toutes les deux l'acide échinocystique comme génine. La saponine A est monodesmosidique, avec une chaîne de xylose, de glucose et d'arabinose liée au C3, alors que la saponine B est bidesmosidique, la chaîne supplémentaire, constituée de glucose et de rhamnose, étant fixée au C28.

- Chenopodium ambrosioïdes

Deux saponines, les chénopodiosides A et B, sont isolées des racines ; l'hydrolyse acide de ces composés libère de l'acide échinocystique.

Le chénopodioside B serait une saponine bidesmosidique caractérisée par la présence d'acide glucuronique

et de rhamnose liés au groupement OH de l'acide triterpénique, et, d'autre part, de xylose et d'arabinose combinés au groupement carboxylique du même aglycone (BOGACHEVA et al., 1972).

- Chenopodium album

Le chénopode blanc, cultivé en Europe à l'âge du fer (BROUK, 1975), n'élaborerait pas de saponines proprement dites, mais des triterpènes libres (NICHOLAS et al., 1955). L'acide oléanolique ne serait élaboré que dans les sommités fleuries des plantes adultes.

- Chenopodium quinoa

On est informé de l'existence de saponines dans cette chénopodiacee par les travaux anciens de GONZALEZ (1917) et de GONNERMANN (1919).

Pourtant, le nombre d'études menées depuis sur la caractérisation chimique de ces glucosides reste minime ; aussi, la structure de ces derniers n'est-elle qu'imparfaitement connue.

Les saponines des variétés suivantes ont été étudiées :

* Variété Kcancolla

La chromatographie sur couche mince des extraits de graine révèle au moins sept composés montrant à la fois une activité hémolytique et une réaction positive au révélateur Liebermann-Burchard. Il est donc probable que cette variété, analysée par RUIZ (1979), renferme un mélange complexe de saponines ; la génine principale serait l'acide oléanolique, des aglycones mineurs (20 %) étant aussi détectés. Les dérivés triméthyl silylés des génines sont dosés par chromatographie en phase gazeuse.

* Autres variétés

Une étude réalisée par AGUILAR et al (1979) sur les saponines de cinq variétés de quinoa : Kcancolla, Blanca de Juli, Sajama, Blanca de Junin et Witulla estimées quantitativement par la méthode hémolytique, montre que les graines renferment des quantités appréciables de saponines. Les deux premières variétés sont les plus riches (0,40 et 0,33 %, respectivement),

Les trois dernières en contenant moins (en moyenne 0,08 %).

Il est spécifié également que la teneur en saponines d'une variété peut varier selon l'année de récolte et, probablement, selon le lieu de culture.

- Autres espèces de Chenopodium

D'après KOSOVA et al. (1958), les espèces de Chenopodium suivantes : C. botrys, C. bonus-henricus, C. foetidum et C. urbicum présentent une grande quantité de saponines au sein du système racinaire. Les graines de C. pallidicaule, espèce native des régions andines, très peu cultivée et en voie d'extinction (SIMMONDS, 1979), en sont également pourvues (DE BRUIN, 1964) ; leur composition chimique n'est pas précisée.

1.2-Répartition dans la plante et localisation cellulaire

Toutes les parties d'une plante peuvent contenir des saponines ; elles sont présentes en quantités variables selon les organes et le stade de développement.

D'après HEGNAUER (1973), la quantité de saponines contenue dans un organe est généralement de quelques pour cent, mais peut varier de 0,01 à 28 % du poids sec.

Les tissus où la concentration en glucosides est la plus élevée coïncident avec les zones en croissance active, les apex caulinaires, les germes de tubercules, les graines en formation (WOLF, 1946 ; TURNER, 1960 ; RODDICK, 1974E).

Ces substances glucosidiques sont localisées préférentiellement à la surface des organes sauf dans certains cas, comme chez le poivron, où elles sont détectées à l'intérieur des tissus, au niveau des grains d'aleurone (GAL, 1965).

Les saponines peuvent être caractéristiques d'un organe et être chimiquement différentes dans les racines et dans les tiges d'une même plante ; il en est ainsi chez l'avoine (LUNING et SCHLOSSER, 1976) la luzerne (SHANY et al., 1970) ou le ginseng (TANAKA, 1978).

Toutefois, on ne connaît pas encore avec certitude leur localisation cellulaire ; on admet souvent que les vacuoles sont les lieux d'élection des saponines. Elles pourraient aussi exister sous forme dissoute dans le cytoplasme ou bien être liées au système des membranes cellulaires (AKAHORI et al., 1970).

Récemment, KESSELMEIER et BUDZIKIEWICZ (1979) constatent que la structure paracrystalline des corps prolamellaires des étiooplastes d'Avena sativa est principalement constituée par deux saponines stéroïdiques appelées avénacosides A et B.

D'ailleurs, les expériences de reconstitution des corps prolamellaires montrent que les saponines doivent jouer un rôle dans la différenciation de ces structures tubulaires (KESSELMEIER et RUPPEL, 1979).

1.3- Rôle physiologique

Les bénéfices qu'une plante peut tirer de la synthèse des saponines sont encore discutés, car les études consacrées jusqu'à présent à ce thème ne concernent qu'un nombre limité d'espèces. Cependant, ces composés semblent prendre une part active dans les processus de défense de l'organisme contre les parasites.

On constate que les saponines s'accumulent dans les régions de la plante les plus exposées à l'attaque des champignons, des insectes et des oiseaux. Leurs lieux d'élection sont l'écorce des tiges (BANERJI, 1977), des racines (QUAZI, 1976), les péricarpes des fruits (ANIL, 1979) ou les graines (FOOTE et GRAMLING, 1940).

Les cellules de Smilax aristolochiaefolia endommagées par les agents infectieux sont capables de produire des saponines fortement fongicides, jouant un rôle protecteur très important pour ces plantes (TSCHESCHE et WULFF, 1967).

De même, Hedera helix, espèce résistante à la plupart des champignons, doit probablement cette caractéristique à la présence des hédérasaponines (bidesmosidiques). En réponse à l'attaque des microorganismes, ces composés sont transformés par les enzymes de la plante en α -hédérines (monodesmosidiques) ; elles endommagent les hyphes des champignons en lysant les membranes fongiques.

Des observations "in vitro" montrent que cette transformation enzymatique peut être inhibée en présence de Phyllostica concentrica, champignon auquel le lierre est sensible ; cette inhibition est probablement due à un métabolite extracellulaire synthétisé par le microorganisme (SCHLOSSER, 1973b).

Cyclamen persicum renferme des concentrations élevées de cyclamine, saponine monodesmosidique qui est capable d'affecter sérieusement la croissance de plusieurs champignons à des concentrations supérieures à 30 mg/l (SCHLOSSER, 1971 ; 1973a).

L'avénacine, trouvée dans les racines de l'avoine, voit sa teneur diminuer beaucoup lors d'une affection parasitaire (MAIZEL et al., 1964), ce qui suggère son intervention dans les réactions de défense de l'organisme.

D'autres saponines, de type stéroïdique ou alcaloïdique manifestent des propriétés anti-fongiques, par exemple la tomatine et la solanine (PAQUIN et LACHANCE, 1964).

On présente, d'autre part, les saponines comme des substances synergiques (NITSCH et NITSCH, 1962) ou antagonistes des régulateurs de la croissance végétale voire, même, comme des métabolites aux activités comparables à celles des auxines.

VENDRIG (1964) constate que la digitonine employée seule à la dose de 0,001 mg/l (8.10^{-10} mol.) stimule l'élongation des coléoptiles d'avoine. Un léger effet additif, mais non pas un synergisme, est observé lorsque digitonine et AIA (0,01 mg/l) sont utilisés simultanément.

Par contre, les cucurbitacines, saponines triterpéniques montrent une activité fortement antagoniste de celle de l'acide gibbérellique (GUHA et SEN, 1973).

Les saponines seraient aussi capables de stimuler le métabolisme végétal. On observe, ainsi, que le broyat de deux plantes contenant des saponines, le Pseudopanax ginseng et le Panax ginseng, augmente le nombre et la vigueur des plantules régénérées à partir des explantats de cotylédons et d'hypocotyles de Brassica oleracea ; mais, il reste encore à démontrer qu'il ne s'agit pas d'une simple influence nutritionnelle (HUI et ZEE, 1980).

Des expériences réalisées "in vitro" sur l'effet des saponines alcaloïdiques, telle que la solanine, dans la tubérisation de la pomme de terre, montrent que ces glucosides exogènes peuvent modifier la morphologie externe des tubercules et retarder leur formation (TALUKDER et PAUPARDIN, 1981).

1.4- Facteurs régulateurs de la biosynthèse

Divers facteurs pouvant modifier la biosynthèse des saponines sont actuellement connus, mais les expériences menées sont surtout limitées aux saponines stéroïdiques ou alcaloïdiques.

1.4.1- Facteurs externes

Les facteurs externes suivants ont été étudiés

* *La lumière* : dans les tubercules de pomme de terre, elle est capable de stimuler la formation des glucosides alcaloïdiques et, parallèlement, le verdissement (CONNER, 1937). Des longueurs d'onde sélectionnées telle que la lumière rouge de faible intensité provoquent une augmentation de la teneur en saponines dans les corps prolamellaires des feuilles d'avoine, alors qu'à grande intensité, cette lumière désintègre les saponines et les corps prolamellaires (MULLER, 1981).

* *La température* : d'après CURRIER et KUC (1975), elle influence la biosynthèse des saponines quand on blesse les tubercules de la pomme de terre. Cependant, les basses températures (4°C) font augmenter le contenu en saponines des graines de Pinus pinea, leur teneur en glucosides stéroïdiques atteignant un maximum au quatrième jour de la stratification (SANZ-MUNOZ et ALSASUA DEL VALLE, 1976).

* Les synthèses de saponines varient en fonction de la saison, comme l'attestent les expériences de KIM et al., (1981) qui suivent les variations des ginsénosides au cours de l'année, et situent la production maximale pendant l'été. De même, chez Medicago sativa, la teneur en saponines mise en évidence par l'activité fongicide, varie au cours de l'année (QUAZI, 1975).

* Des cytokinines, comme la N-benzyladénine, appliquées à des tubercules de Solanum tuberosum, stimulent la production de solanine, de chaconine et d'autres saponines mineures (JEPPSEN et al., 1975).

* Des éléments nutritifs tels que les engrais azotés inhibent l'élaboration des saponines chez les Solanacées (NOWACKI et al., 1975).

* La sélection génétique menée par l'homme est enfin, à même d'exercer des modifications de la production des saponines, caractère déterminé génétiquement (PEDERSEN et WANG, 1971).

1.4.2- Facteurs internes

Ils peuvent également influencer la biosynthèse des saponines :

* Ainsi, l'évolution du taux de saponines est bien connu pour quelques espèces comme Lycopersicum esculentum (RODDICK, 1974a et 1974b). Les graines de tomate n'élaborent pas de tomatine pendant leur période de dormance ; par contre, dès que les racines amorcent leur croissance, la synthèse de ce glucoside débute pour s'accroître très rapidement et diminuer les jours suivants. La concentration en tomatine décroît pendant la maturation des fruits (VERHOEFF et LEIM, 1975).

De la même manière, chez Digitalis purpurea, une baisse du contenu en génines cardiotoniques se produit au cours des premières semaines de la croissance des plantules (EVANS et COWLEY, 1972). Au contraire, chez Medicago sativa et Beta vulgaris, on observe dans les racines une augmentation du taux de saponines pendant la germination et la croissance des plantules (DEFAGO et al., 1975b).

* Lors des infections, certaines voies de biosynthèse des saponines pourraient être activées ou inhibées par des vecteurs pathogènes. Par exemple, la pomme de terre infectée forme des phytoalexines (terpènes intervenant dans la défense de l'organisme) et, si une blessure est effectuée avant l'infection, une quantité nettement supérieure de saponines alcaloïdiques (LOCCI et KUC, 1967).

Quelques travaux concernent les saponines triterpéniques : chez le Cyclamen, leur teneur ne semble pas être affectée par les attaques microbiennes (SCHLOSSER, 1973b). Il en va différemment chez la betterave où une augmentation d'environ 20 % est constatée lors de l'infection par le Pythium paroeocandrum (DEFAGO et al., 1975).

* les blessures stimulent la biosynthèse de saponines comme on l'observe chez Solanum tuberosum ; elles se répartissent alors à proximité de la pelure en quantités plus ou moins grandes selon les cultivars (ALLEN et KUC, 1968).

1.5- Elaboration de saponines par des tissus cultivés "in vitro"

Les produits naturels d'origine végétale constituent encore, malgré le développement de la synthèse chimique, la matière première de nombreuses fabrications de composés pharmacoactifs. Dans cette voie, la culture des tissus "in vitro" peut être appelée à résoudre, au moins en partie, des problèmes de productions de métabolites économiquement intéressants.

La capacité biosynthétique des cellules mises en culture est influencée par les composants du milieu et par les conditions d'expérimentation. Ainsi, l'isolement de souches présentant un bon rendement en alcaloïdes, en composés phénoliques divers et autres métabolites a été réalisé dans les dernières décénies.

Les recherches concernant la production des saponines ou leur biotransformation par des tissus végétaux cultivés "in vitro" n'ont commencé que récemment. Quelques espèces végétales ont fait l'objet d'études.

1.5.1- Saponines alcaloïdiques et stéroïdiques

De l'ensemble de ces deux classes de saponines, seule l'élaboration de diosgénine, de solasodine et de glucosides cardiotoniques par des tissus cultivés "in vitro" a fait l'objet de recherches. Les genres suivants ont été étudiés :

- Solanum

Les espèces de Solanum sont cultivées pour l'obtention de la solasodine, utilisée comme précurseur de plusieurs types d'hormones stéroïdiques. HOSODA et YATAZAWA (1979), en cultivant des cals de racines de S. laciniatum sur le milieu de Murashige et Skoog modifié, additionné d'extrait de levure et en présence de 2,4-D, détectent la diosgénine et une saponine alcaloïdique dont l'aglycone est la solasodine.

Les cultures de tissus de Solanum nigrum produisent de la diosgénine ; les cellules cultivées en milieu liquide élaborent des quantités inférieures (0,20 % de la matière sèche) à celles cultivées en milieu solide (0,65 % de la matière sèche) au bout de six semaines de culture (RATHORE et KHANN, 1978).

La production de diosgénine par Solanum xanthocarpum double par l'adjonction de composés auxiniques ou de cytokinines au milieu de culture (HEBLE et al., 1971).

- Dioscorea

La culture de cellules de Dioscorea deltoidea en suspension et en présence de différents régulateurs de croissance montre que le 2,4-D favorise le mieux la production de diosgénine, alors que l'acide gibbérellique et les doses élevées de benzyladénine sont plutôt toxiques (MARSHALL et STABA, 1976). Les auteurs précédents trouvent un maximum de 0,95 % de diosgénine. Par contre, KAUL et al. (1969), en sélectionnant des souches très productrices, observent une synthèse allant jusqu'à 1,5 % dans des suspensions cellulaires de D. deltoidea.

- Trigonella

Les graines de T. foenum-graecum sont considérées comme une source intéressante de diosgénine : la culture de cette légumineuse est plus facile que celle des espèces de Dioscorea. L'évolution des génines stéroïdiques des plantules de fénugrec pendant l'induction des cals sur le milieu de Murashige et Skoog contenant des régulateurs de croissance, démontrent que le taux de génine détecté reste toujours inférieur à celui des graines (LOCKWOOD et BRAIN, 1976). Ces mêmes auteurs signalent que les suspensions cellulaires âgées de 20 jours présentent une teneur en saponines stéroïdiques plus élevée que celle des cals cultivés sur milieu gélosé ; mais il faut noter que ces dernières n'en contiennent pas des quantités importantes par comparaison à celles des graines. La kinétine paraît avoir une influence défavorable sur la production de diosgénine (BRAIN et LOCKWOOD, 1976). Au contraire, des études menées sur l'action de divers régulateurs de croissance sur la production des génines par une suspension cellulaire de T. foenum-graecum révèlent que la kinétine et l'acide indole acétique sont plus efficaces que d'autres types de régulateurs de croissance (KHANNA et al., 1975). D'autre part l'adjonction des précurseurs en particulier l'acide mévalonique, accélère la

production des sapogénines stéroïdiques par les cellules de fénugrec en suspension (TRISONTHI et al., 1980).

- Costus

Les rhizomes de Costus speciosus semblent être plus riches en diosgénine que le fénugrec. Leur croissance est rapide, spécialement celle des racines (BLUNDEN et al., 1975). Ces éléments contribuent à l'établissement de culture en suspension et de colonies tissulaires. RATHORE et KHANNA (1978) font une comparaison de la production de diosgénine d'une suspension cellulaire inorganisée et d'une autre qui forme des racines. Cette dernière n'élabore qu'un tiers des sapogénines synthétisées par les cellules non-organisées. Mais, des colonies tissulaires de C. speciosus produisent trois fois plus de génines stéroïdiques que les graines d'origine (RATHORE et KHANNA, 1979).

- Digitalis

Ce genre rassemble des espèces très appréciées pour leur contenu en glucosides cardiotoniques, tels que D. purpurea et D. lanata. Lorsqu'on ajoute ces glucosides au milieu de culture d'une suspension cellulaire de D. lanata, les cellules sont capables de réaliser la biotransformation de ces molécules par hydroxylation, glucosidation et/ou acétylation. Si un précurseur unique est choisi, par exemple la méthyl digitoxine, seule une 12-hydroxylation se réalise ; elle atteint son maximum au septième jour de culture (REINHARD et al., 1975).

D'autre part, la culture des organes de D. lanata donne des rendements en cardénolides meilleurs que ceux des suspensions cellulaires. Ainsi que le montrent LUI et STABA (1981), la concentration de digoxine est supérieure dans les cultures issues de racines et de feuilles, lorsqu'elles sont cultivées en présence d'acide gibbérellique.

De même, une augmentation de la teneur en glucosides cardiotoniques est enregistrée chez les plantes entières de Digitalis purpurea après un traitement de deux mois à l'acide gibbérellique (MAHMOUD et BEAL, 1959).

Cependant, en étudiant "in vitro" la capacité organogène et l'aptitude à la biosynthèse des glucosides dans des fragments de feuilles de la même espèce de Digitalis, RUCKER et al. (1981) observent que l'acide gibbérellique favorise la for-

mation des cals et inhibe l'élaboration des cardénolides ; par contre, les acides indole acétique et naphthalène acétique stimulent la rhizogénèse et la formation de ces glucosides.

1.5.2- Saponines triterpéniques

- Panax

Souvent, les cals produisent des métabolites dits secondaires en quantité inférieure à celles élaborées par la plante-mère ; ce n'est, cependant, pas toujours le cas. Par exemple, FURUYA et al. (1970) établissent que les colonies tissulaires de Panax ginseng obtenues sur le milieu de Murashige et Skoog contenant 1ppm de 2,4-D renferment une teneur très élevée en saponines (11,5 % du poids sec). Ils réussissent à partir de ce matériel à obtenir du panaxatriol cristallisé. La purification de deux autres aglycones : le panaxadiol et l'acide oléanolique, a été obtenue. On constate, également, que les cals issus du pétiole de ginseng élaborent presque la même quantité et le même type de saponines que les racines de la plante entière (FURUYA et al., 1973).

Le Panax quinquefolium, cultivé "in vitro" est capable de régénérer des plantules dont la production de saponines ne dépasse cependant pas 0,4 % du poids sec (JHANG et al., 1974).

- Abrus

Une équipe française travaillant sur l'élaboration de glycyrrhizine par des suspensions cellulaires d'Abrus precatorius détecte cette substance à une concentration de 0,8 % par rapport à la matière sèche des cellules (LATCHE et al., 1980).

- Saponaria

Une étude sur le rendement en sapogénine de deux espèces : S. ocymoïdes et S. officinalis en suspension cellulaire indique que seule la dernière élabore, pendant la phase stationnaire de la croissance, des quantités qui atteignent 0,66 % du poids sec ; l'utilisation des fermenteurs, dans les conditions décrites, permet une augmentation de la biomasse cellulaire produite par jour, mais n'améliore guère la production de sapogénines qui est de 0,60 % du PS dans le meilleur des cas (HENRY, 1981).

2- Cultures "in vitro" des Chénopodiacées

La culture "in vitro" des plantes de la famille des Chénopodiacées ne concerne que peu d'espèces appartenant aux genres Beta, Atriplex et Chenopodium.

- Beta

Des colonies tissulaires de Beta vulgaris sont obtenues à partir d'un matériel primaire de diverses origines : graines, racines et fragments de plantule. Des phénomènes d'organogénèse ne se manifestent que lors du premier passage d'après BUTENKO et al. (1972), la formation des racines étant, toutefois, plus fréquente que celle des bourgeons. Les cals qui se développent, peuvent contenir des quantités notoires de bêtaïnes (CONSTABEL, 1967).

La régénération de plantes issues de colonies tissulaires dérivant de racines, de feuilles et d'anthères suscite de nombreuses difficultés : les pourcentages de régénération demeurent faibles (ROGOZINSKA et al., 1977 ; DE GREEF, 1979). En ce domaine, l'origine du matériel paraît revêtir une certaine importance : si des fragments de tige et de racine ne manifestent qu'une activité prolifératrice, au contraire, les bourgeons floraux ont des capacités organogènes. En effet, dans ce cas, des bourgeons végétatifs néoformés apparaissent sur le cal développé sur la section du pédoncule floral (MARGARA, 1970). La multiplication végétative des bourgeons axillaires prélevés sur des plantules de betterave diploïdes a été mise au point. Par traitement des bourgeons à la colchicine, préalablement à l'ensemencement, des individus tétraploïdes sont ainsi propagés (HUSSEY et HEPHER, 1978).

- Chenopodium

Des colonies tissulaires de Chenopodium rubrum, dérivées d'un cal d'hypocotyle, constituent un matériel d'études fréquemment choisi en raison de leur capacité photo-autotrophe (HUSEMANN et BARZ, 1977). De plus, l'aspect microscopique (HUSEMANN et BARZ, 1977), la composition en lipides (HUSEMANN et al., 1980) de ces cellules, similaires à celles du mésophylle des feuilles des plantes, en font un modèle d'expérimentation, entre autres, pour les études de cytodifférenciation des chloroplastes et de la photosynthèse en général (BUCHNER et al., 1981 ; OHKHAWA et al., 1981 ; STEIMULLER et BENTRUP, 1981). Aucune mention n'est faite, dans ces

travaux, de la présence de saponines.

- *Autres genres*

Par ensemencement d'apex de plantules d'Atriplex canescens, WOCHOK et SLUIS (1980) stimulent la multiplication végétative des bourgeons ainsi que leur élongation ; les explantats sont cultivés sur le milieu de Murashige et Skoog contenant de l'AIA et de la kinétine et sont traités par immersion rapide dans l'acide gibbérellique.

NESKOVIC et RADOJEVIC (1973) induisent la formation de cals par des apex de Spinacia oleracea, en présence de 2,4-D, et isolent une souche organogène capable de former des bourgeons et des racines.

MATERIEL

et

METHODES

MATERIEL ET METHODES

I- Matériel

Nous avons utilisé comme matériel expérimental des graines de quinoa (Chenopodium quinoa Willd.), variétés Real de Puno et Blanca de Junin, gracieusement fournies par le Dr. ALVAREZ (laboratoire de Biochimie, Université de Médecine C. HEREDIA, Lima, Pérou). Elles ont été récoltées en 1979. Le choix de ces deux variétés a été dicté par les raisons suivantes :

1) Real de Puno est une variété dont les graines présentent un goût amer. Cette caractéristique est considérée comme étant le fait d'un contenu important en saponines.

2) Blanca de Junin, au contraire, est une variété à graines douces, considérées comme moins riches en saponines.

Ces variétés constituent un bon matériel pour l'étude comparée de la composition en glucosides triterpéniques des cultures "in vitro" et des plantes-mères.

II- Méthodes

1- Culture "in vitro" des tissus

1.1- Germination des graines

Les graines sont stérilisées superficiellement, pendant 20 minutes, dans une solution obtenue après filtration d'un mélange d'hypochlorite de calcium (110-115°) à 10 % dans l'eau, agité. Elles sont rincées cinq fois à l'eau stérile.

Les germinations sont réalisées, soit dans des tubes renfermant de l'eau gélosée à 1 % stérile, soit dans des boîtes de Pétri contenant du papier filtre humidifié stérile.

Les tubes et les boîtes de Pétri sont placés à 22°C dans une chambre de culture exposée à la lumière du jour et recevant un éclairage d'appoint de 12 heures de lumière par jour, dispensé par des tubes fluorescents de type "lumière du jour", (1000 lux).

1.2- Obtention des colonies tissulaires

L'explantat primaire est constitué, soit par des fragments d'épicotyle, soit par des racines, prélevés sur de jeunes plantules obtenues après 18 à 20 jours de germination.

Nous avons utilisé, dès le début de ce travail, le milieu de base de MURASHIGE et SKOOG (1962) (Tableau n°1) qui est souvent satisfaisant pour la multiplication végétative de nombreuses espèces et, éventuellement, pour l'initiation des colonies tissulaires. A cette solution, nous avons ajouté différentes auxines (ANA ; AIB ; 2,4-D), en association avec la kinétine. Les concentrations maximales utilisées en ANA et en AIB sont de 16 mg/l, en 2,4-D de 4 mg/l et en kinétine de 10 mg/l.

Le pH de chaque milieu est ajusté à 5,6 avec une solution normale d'hydroxyde de sodium. Le milieu de culture est solidifié avec de la gélose à 0,6 %.

Les milieux sont stérilisés dans un autoclave chauffé à 120°C durant 20 minutes.

Après l'ensemencement aseptique des explantats primaires, les cultures sont placées dans les mêmes conditions expérimentales que celles qui ont été employées pour la germination des graines.

1.3- Multiplication végétative

1.3.1- Explantats primaires

Ils sont obtenus par section, soit :

- des apex des jeunes plantules âgées de six jours. Ces apex portent à leur base les deux feuilles cotylédonaire et un fragment d'hypocotyle d'une longueur d'un millimètre.

- des bourgeons axillaires, d'une taille maximale de 2 à 4 millimètres, prélevés sur des plantes d'un mètre de hauteur à l'état végétatif. Les extrémités sectionnées des rameaux sont trempées dans la paraffine puis stérilisées superficiellement dans le mélange filtré d'hypochlorite de

Tableau 1

Composition des milieux de culture (mg/l)

	MURASHIGE et SKOOG	KNOP dilué de moitié	B5
<u>Macroéléments</u>			
<u>minéraux</u>			
NH_4NO_3	1 650		
KNO_3	1 900	125	2 500
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440		150
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$		500	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	125	250
KH_2PO_4	170	125	
$(NH_4)_2SO_4$			134
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$			150
<u>Microéléments</u>			
KI	0,83	0,75	0,75
H_3BO_3	6,2	3	3
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22,3		
$MnSO_4 \cdot H_2O$		10	10
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,6	2	2
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	0,25	0,25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	0,025	0,025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	0,025	0,025
$Na_2 \cdot EDTA$	37,3	37,3	37,3
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8	27,8	27,8
<u>Vitamines</u>			
acide nicotinique	0,5	1	1
pyridoxine.HCl	0,5	1	1
thiamine.HCl	0,1	10	10
<u>Acides aminés</u>			
glycine	2		
<u>Sucre et</u>			
<u>dérivé alcool</u>			
Saccharose	30 000	20 000	20 000
myo-inositol	100	100	100

calcium (110-115°) à 5 % dans l'eau, contenant une goutte de Tween 80, durant 10 minutes.

1.3.2- Induction et développement des bourgeons

1.3.2.1- Milieux étudiés

Afin de déterminer le comportement "in vitro" des tissus de Chenopodium quinoa, nous avons été amenée à étudier des milieux de base différant par la composition et/ou la concentration en leurs divers composants. Aussi notre choix s'est-il porté sur un milieu relativement riche, celui défini par MURASHIGE et SKOOG (1962), un deuxième aux concentrations minérales moyennes, le milieu B5 (GAMBORG et al., 1968) et un troisième, de composition plus simple, le milieu de Knop dilué de moitié (GAUTHERET, 1959). La composition de ces trois milieux est indiquée au tableau 1.

1.3.2.2- Modifications étudiées sur le milieu B5

Ces modifications concernent essentiellement les concentrations en éléments nutritifs et en régulateurs de croissance.

1.3.2.2.1- Eléments nutritifs

Les modifications touchent la majorité des macro-éléments du milieu : les composés azotés, phosphatés et sulfatés. Des microéléments, seules les concentrations en composés ferreux sont étudiées.

L'influence de la nature de la source sucrée a été l'objet d'études : saccharose et glucose, à différentes concentrations (entre 0,5 et 5 %). De même, un dérivé alcool, le myo-inositol, a été adjoint entre 100 et 1000 mg/l.

L'action de divers complexes aminés a été éprouvée : l'hydrolysate de caséine et l'extrait de levure à des concentrations comprises entre 0,2 et 2 mg/l.

L'effet de l'addition d'acides aminés a retenu l'attention : la glycine (2 à 8 mg/l), l'acide glutamique et l'arginine (0,2 à 2 mg/l).

1.3.2.2.2-Adjonction d'autres éléments

L'influence d'une matière adsorbante, le charbon activé, aux concentrations suivantes, 0,02 ; 0,05 ; 1 et 2 %, a été étudiée de même que celle d'un anti-oxydant, l'acide L-ascorbique, ajouté au milieu de culture à 1, 3, 6 et 10 mg/l.

1.3.2.2.3- Régulateurs de croissance

Des combinaisons de substances auxiniques et cytokiniques ont été employées :

- Kinétine (0,21 mg/l) et ANA (0,018 mg/l)
- 6-BA (0,22 mg/l) et ANA (0,018 mg/l)
- 6-BA (0,22 mg/l) et AIB (0,02 mg/l)
- 6-BA (0,02 mg/l) et AIB (0,002 mg/l)

L'action de la 6-BA adjointe seule (0,22 mg/l) a été étudiée.

1.3.2.2.4- Echantillonnage

Pour chaque condition étudiée, 24 tubes sont ensemencés. Les explantats présentant des bourgeons sont dénombrés au bout de trois semaines ; parallèlement, le degré de chlorose des cultures est apprécié. Chaque expérience est répétée au moins deux fois.

1.3.2.3- Conditions de culture

Des essais sur l'influence des différentes photopériodes (respectivement, 8, 12 et 16 heures de lumière par jour) et de la lumière continue nous ont permis de dégager le régime le plus favorable : 12 heures de nuit et 12 heures de jour. L'éclairage est fourni par des tubes fluorescents de type "Gro lux". Les intensités lumineuses sont comprises

entre 1500 et 2000 lux. La température des chambres à culture est de 20°C.

1.3.3- Allongement des tiges

Pour stimuler l'allongement des tiges, les bourgeons sont, soit placés sur un milieu dépourvu en régulateurs de croissance, soit trempés dans une solution d'acide gibbérellique AG_3 (0,25 et 0,5 mg/l) préalablement filtrée sur une membrane millipore à vide de maille de 0,25 μ . Après ce trempage de quelques secondes, le matériel est repiqué sur un milieu modifié contenant de l'ANA (0,018 mg/l) et de la 6-BA (0,22 mg/l). Les conditions de culture sont les mêmes que celles qui se sont montrées favorables à l'étape précédente.

1.3.4- Enracinement

Trois cas ont été expérimentés :

- Action combinée d'une auxine et d'une cytokinine ;
- Action des auxines et des retardateurs de croissance ;
- Absence des substances de croissance.

Les essais ont été réalisés sur un milieu gélosé ou sur papier filtre plié plongeant dans la solution de culture. Certaines cultures en milieu liquide ont été installées sur une table à agitation horizontale.

Les conditions de culture sont similaires à celles précédemment décrites pour la multiplication des bourgeons. Cependant, l'effet d'une thermopériode (20°C le jour et 4°C la nuit), pendant deux semaines, est expérimenté.

1.3.5- Transplantation en terre

Les plantules enracinées sont transférées dans des pots en matière plastique remplis de vermiculite préalablement stérilisée à l'autoclave (120°C ; 30 minutes). Elles sont maintenues en atmosphère confinée durant neuf jours et arrosées alternativement avec de l'eau distillée et une solution minérale de Knop.

Elles sont ensuite transplantées dans des pots en terre renfermant un mélange de terre franche, de terreau et de sable (3 : 5 : 2).

Une semaine après le début de ces opérations, les plantules sont pulvérisées avec une solution d'AIA (0,17 mg/l), puis six jours plus tard avec une solution de 6-BA (0,02 mg/l).

Une exposition à la lumière du jour (14 heures/jour) à la température moyenne de 22°C est assurée.

Le transfert en terre dans une serre climatisée intervient après un mois de culture en pots. L'éclairage était de 9000 lux et la température comprise entre 20 et 25°C pendant la journée et de 15° la nuit. La photopériode était de 15 heures de lumière par jour.

2- Etudes des saponines et de leurs génines

Les saponines et leurs génines sont isolées par des méthodes chimiques. La détection par la méthode hémolytique est mieux adaptée aux saponines, les génines ne lysant généralement pas les globules rouges ; par contre, les méthodes chromatographiques sur couche mince sont pratiquement réservées à la détection des aglycones, du fait de l'absence de saponines commerciales témoins.

2.1- Méthodes d'isolement

Deux grandes étapes sont à distinguer : la première consiste à extraire et à purifier les saponines ; leur hydrolyse, dans un deuxième temps, permet la libération de leurs génines qui sont analysées après des étapes supplémentaires de purification. Notre méthode d'isolement s'inspire largement de celle décrite par RUIZ (1979).

2.1.1- Protocole d'obtention des saponines

2.1.1.1- Matériel analysé

Il provient de trois sources :

- les graines (matériel de départ).

5 grammes sont soumis à l'extraction alcoolique des saponines et 15 grammes à celle des sapogénines.

- des plantes entières sont obtenues en pots à partir de graines. Les conditions de croissance, en serre, furent identiques pour l'ensemble des plantes. Elles furent cultivées entre les mois de juin et d'octobre, durant cinq mois. A ce stade qui précède la floraison, les plantes sont retirées de leur pot et coupées au niveau du collet. Les racines sont rapidement, mais délicatement, débarassées de la terre, leur poids est mesuré, et elles sont ensuite congelées dans l'azote liquide avant lyophilisation. Pour les extractions, 3 grammes de matériel deshydraté sont employés. De la même façon, les parties aériennes sont pesées et cryodesséchées. Le matériel végétal est conservé en dessicateur jusqu'au moment de l'analyse. 7 grammes de matière sèche sont extraits.

- les cultures "in vitro" des tissus dont les analyses de la composition en saponines ont porté sur :

* les colonies tissulaires issues des racines ou des épicotyles des jeunes plantules. Lors de chaque extraction chimique, 4 grammes de matière sèche sont employés.

* les cultures de bourgeons; 5 grammes de matériel cryodesséché sont extraits.

2.1.1.2- Extraction et purification

Le protocole d'extraction des saponines est schématisé à la figure 1. Les étapes principales sont les suivantes :

- après mesure du poids de matière sèche, les graines ou le matériel cryodesséché sont soumis à une délipidation en présence du 200 ml d'éther éthylique dans un extracteur à reflux, pendant 6 heures.

- l'extraction des saponines brutes est réalisée par un gradient alcoolique d'un mélange de butanol (BuOH) 80 % et d'éthanol (EtOH) 80 %, selon les séquences

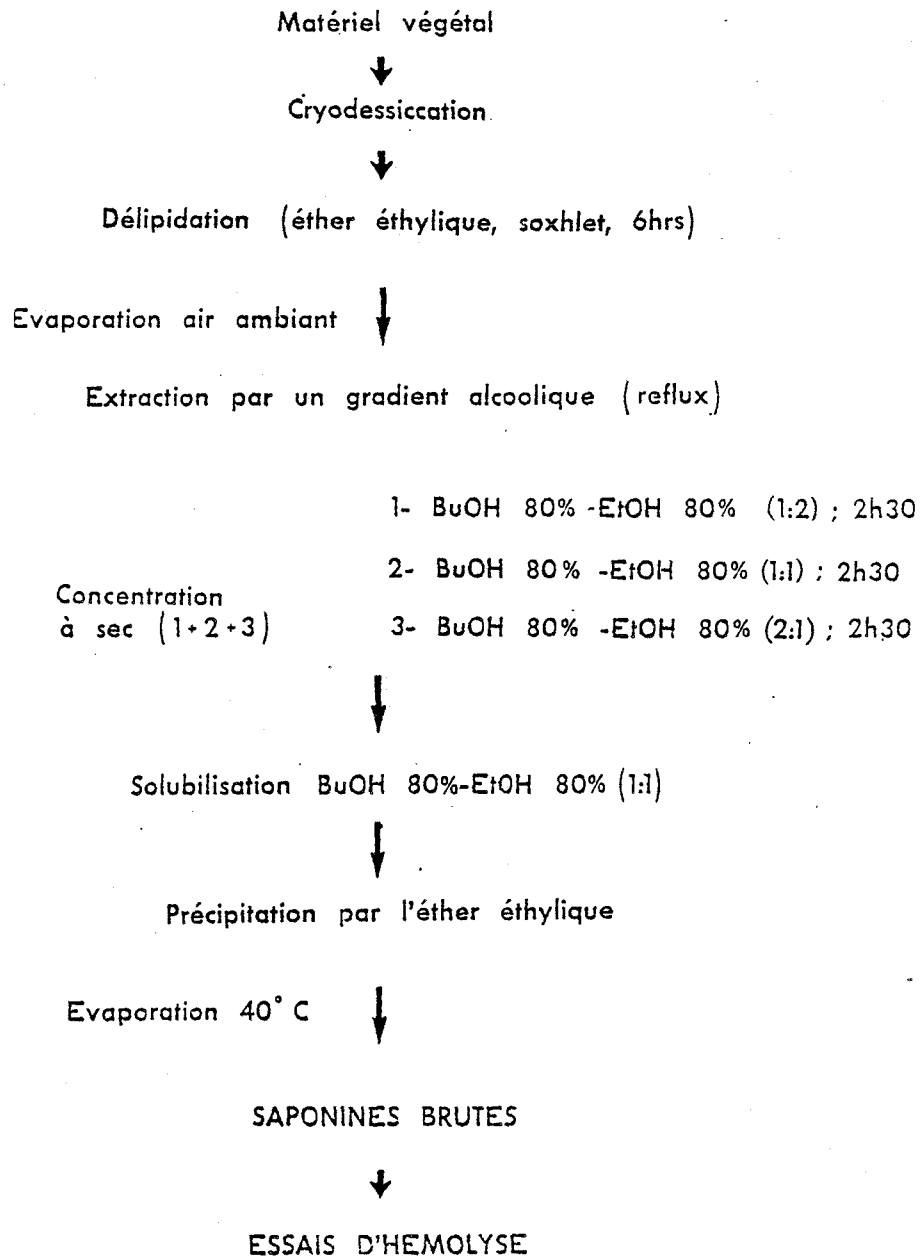


Figure 1: Protocole d'extraction des saponines.



indiquées pour une durée totale de 7 h 30.

- les trois extraits alcooliques sont concentrés à sec puis solubilisés dans 20 ml d'un mélange aqueux à proportions égales de BuOH (80 %) et d'EtOH (80 %).

- cette solution est introduite dans une ampoule à décanter dans laquelle sont ajoutés 100 ml d'éther éthylique. Deux phases apparaissent : une phase supérieure verte (pour des échantillons chlorophylliens) ou jaunâtres (dans les cas contraires) et un précipité marron.

- ce précipité qui contient les saponines brutes est séché totalement dans une étuve à 40°C, pendant 20 heures.

2.1.2- Protocole d'obtention des génines

Le protocole d'obtention des génines est décrit à la figure 2 ; il comprend trois étapes : l'hydrolyse des saponines, l'extraction des aglycones puis leur purification.

2.1.2.1- Hydrolyse des saponines

Les saponines brutes sont pesées de façon précise puis dissoutes dans un mélange de dioxane-eau (1:1). Elles sont hydrolysées ensuite par un mélange à volume égal d'acide sulfurique 12N et d'une solution de dioxane-eau (1:1). La normalité finale en acide sulfurique est donc égale à 6N. L'hydrolyse est entreprise dans un soxhlet, à 100°C, pendant 4 heures. La distillation préalable de l'acide sulfurique est systématiquement effectuée avant toute utilisation.

2.1.2.2- Extraction des génines

Dans une ampoule à décanter, à 220 ml de la solution hydrolysée, sont ajoutés 100 ml de chloroforme (CHCl_3). Trois phases se séparent après agitation. Une phase supérieure marron claire, qui renferme les sucres résultant de l'hydrolyse des saponines ; une interphase de couleur marron foncée ; une phase chloroformique contenant les sapogénines. Cette opération est répétée à trois reprises.

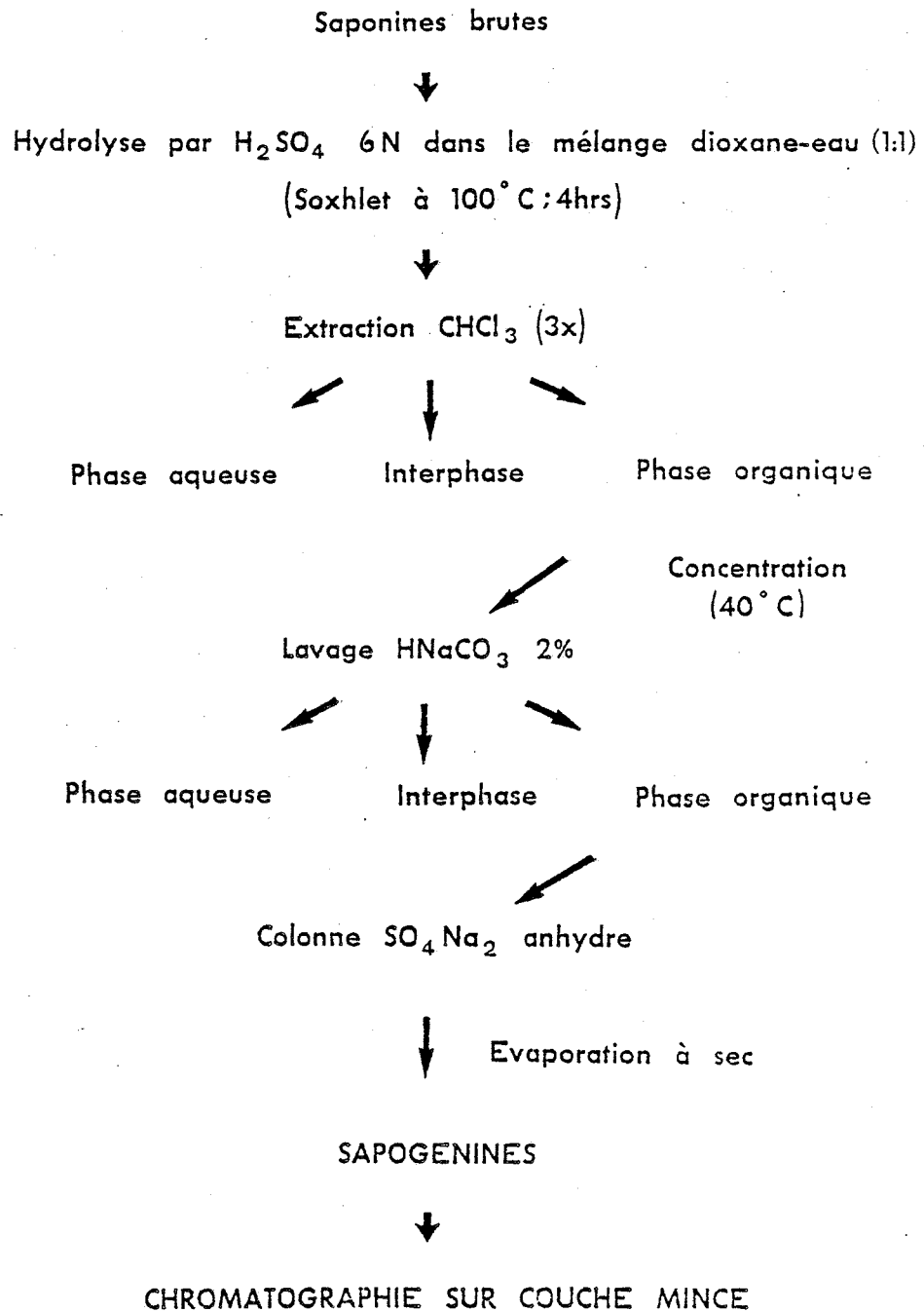


Figure 2: Protocole d'extraction et de purification de sapogénines.

2.1.2.3- Purification des génines

Les trois phases chloroformiques sont rassemblées et concentrées à un volume de 100 ml, à 40°C, dans un évaporateur rotatif sous vide.

Un lavage est effectué par agitation avec une solution de bicarbonate de sodium à 2 %, dans une ampoule à décanter.

Des trois phases obtenues, la phase organique (80 à 90 ml) est récupérée et passée au travers d'une colonne (40 x 1,5 cm) contenant 50 grammes de sulfate de sodium anhydre. Cette étape entraîne une dépigmentation et la deshydratation de l'extrait contenant les sapogénines. Celui-ci est alors évaporé à sec dans un évaporateur rotatif sous vide à 35°C.

2.2- Détection

Une étude qualitative est essentiellement menée sur les aglycones afin de préciser leur nature, tandis qu'une appréciation quantitative des saponines est entreprise à l'aide d'une méthode hémolytique.

2.2.1- Chromatographie sur couche mince

2.2.1.1- Essai sur les saponines des graines

Les saponines, extraites des graines et dissoutes dans le n-butanol à 80 %, sont séparées dans les conditions suivantes :

- support : gel de silice, couche de 0,25 mm d'épaisseur
- solvant de chromatographie : chloroforme, méthanol, eau (65:35:8)

- temps de migration : 2 heures

- révélation : réactif Liebermann-Burchard

Le mode opératoire est décrit dans les paragraphes qui suivent.

2.2.1.2- Essai sur les sapogénines

Deux types d'échantillons sont chromatographiés : les extraits végétaux (diverses parties de la plante entière et des tissus cultivés "in vitro") et les substances témoins pures.

Les extraits végétaux sont solubilisés dans 1 ml du mélange chloroforme-méthanol (9,3:0,7), les substances témoins pures dans 1 ml de méthanol.

Le support chromatographique est constitué par une couche de 0,25 mm de gel de silice dépourvu de plâtre, adhérent à un support plastifié (20 x 20 cm).

Le système de solvants de migration est le suivant : chloroforme-méthanol (9,3:0,7). Le volume utilisé est de 100 ml. Tous les solvants utilisés pour la solubilisation des échantillons et la migration chromatographique sont distillés au préalable.

La durée de la migration est de 90 minutes.

La révélation est faite par pulvérisation du réactif de Liebermann-Burchard, après séchage à l'air ambiant des chromatoplaques. Ce réactif est préparé en mélangeant 50 ml d'éthanol avec 5 ml d'anhydride acétique et 5 ml d'acide sulfurique concentré, en prenant la précaution de refroidir la fiole de mélange sous un courant d'eau froide. Il est conservé au réfrigérateur avant son emploi, pour une durée maximale de deux semaines.

Après pulvérisation, les chromatoplaques sont placées dans une étuve à 110°C durant dix minutes.

L'identification des génines s'effectue par mesure du Rf et par la couleur des taches données par la méthode décrite. Une co-migration des composés triterpéniques témoins, l'oléanolate de méthyle, l'acide oléanolique et l'acide échinocystique, et des extraits végétaux permet de préciser la présence éventuelle de ces aglycones.

Les substances témoins nous ont

été gracieusement fournies par le Dr. LUTOMSKI, Institute of Medicinal Plants, Poznan, Pologne, et le Dr. AOKI, Department of Chemistry, Hiroshima University, Japon.

2.2.2- Méthode hémolytique

2.2.2.1- Protocole expérimental

Les essais d'hémolyse sont réalisés sur un concentré globulaire humain. Celui-ci est préparé de la façon suivante : 10 ml de sang humain frais sont prélevés dans un tube renfermant un anti-coagulant, l'anaklepton, agent chélateur des ions Ca^{++} en particulier. Par trois lavages avec une solution de chlorure de sodium à 0,9 %, et centrifugations successives, les protéines plasmatiques, parmi lesquelles se trouvent les facteurs de la coagulation, sont éliminées. On recueille les hématies.

De l'agarose 21 (laboratoire Eurobio-Paris) à 2 % dans une solution de serum physiologique est stérilisé et dissout totalement à l'autoclave porté à 120°C durant une heure.

Après refroidissement à 45°C, on ajoute à cette solution le concentré globulaire. Le mélange est coulé sur des lames en verre ou dans des boîtes de Pétri. On aura, au préalable, pris la précaution de placer tout le matériel nécessaire dans une étuve thermostatée à 45°C.

Le mélange hématies-agarose se solidifie à température ambiante. On y creuse des puits, à l'aide d'un emporte-pièce relié à une pompe à vide. Ces puits ont environ 1 mm de profondeur et 2 mm de diamètre.

2.2.2.2- Détermination de la teneur en saponines hémolytiques

Suivant les cas, les essais hémolytiques ont porté sur le matériel frais, le matériel lyophilisé, ou sur les extraits bruts des saponines.

On dépose dans les puits le matériel

à analyser, en solution dans du serum physiologique.

Les plaques d'hémolyse sont placées dans une chambre humide, à 20°C, durant 24 heures.

L'appréciation de la teneur en saponines hémolytiques est réalisée, selon la méthode de JURZYSTA (1979), par mesure du diamètre de l'anneau hémolytique ; on compare les valeurs trouvées avec celles données, dans les mêmes conditions par diverses concentrations d'une solution de saponines commerciales (Coultronics S.A.) qui permettent d'établir une courbe d'étalonnage.

RESULTATS

RESULTATS

Nous considérerons, dans une première partie, l'obtention des colonies tissulaires et la multiplication végétative du Chenopodium quinoa par culture d'apex et, dans une deuxième partie, l'étude des saponines triterpéniques élaborées par cette plante et les tissus cultivés "in vitro".

I- CULTURE "IN VITRO" DES TISSUS

1- Germination des graines

Du point de vue botanique, il s'agit de fruits ; ce sont des akènes ayant un péricarpe très fin et adhérent.

Du fait que les graines de Chenopodium quinoa ne présentent pas de période de dormance (SIMMONDS, 1965), leur germination est extrêmement rapide. Au bout de quelques heures, au contact d'un substrat humide, la pointe racinaire de l'embryon apparaît, tandis qu'après 24 heures, la radicule et les deux feuilles cotylédonaire protégées l'apex sont bien visibles.

Les graines germent aussi bien dans les tubes contenant de l'eau gélosée qu'en boîtes de Pétri, sur papier filtre humidifié. Pourtant, le premier procédé facilite l'obtention de plantes isolées, à l'abri des contaminations éventuelles apportées par d'autres graines.

Seize jours, environ, après le commencement de la germination la croissance de l'épicotyle débute pour atteindre, au bout de 18 à 20 jours, une longueur moyenne de 0,5 cm. Les racines ont une taille comparable à celle de la tigelle (en moyenne, 4 cm).

Dans les conditions de stérilisation employées, le taux de contamination des plantules n'excède pas 5%.

2- Induction des colonies tissulaires

Les essais décrits dans ce chapitre se rapportent aux explantats issus des fragments d'épicotyle des variétés Blanca de Junin et Real de Puno. Les réponses de ces deux variétés aux régulateurs de croissance exogènes montrent des différences minimales. Par souci de clarté, seules sont mentionnées les observations se référant à la variété Blanca de Junin.

2.1- Action de la Kinétine combinée au 2,4-D

Le tableau 2 résume les observations que nous avons faites.

Kin (mg/l)	2,4-D (mg/l)	Cal	
0	0,2	+++	
	1	++	
	2	+	Poids moyen de matière
	4	±	fraîche des cals exprimé
			en grammes par explantat.
0,2	0,2	+++	
	1	++	+++ : supérieur ou égal
	2	++	à 2,7
	4	+	++ : entre 2,0 et 2,7
			+ : entre 1,2 et 2,0
2	0,2	+++	± : entre 0,5 et 1,2
	1	+++	- : inférieur ou égal
	2	++	à 0,5
	4	++	
10	0,2	++	
	1	++	
	2	++	
	4	++	

Tableau 2 : Influence de la Kinétine et du 2,4-D sur l'induction des colonies tissulaires de Chenopodium quinoa ; l'âge des colonies est de 6 semaines.

En présence de doses variables de kinétine (0,2 à 10 mg/l), le 2,4-D, surtout quand il est utilisé à des concentrations de 0,2 mg/l, induit rapidement la formation des colonies tissulaires. Aucune racine n'est observée.

Néanmoins, les colonies présentent une tendance à brunir. Le 2,4-D pouvant induire de fortes variations chromosomiques, nous avons préféré ne pas l'adjoindre aux milieux dans la suite de ce travail.

2.2- Action de la kinétine combinée à l'acide indolebutyrique

Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

En présence d'AIB ; les colonies tissulaires sont induites difficilement, quelle que soit la dose utilisée.

Kin(mg/l)	AIB(mg/l)	Cal	Racines	
0	0,2	-	+	Poids moyen de matière fraîche exprimé en grammes par explantat.
	2	-	+	
	8	-	+	
	16	-	+	
<hr/>				
0,2	0,2	±	±	+: entre 1,2 et 2,0 ±: entre 0,5 et 1,2 -: inférieur ou égal à 0,5
	2	±	±	
	8	±	±	
	16	±	±	
<hr/>				
2	0,2	+	+	Explantats avec une ou plusieurs racines de 0,2 à 1 cm : +
	2	+	+	
	8	+	+	
	16	+	+	
<hr/>				
10	0,2	±	-	Explantats sans racine apparente : -
	2	±	-	
	8	±	-	
	16	±	-	

Tableau 3 : Influence de la kinétine et de l'AIB sur l'induction des colonies tissulaires du Chenopodium quinoa ; l'âge des colonies est de 10 semaines.

Les cals demeurent de taille réduite tandis que des racines sont fréquemment observées.

En raison de la faible vitesse de prolifération des colonies tissulaires, nous n'avons pas retenu l'usage de l'AIB.

2.3- Action de la kinétine combinée à l'acide naphthalène-acétique

L'action de différentes combinaisons de concentration en Kinétine (0,2 à 10 mg/l) et en ANA (2 à 16 mg/l) sur l'induction des cals est résumée dans le tableau 4.

En absence de Kinétine, ou en présence d'une dose faible (0 et 0,2 mg/l), les cals demeurent de tailles limitées. Des racines sont souvent observées dans ces conditions.

La croissance des colonies tissulaires est importante pour des concentrations en Kinétine de 10 mg/l et en ANA de 16 mg/l. Des coupes histologiques n'ont pas révélé la présence de primordium racinaire.

Cette dernière condition apparaissant satisfaisante pour l'objectif fixé, nous l'avons choisie pour stimuler la formation des colonies tissulaires issues des épicotyles. Ce sont ces mêmes conditions qui ont été requises pour l'induction des cals dérivés des racines. La croissance des souches est intense; de plus, l'utilisation d'un milieu de culture identique pour ces deux types de colonies tissulaires permettra une comparaison ultérieure de leur contenu en saponines triterpéniques.

Des études ultérieures nous ont indiqué que l'entretien des souches s'effectuait dans de bonnes conditions dans un milieu moins riche en régulateurs de croissance ; la Kinétine est alors employée à 1 mg/l et l'ANA à 8 mg/l.

L'étude histologique de ces colonies tissulaires, âgées de 2 ans, révèle la présence de trachéides. Elles sont disposées en groupe, à proximité d'une assise cellulaire de type méristème secondaire. Des grains d'amidon sont observés, au microscope polarisant, dans les cellules de type parenchymateux .

Kin(mg/l)	ANA(mg/l)	Cal	Racines	Poids moyen de matière fraîche exprimé en grammes par explantat
0	0	-	++	+++ : supérieur ou égal à 2,7 ++ : entre 2,0 et 2,7 + : entre 1,2 et 2,0 ± : entre 0,5 et 1,2 - : inférieur ou égal à 0,5
	2	±	+	
	8	±	+	
	16	±	-	
0,2	0	±	+	Explantats avec une ou plusieurs racines : ++ : de 1 à 5 cm + : de 0,2 à 1 cm
	2	+	-	
	8	+	-	
	16	+	-	
2	0	±	-	Explantats sans racine apparente : -
	2	++	-	
	8	++	-	
	16	+	-	
10	0	±	-	
	2	++	-	
	8	++	-	
	16	+++	-	

Tableau 4 : Influence de la kinétine et de l'ANA sur la formation de colonies tissulaires et de racines par des explantats de Chenopodium quinoa. L'âge des colonies est de 10 semaines.

3- Multiplication végétative

3.1- Induction des bourgeons axillaires

L'objet de ce travail n'a pas été de réaliser une étude détaillée et approfondie de la nutrition minérale et organique des tissus de Chenopodium quinoa, mais, tout au plus, de tenter de mettre au point un milieu de culture qui puisse se révéler approprié à la multiplication rapide des bourgeons de cette espèce.

L'importance de l'influence du type de milieu employé et des modifications apportées à sa composition sont estimées par :

- le nombre des explantats développant au moins un bourgeon de 0,5 cm de longueur,
- le nombre moyen de bourgeons développés par explantat.

Très vite, la chlorose des bourgeons est apparue comme le dénominateur commun des cultures poussant sur les premiers milieux expérimentés. Aussi, dans toutes les conditions de culture, le degré de chlorose a-t-il été apprécié et est retranscrit ici en suivant la convention ci-dessous :

- +++ : chlorose importante
- ++ : chlorose moyenne
- +: chlorose faible
- : absence de chlorose

3.1.1 Essai comparatif de trois milieux de culture

La culture des apex de plantules sur trois milieux différents, celui de Murashige et Skoog, le milieu B5 et celui de Knop dilué de moitié, nous a permis de dégager l'influence de la nature du milieu sur la stimulation du bourgeonnement (tableau 5).

Les différents milieux contiennent les mêmes concentrations en régulateurs de croissance : 6-BA à 0,22 mg/l et ANA à 0,018 mg/l.

Type de milieu	N° explants avec bourgeons	N° moyen bourgeons/culture	degré chlorose
MURASHIGE et SKOOG (MS) Saccharose 3 ‰	35	4,4	+++
*KNOP (macroéléments) vitamines et microéléments du milieu B5 myo-inositol saccharose 2 ‰	24	3	+++
B5 saccharose 2 ‰	32	4,2	++
B5 saccharose 2 ‰ microéléments du milieu MS	21	2,5	+++

Tableau 5 . (Voir légende, p. 64)

Tableau 5 : Action de différents milieux de culture sur le développement des bourgeons de Chenopodium quinoa

Nombre d'explantats par condition : 48
 Photopériode : 12 heures de lumière/jour
 Température : 20°C
 Temps de culture : quatre semaines sauf * : sept semaines
 N° : nombre.

Ainsi, le milieu MS, s'il semble stimuler le bourgeonnement, ne favorise pas l'activité photosynthétique des feuilles, tout au moins pour la teneur en saccharose utilisée.

Le milieu contenant les concentrations en macroéléments de Knop diluées de moitié, plus d'autres composés de milieu B5 (indiqués dans le tableau 1) est capable de stimuler le bourgeonnement mais la croissance est très ralentie, le nombre moyen des bourgeons par explantat est diminué, la chlorose apparaît également, comme en présence du milieu MS.

Par contre, le milieu B5, qui contient 2 % de saccharose, stimule la croissance des bourgeons, la chlorose étant, de plus, moins marquée que précédemment.

La substitution des microéléments du milieu B5 par ceux du milieu MS s'est révélée néfaste au bon développement des bourgeons.

Ces résultats nous ont conduite à retenir le milieu B5 pour la suite des expérimentations, ce qui permet de réduire la chlorose, tout en stimulant la multiplication des bourgeons axillaires.

3.1.2 Modification du milieu B5

Les divers milieux modifiés ont été éprouvés sur des tissus de la variété Blanca de Junin.

3.1.2.1 Variations apportées aux éléments nutritifs

Une inhibition de la synthèse chlorophyllienne a déjà été observée chez les végétaux cultivés "in vitro", en présence de doses élevées en sucre (DALTON et STREET, 1977 DENECHÉAU, 1981).

3.1.2.1.1 Composés sucrés et dérivé alcool

L'influence de la teneur en saccharose (0 à 5 %) sur le développement des bourgeons et le degré de chlorose des explantats est rapportée dans le tableau suivant

Saccharose (g/l)	N° explants avec bourgeons	N° moyen bourgeons/ culture	degré de chlorose
5	6	2	++
10	18	4,0	+ ←-----
20*	15	3,4	++
30	14	3,2	+++
40	3	2,6	+++
50	0	0	nécrose

Tableau 6 : Action de diverses concentrations de saccharose sur le développement des bourgeons axillaires par des apex de Chenopodium quinoa cultivés "in vitro".

* : concentration en saccharose du milieu B5 non modifié

←----- : condition retenue

La réduction du taux de saccharose à 1 % améliore de beaucoup l'aspect des bourgeons. A mesure qu'augmente la concentration en sucre, le nombre de bourgeons qui se développent décroît. La diminution de la teneur en saccharose (0,5 %) les affaiblit toutefois, ralentit leur croissance et accentue le jaunissement des feuilles. La teneur en saccharose égale à 1 % a donc été retenue pour les études suivantes, les

concentrations en régulateurs de croissance étant de 0,22 mg/l en 6-BA ($10^{-6}M$) et 0,018 mg/l en ANA ($10^{-7}M$).

De la même façon, l'influence du glucose et du myo-inositol a été examinée (tableaux 7 et 8, respectivement).

glucose (g/l)	N° explants avec bourgeons	N° moyen bourgeons/ culture	degré chlo- rose
5	8	1,3	++
10	12	3	++
20	14	5,8	++
30	0	0	nécrose

Tableau 7 : Action de diverses concentrations de glucose sur le développement des bourgeons axillaires par des apex de Chenopodium quinoa cultivés "in vitro".

Myo-inositol (g/l)	N° explants avec bourgeons	N° moyen bourgeons/ culture	degré chlo- rose
100*	17	4,7	++ ←-----
500	15	2,9	++
1 000	8	2,2	++

Tableau 8 : Action de diverses concentrations de myo-inositol sur le développement des bourgeons axillaires par des apex de Chenopodium quinoa cultivés "in vitro".

* : concentration en myo-inositol du milieu B5 non modifié

←----- : condition retenue

Pour une teneur en glucose de 20 g/l, la multiplication des bourgeons est satisfaisante ; pour des doses inférieures, de 5 et 10 g/l, le nombre de bourgeons qui se développent diminue, tandis qu'à la concentration de 30 g/l, les explantats meurent.

En aucun cas, le degré de chlorose n'est réduit. Parallèlement, le myo-inositol n'a pas apporté d'amélioration.

3.1.2.1.2- Macroéléments minéraux

§ Prenant en compte la tendance nitrophile de la plupart des Chénopodiacées (REA et al., 1979), nous nous sommes intéressée à l'influence des nitrates présents dans le milieu de culture (tableau 9).

KNO_3 (mg /l)	N° explants avec bourgeons	N° moyen bourgeons/ culture	degré chlo- rose
2 500*	17	5,5	++
2 700	23	6,1	++ ←----
3 180	21	3,3	++

Tableau 9 : Action de diverses concentrations de nitrate de potassium sur le développement des bourgeons axillaires par des apex de Chenopodium quinoa cultivés "in vitro".

* : concentration en nitrate de potassium du milieu B5 non modifié

←---- : condition retenue

Pour une teneur en nitrate de potassium égale à 2 700 mg/l, on observe, tout à la fois, une augmentation du nombre :

- des explantats développant des bourgeons axillaires ;
- de bourgeons axillaires développés par explantat.

Pour une teneur supérieure, la moitié des explantats ensemencés montrent une tendance au développement prioritaire du bourgeon apical.

Conformément à l'objectif de multiplication des bourgeons, une teneur en nitrate de potassium de 2 700 mg/l est donc mieux adaptée.

Les variations de teneur ne modifient guère le degré de chlorose, tout au moins pour la gamme de concentration étudiée.

§ Des études sur la nutrition minérale de quelques espèces cultivées "in vitro" mettent en évidence certains effets toxiques de l'ammonium (HAYNES et GOH, 1978). Aussi avons-nous réduit encore les quantités de sulfate d'ammonium présentes dans le milieu B5 (tableau 10).

$(NH_4)_2SO_4$ (mg/l)	N° explants avec bourgeons	N° moyen bourgeons/ culture	degré chlo- rose
500	14	5	+++
134*	18	4,7	++ ←-----
107	12	5,5	++
67	9	4	++
40	3	4,7	++
0	0	0	+++

Tableau 10 : Action de diverses concentrations de sulfate d'ammonium sur le développement des bourgeons axillaires par des apex de Chenopodium quinoa cultivés "in vitro".

* : concentration en sulfate d'ammonium du milieu B5 non modifié.

←----- : condition retenue

La concentration en sulfate d'ammonium du milieu de base initial (134 mg/l) paraît la mieux adaptée. Pour des doses supérieures (500 mg/l), bien que le nombre d'explantats montrant des bourgeons reste stable, l'aspect chlorotique est plus accentué.

§. De nombreux travaux récents plaident en faveur de l'action bénéfique des phosphates sur le bourgeonnement "in vitro" (MARGARA, 1970 ; MATHEWS et al., 1976) ; aussi, l'influence de ce macroélément, adjoint au milieu de culture à différentes concentrations a t-elle été vérifiée.

Pour les concentrations étudiées (tableau 11), des teneurs en phosphate acide de sodium environ deux fois supérieures à celles du milieu B5, stimulent le bourgeonnement tandis que l'aspect des explantats s'améliore.

PO_4H_2Na (mg/l)	N° explantats avec bourgeons	N° moyen bourgeons/ culture	degré chlorose
150*	19	5	++
195	20	5,2	++
225	19	7,1	++
270	22	7,0	+
315	21	6,5	+ ←-----

Tableau 11 : Action de diverses concentrations de phosphate acide de sodium sur le développement des bourgeons axillaires par des apex de Chenopodium quinoa cultivés "in vitro".

* : concentration en phosphate acide de sodium du milieu B5 non modifié.

←----- : condition retenue

§ Des variations simultanées des teneurs en nitrates et en phosphates nous permettent d'établir que, pour des quantités de nitrates plus élevées (2 700 mg/l), une concentration en sel de phosphate de 315 mg/l stimule le nombre moyen de bourgeons (7,6), tout en diminuant la chlorose.

3.1.2.1.3- Composés ferreux

Le fer exogène peut intervenir dans la synthèse des éléments structuraux des chloroplastes, influençant ainsi, directement, la synthèse de chlorophylle (VESK et al., 1966).

Contrairement à ce qui était attendu, les teneurs élevées ont accentué les symptômes de chlorose (tableau 12). La concentration initiale du milieu de base a donc été conservée.

$SO_4Fe. 7H_2O$ (mg/l)	N° explants avec bourgeons	N° moyen bourgeons/ culture	degré chlo- rose
28*	16	6,5	++ ←-----
34	17	3,8	++
45	12	5,2	+++
55	13	4,2	+++

Tableau 12 : Action de différentes concentrations de sulfate de fer sur le développement des bourgeons axillaires par des apex de Chenopodium quinoa cultivés "in vitro".

* : concentration en sulfate de fer du milieu B5 non modifié

←----- : condition retenue

3.1.2.1.4 Mélanges de composés aminés

Un hydrolysate de caséine, de l'extrait de levure et certains acides aminés sont séparément introduits dans le milieu de base.

L'hydrolysate de caséine stimule l'induction et le développement initial des bourgeons, surtout à la concentration de 0,5 g/l (tableau 13).

Des passages successifs laissent apparaître toutefois une baisse de la vigueur des bourgeons. C'est la raison pour laquelle nous n'avons pas utilisé l'hydrolysate de caséine dans le schéma de multiplication du Chenopodium quinoa. De plus, il présente le désavantage de ne pas avoir une composition chimique définie.

Ce dernier caractère est partagé par l'extrait de levure qui, aux mêmes concentrations, réduit la croissance des explants.

La diminution de la chlorose des cultures réalisées en présence d'hydrolysate de caséine (0,5 g/l)

nous a conduite à mettre à l'épreuve l'action de différents acides aminés : arginine, L-glutamine et glycine (tableau 13).

De ces trois acides aminés, seule la glycine a un effet remarquable sur la multiplication des bourgeons. La quantité retenue est de 4 mg/l.

Composés aminés	N° explants avec bourgeons	N° moyen bourgeons/culture	degré chlo-rose
0*	16	5,2	++
<i>Hydrolysate de caséine (g/l)</i>			
0,2	17	5	++
0,5	15	6,1	+
1	14	4,1	++
2	14	3,1	+++
<i>Arginine (mg/l)</i>			
0,2	14	4,8	++
0,5	10	4	++
1	11	4,2	++
2	10	3,8	++
<i>L-Glutamine (mg/l)</i>			
0,2	16	5,3	++
0,5	16	4,7	+++
1	17	3,7	+++
2	13	3,9	+++
<i>Glycine (mg/l)</i>			
2	18	5,5	++
4	19	7,2	+
6	19	7,3	+
8	17	7	+

Tableau 13 : Action de différentes concentrations en hydrolysate de caséine, arginine, L-glutamine et glycine sur le développement des bourgeons par des apex de Chenopodium quinoa cultivés "in vitro".

* : concentration en composés aminés du milieu B5 non modifié

←----- : condition retenue

3.1.2.2 Adjonction d'adsorbants ou d'anti-oxydants

L'adjonction de charbon activé, qui est un adsorbant, stimule l'apparition du phénomène de dominance apicale. D'une façon générale, la croissance des bourgeons est ralentie, surtout à des doses de 1 et de 2 % en charbon activé (tableau 14).

Charbon %	N° explantats avec bourgeons	N° moyen bourgeons/culture	degré chlo-rose
0*	20	4,4	++
0,02	22	1,3	+ (dominance apicale)
0,05	24	1,1	++
1	21	1	+++
2	20	1,3	+++

Tableau 14 : Action de différentes doses de charbon activé sur le développement des bourgeons par des apex de Chenopodium quinoa cultivés "in vitro".

* : absence de charbon dans le milieu B5 non modifié.

D'autre part, l'addition au milieu de culture d'un anti-oxydant, l'acide L-ascorbique, utilisé à des concentrations comprises entre 1 et 10 mg/l ne modifie que faiblement l'organogénèse des explantats par rapport au témoin ; par contre, pour une teneur de 10 mg/l, on observe un développement plus important des cals et des bourgeons floraux (tableau 15).

Acide L-ascorbique (mg/l)	N° explantats avec bourgeons	N° moyen bourgeons/culture	degré chlo-rose
0*	18	4	++
1	15	3,8	++
3	14	3,2	++
6	15	3,5	++
10	8	2,5	+++ (cals et bourgeons floraux)

Tableau 15. (Voir légende, p 73).

Tableau 15 : Action de différentes concentrations en acide L-ascorbique sur le développement des bourgeons par des apex de Chenopodium quinoa cultivés "in vitro".

* : absence d'acide L-ascorbique dans le milieu B5 non modifié.

3.1.2.3- Action de diverses concentrations en régulateurs de croissance

L'action de diverses combinaisons de régulateurs de croissance a été éprouvée, parallèlement aux études des variations en éléments nutritifs. L'objet essentiel de la démarche visait à l'obtention d'une culture en rosette qui correspond à la formation maximale de bourgeons axillaires (tableau 16).

Combi- naisons (mg/l)	N° expla- nats avec bourgeons	N° moyen bourgeons/ culture	Aspect des cultures
1 (Kin. 0,21 ANA 0,018)	16	4,9	rosette
2 (6-BA 0,22 ANA 0,018)	17	5,9	rosette ←-----
3 (6-BA 0,22 AIB 0,02)	16	4,8	rosette
4 (6-BA 0,02 ANA 0,001)	12	2,4	dominance apicale
5 (6-BA 0,22)	15	5,2	rosette

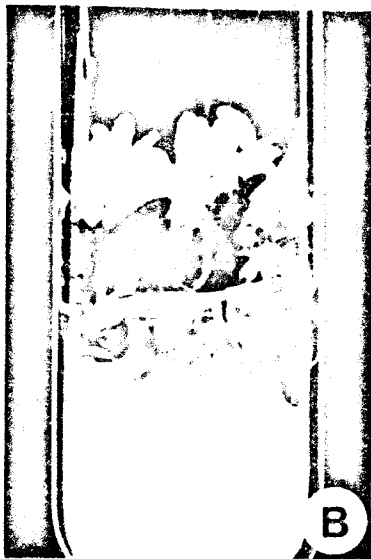
Tableau 16 : Action de quelques régulateurs de croissance sur le développement des bourgeons axillaires et l'aspect des cultures de Chenopodium quinoa "in vitro".

←----- : condition retenue

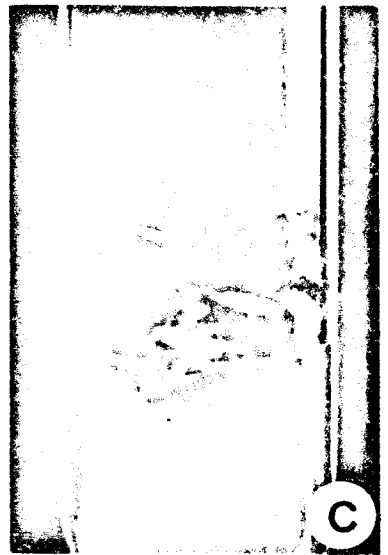
Les conditions 1, 2 et 3 sont proches ; les résultats obtenus sont du même ordre. Toutefois, la vigueur des cultures dans le deuxième cas est plus manifeste. Il a reçu notre préférence. Pour des teneurs en substances de croissance plus élevées (2,2 mg/l de 6-BA et 0,18 mg/l d'ANA), la croissance est ralentie.



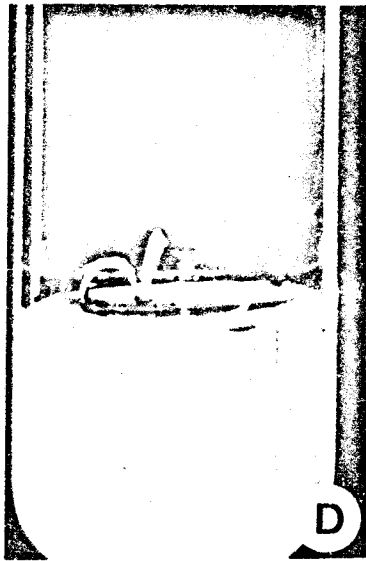
A



B



C



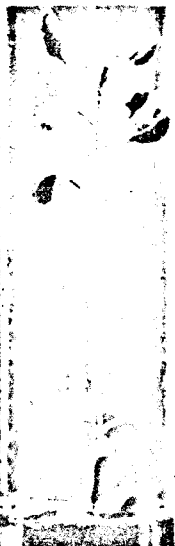
D



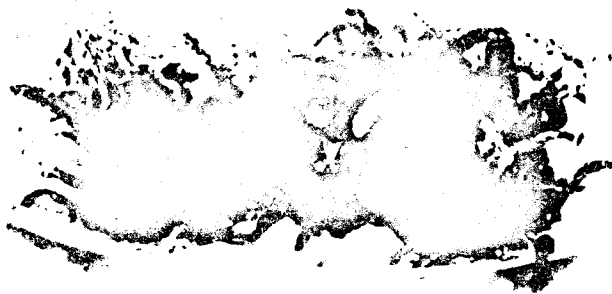
E



F



G



H

L'abaissement simultané du taux de cytokinine et d'auxine (condition 4) favorise la formation des racines qui apparaissent après deux mois de culture. Un phénomène de dominance apicale se révèle qui ne répond pas à notre attente, la vigueur des bourgeons étant faible. Il en est de même pour des concentrations en régulateurs de croissance plus réduites.

On constate également (condition 5) que la croissance des bourgeons axillaires est stimulée dans un milieu dépourvu d'auxine. Toutefois, après le deuxième passage, une perte de vigueur des bourgeons se manifeste.

3.1.3- Comportement d'autres explantats primaires sur le milieu B5 modifié

Le milieu B5 comportant l'ensemble des modifications décrites auparavant s'est également montré adapté à l'induction et à la multiplication, tout à la fois :

- des apex de la variété Real de Puno, et
- des bourgeons axillaires excisés des rameaux des plantes adultes des deux variétés, à l'état végétatif.

L'augmentation de la concentration en nitrates et en phosphates, et l'adjonction concomitante de la glycine à 4 mg/l, permettent de porter le nombre moyen des bourgeons par explantat à 8,5.

La planche I montre l'aspect des cultures après les principales modifications apportées à la composition du milieu.

A titre de comparaison, les compositions du milieu B5 initial et du milieu B5 modifié sont mentionnées dans le tableau 17.

3.2- Allongement des tiges

Préalablement au repiquage sur le milieu B5 modifié, contenant les régulateurs de croissance ANA (0,018 mg/l) et 6-BA (0,22 mg/l), les bourgeons sont traités par l'acide gibbérellique.

Tableau 17

Composition comparée des milieux B5 initial et
B5 modifié. (mg/l)

	B5 initial	B5 modifié
<u>Macroéléments</u>		
KNO_3	2 500	2 700
$CaCl_2, 2H_2O$	150	150
$MgSO_4, 7H_2O$	250	250
$(NH_4)_2SO_4$	134	134
NaH_2PO_4, H_2O	150	315
<u>Microéléments</u>		
KI	0,75	0,75
H_3BO_3	3,0	3,0
$MnSO_4, H_2O$	10	10
$ZnSO_4, 7H_2O$	2	2
$Na_2MoO_4, 2H_2O$	0,25	0,25
$CuSO_4, 5H_2O$	0,025	0,025
$CoCl_2, 6H_2O$	0,025	0,025
$Na_2, EDTA$	37,3	37,3
$FeSO_4, 7H_2O$	27,8	27,8
<u>Vitamines</u>		
Acide nicotinique	1,0	1,0
Pyridoxine. HCl	1,0	1,0
Thiamine. HCl	10	10
<u>Acides aminés</u>		
Glycine	-	4,0
<u>Sucre et dérivé alcool</u>		
Saccharose	20 000	10 000
Myo-inositol	100	100



Pour une concentration de 0,25 mg/l, les tiges s'allongent et présentent, en moyenne, 6 à 8 noeuds par tige. La vigueur de la culture âgée d'un mois est bonne.

En doublant la concentration (0,5 mg/l), les bourgeons s'allongent comme dans le premier cas, mais l'étiollement est important. Les feuilles se recourbent.

Dans ces deux conditions, aucun enracinement ne se produit.

En absence de toute substance de croissance, les tiges s'allongent aussi mais montrent une capacité rhizogène ultérieure.

3.3- Enracinement

Les essais sont effectués sur le milieu B5 modifié contenant diverses concentrations des régulateurs de croissance ou dépourvu de ces mêmes substances. Chaque condition est étudiée sur au moins 20 explantats ; seuls ceux qui montrent une racine d'au moins 0,5 cm de longueur sont comptabilisés.

Les bourgeons enracinés, dans les différentes conditions expérimentales, développent des racines fines, de type adventif, localisées près de la base du bourgeon.

D'autre part, la présence simultanée de boutons floraux se manifeste dans la plupart des expériences d'enracinement (tableau 18 et 19).

3.3.1- Action de l'ANA associé à une cytokinine

Nous avons constaté que l'action combinée d'auxines et de cytokinines exogènes, ces dernières étant employées à différentes doses (tableau 18), et pour une concentration constante en ANA de 0,18 mg/l, ne conduit pas à la formation de racines. A une teneur en ANA inférieure, 0,018 mg/l, près d'un tiers des explantats s'enracinent, mais les bourgeons ont un aspect fragile. En règle générale, la vigueur des cultures est diminuée lorsqu'on réduit l'apport de substances de croissance. Dans toutes les conditions, les explantats ont fleuri.

ANA mg/l	6-BA mg/l	N° explants avec racines	
0,18	0,02	2	<u>Tableau 18</u> : Action de l'ANA combiné à la 6-BA sur l'enracinement de bourgeons provenant de cultures d'apex de <u>Chenopodium quinoa</u> .
	0,002	1	
	0,0002	0	
	0,00002	0	
0,018	0,02	7	Temps de culture : quatre semaines.
	0,002	8	
	0,0002	8	
	0,00002	6	

3.3.2- Action des auxines

La moitié, environ, des explants cultivés en présence d'une substance auxinique forme des racines (tableau 19), mais, dans le même temps, une chute des feuilles intervient, ce qui nuit à la survie des petites plantes lors de leur transfert en pots. L'autre moitié conserve un bon état foliaire mais la formation des racines n'est pas observée.

	teneur en mg/l	N° explants avec racines	
ANA	0,93	9	<u>Tableau 19</u> : Action de différentes auxines sur l'enracinement de bourgeons provenant de cultures d'apex de <u>Chenopodium quinoa</u> .
	0,18	11	
	0,093	8	
	0,018	12	
AIB	1,0	13	Temps de culture : quatre semaines.
	0,2	14	
	0,1	6	
	0,02	2	
AIA	0,88	8	
	0,17	11	
	0,088	7	
	0,017	10	



3.3.3- Action de retardateurs de croissance

L'adjonction au milieu de culture de retardateurs de croissance, en présence d'auxines et de cytokinines, ou de cytokinines seules, n'a pas d'effet rhizogène. Pourtant, en absence de régulateur de croissance, l'AMO 1618, ajouté à la concentration de 0,03 mg/l favorise l'apparition des racines chez la moitié des explantats. De même, le CCC, employé à des doses de 1,5 mg/l et 0,15 mg/l, et en absence de régulateurs de croissance, stimule la rhizogénèse dans 10 et 20 % des cas, respectivement.

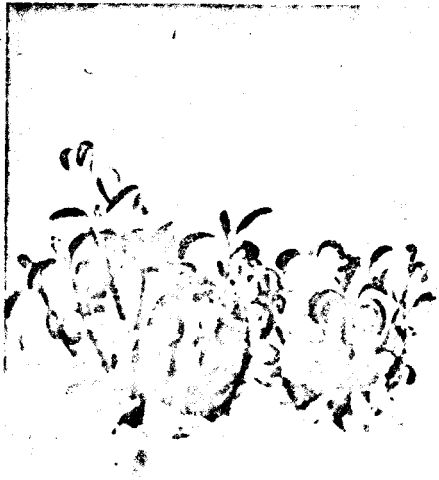
3.3.4 Milieu dépourvu de substances de croissance

Après 35 jours de culture, 60 % des bourgeons, placés sur un milieu gélosé ou liquide, dépourvu de substances de croissance, s'enracinent. Cherchant à maintenir la vigueur des bourgeons cultivés sur ce milieu sans régulateur de croissance nous avons vérifié l'effet favorable d'une thermopériode de 20°C le jour et de 4°C la nuit, la photopériode suivant un régime de 12 heures de lumière par jour. Les bourgeons sont maintenus dans ces conditions pendant 15 jours.

Il s'est avéré que ces conditions ont nettement facilité la formation des racines (75 %) et se sont montrées bénéfiques au transfert ultérieur en pots des plantules enracinées.

La substitution d'un milieu gélosé par un milieu liquide avec support en papier filtre permet un développement des racines secondaires et des poils absorbants ; d'autre part, ce dispositif empêche la formation de cals à la base des explantats. Enfin, les bourgeons peuvent être retirés du milieu de culture sans rupture des fines racines.

Afin d'améliorer l'enracinement "in vitro" du Chenopodium quinoa, nous avons examiné l'action de l'oxygénation du milieu. Des erlenmeyers (50 ml) renfermant des bourgeons, et contenant le milieu B5 modifié, ont été placés sur une table à agitation horizontale. Quatre bourgeons sur les six étudiés forment une racine principale et quelques racines secondaires ; leurs ti-



A



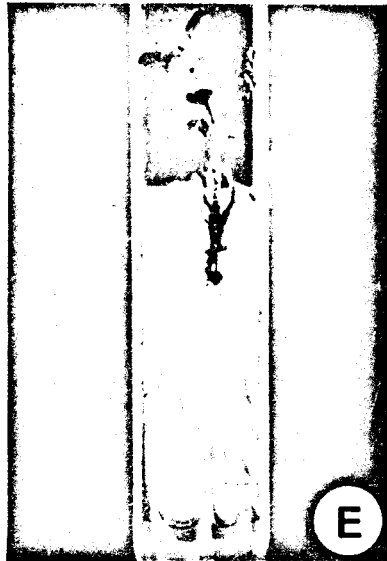
B



C



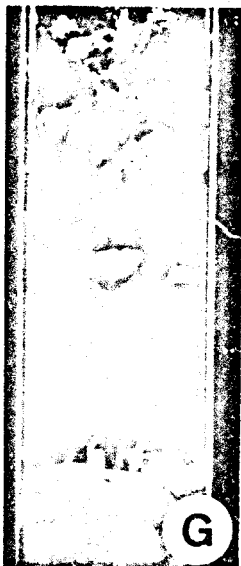
D



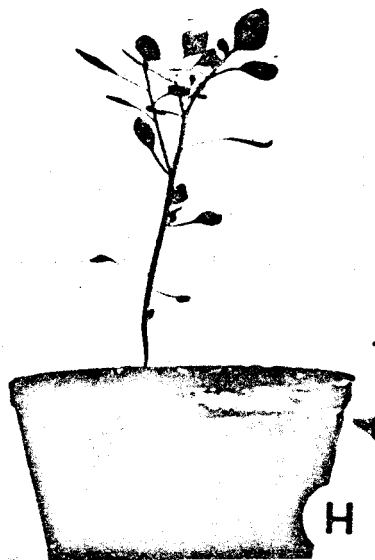
E



F



G



H



I

ges sont plus robustes que celles développées en culture statique, mais un cal apparait à la base des tiges. Le transfert en terre n'a pas été effectué.

3.4- Transfert en terre

Sur vingt bourgeons enracinés, transplantés, six ont réussi à se développer en pots et deux ont poursuivi leur croissance dans une serre, atteignant une hauteur supérieure à 2 mètres au moment de la floraison. Ces plantes issues de bourgeons entretenus "in vitro" pendant deux ans montrent une morphologie externe tout à fait comparable à celle des plantes obtenues par semis.

Les différentes étapes conduisant à la multiplication végétative du Chenopodium quinoa sont résumées à la figure 3. La planche II en montre l'illustration.

SCHEMA DE MULTIPLICATION VEGETATIVE

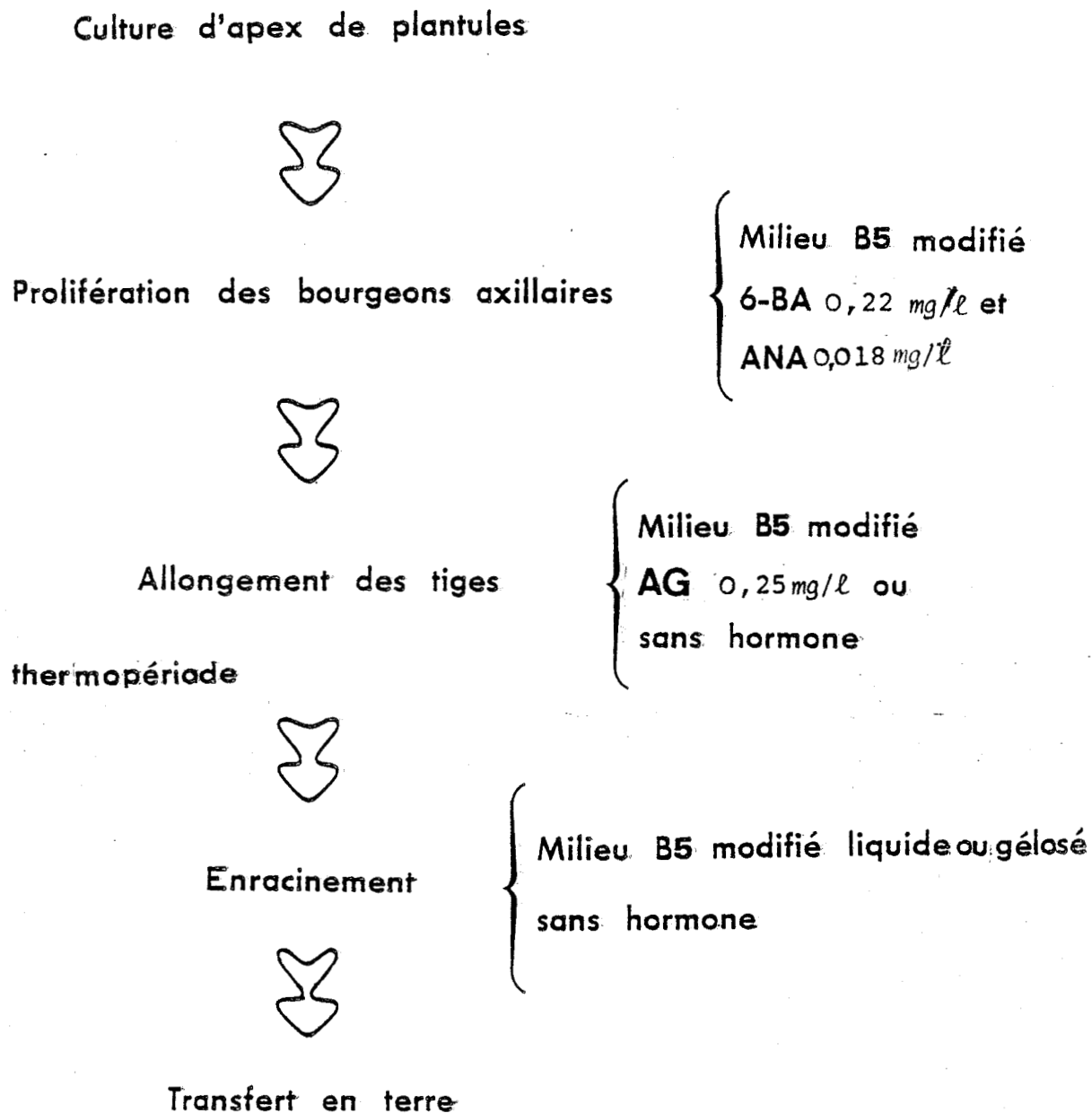


Figure 3: Etapes de la multiplication végétative du Chenopodium quinoa. Thermopériode de 20°C le jour et 4°C la nuit, associée à une photopériode de 12 heures de lumière par jour.



II- ETUDES DES SAPONINES DE QUINOA

1- Analyse qualitative par chromatographie sur couche mince

L'absence de saponines commerciales témoins destine cette méthode essentiellement à l'identification des sapogénines libérées par hydrolyse des saponines.

Cependant, à titre d'illustration, on décrit, tout d'abord, la séparation chromatographique des saponines des deux variétés de Chenopodium quinoa.

1.1- Les saponines des graines

Les saponines extraites chimiquement, à partir des graines des variétés amères et douces, sont comparées ; on examine la migration relative (R_f) et les couleurs des composés chromatographiés (figure 4), après révélation.

Le chromatogramme correspondant à la variété Real de Puno révèle que trois des six taches détectées (R_f : 0,69 ; 0,65 et 0,39) présentent une réaction positive au révélateur Liebermann-Burchard.

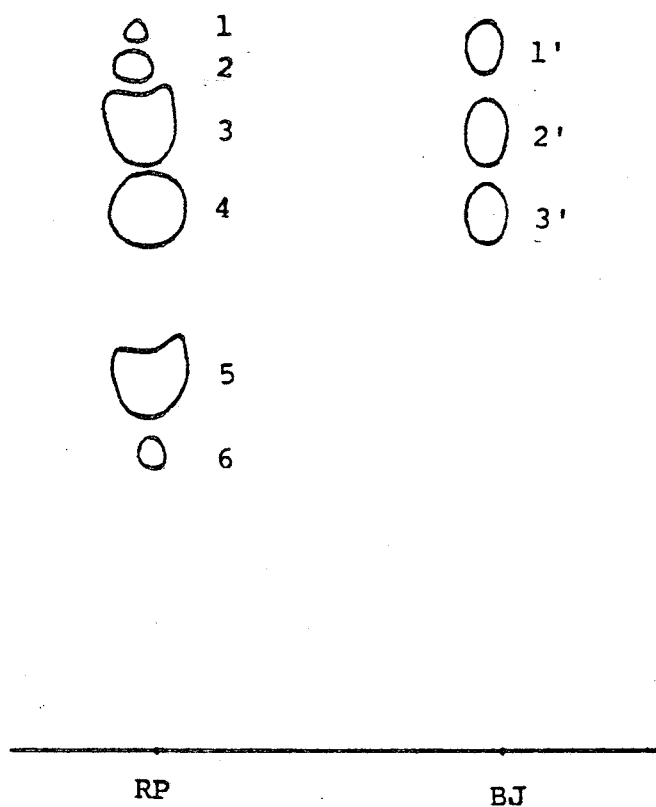
La chromatographie des saponines extraites de la variété douce ne laisse apparaître qu'une seule tache positive (R_f : 0,70) ; elle est faiblement colorée.

1.2- Les sapogénines

La séparation chromatographique des sapogénines d'une même variété exige, selon les extraits, la concentration ou la dilution des échantillons ; ceci traduit une variation des teneurs en génines des différents tissus analysés.

Une numérotation est attribuée aux taches mises en évidence ; elle s'appuie sur les distances relatives de migration des composés, mais aussi, et surtout, sur leur coloration après

CHROMATOGRAMMES DES SAPONINES EXTRAITES DES GRAINES

Figure 4: Chromatogramme des saponines des graines de Chenopodium quinoa

Variété Real de Puno (RP)			Variété Blanca de Junin (BJ)		
Composé n°	R _f	Couleur	Composé n°	R _f	Couleur
1	0,72	marron	1'	0,70	violet clair
2	0,69	violet clair	2'	0,62	jaune
3	0,65	violet foncé	3'	0,55	marron-grisâtre
4	0,59	jaune			
5	0,46	marron grisâtre			
6	0,39	rose			

révélation de la chromatoplaque. Seuls sont pris en compte les dérivés aux tonalités rousse-violettes.

Des quantités connues et constantes de substances témoins sont déposées et chromatographiées conjointement aux extraits.

1.2.1- Chez la variété Real de Puno

La figure 5 rassemble les observations concernant l'analyse des sapogénines de la variété amère.

1.2.1.1- La plante entière

1.2.1.1.1- Les graines

Les graines, dont on connaît la richesse en saponines, renferment quatre aglycones majeurs ; les valeurs des R_f respectifs sont : 0,82 ; 0,77 ; 0,65 et 0,34.

La tache principale (2' ; R_f : 0,65) se caractérise par une migration relative identique à celle de l'acide oléanolique (II).

En examinant les colorations des substances les moins polaires (taches 1' et 1''), on en déduit que les graines sont exemptes d'oléanolate de méthyle (I).

L'observation de plusieurs chromatogrammes confirme que l'acide échinocystique n'est pas un aglycone concentré dans les graines de cette variété, tout au moins à des doses détectables. Par contre, le composé 5 (R_f : 0,34) est présent en quantité importante et paraît caractériser la variété Real de Puno.

1.2.1.1.2- Les racines

Par analyse des chromatoplaques, il ressort que les racines sont pratiquement aussi riches en sapogénines que les graines. Quatre composés principaux sont repérés, aux valeurs de R_f suivantes : 0,85 ; 0,77 ; 0,65 et 0,35.

Par migration simultanée des substances témoins, la présence d'acide oléanolique ($R_f : 0,65$) est établie.

L'existence d'acide échinocystique ($R_f : 0,47$) est très probable (composé 3). Le composé plus hydrophyle (5) est également présent, tout comme dans les graines.

Une génine plus hydrophobe que l'oléolate de méthyle ($R_f : 0,80$), présentant une migration supérieure ($R_f : 0,85$), est détectée ; après révélation, son dérivé (tache 1) est de même couleur que celui de l'oléolate de méthyle. Une substance (1'') à mobilité rapprochée est aussi détectée ($R_f : 0,77$).

1.2.1.1.3- Les tiges et les feuilles

Leur contenu en génines est pauvre. L'acide oléanolique et l'acide échinocystique sont virtuellement absents. Pourtant, une tache (1) caractérisée par un R_f supérieur à celui de l'oléolate de méthyle est visualisée ($R_f : 0,83$).

Une tache (4) mineure, bleu-violette, dont le R_f est de 0,41, n'est détectée que dans ces organes.

1.2.1.2- Les tissus cultivés "in vitro"

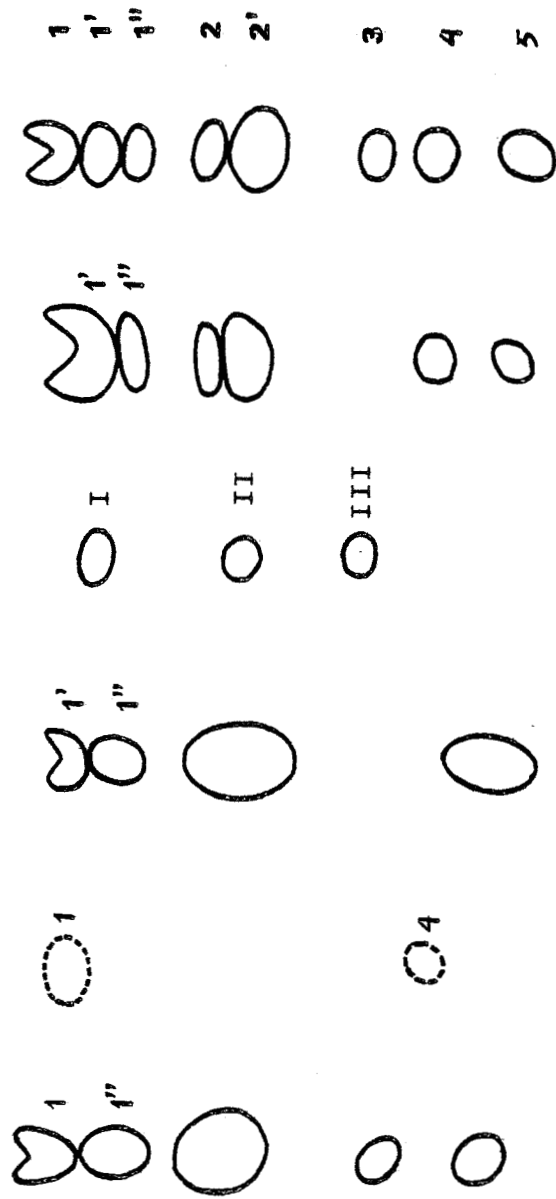
1.2.1.2.1- Les bourgeons

Qualitativement, les bourgeons contiennent deux aglycones prépondérants aux valeurs de R_f de 0,65 et 0,82. Le premier (2') est identifié comme étant l'acide oléanolique le deuxième (1'), à migration supérieure, est légèrement moins polaire que l'oléolate de méthyle ; sa couleur en est distincte.

Deux composés (2 et 1'') se caractérisent par des migrations relatives très proches de celles des deux premières substances. Pour la génine 1'', des analogies peuvent être observées avec les aglycones isolés des racines et des graines des plantes entières.

FIGURE 5

Chromatogrammes des sapogénines de la var. Real de Puno



BUS LILLE

R F G T B C

La sapogénine 5 est présente, tout comme chez les racines et les graines. Par contre, la sapogénine 4 (Rf : 0,41) est plutôt apparentée à celle détectée dans l'échantillon F (tiges et feuilles).

1.2.1.2.2- Les colonies tissulaires

La composition en génines des colonies tissulaires s'apparente à celle des bourgeons, s'en distinguant, néanmoins, par l'existence de deux aglycones supplémentaires (1 et 3) ; leurs caractéristiques de migration sont de 0,85 et 0,48. La migration relative de la sapogénine 3 est semblable à celle de l'acide échinocystique.

1.2.2- Chez la variété Blanca de Junin

La figure 6 représente l'ensemble des observations résultant de l'analyse de la variété douce.

1.2.2.1- La plante entière

1.2.2.1.1- Les graines

Une génine principale et trois mineures sont concentrées dans les graines.

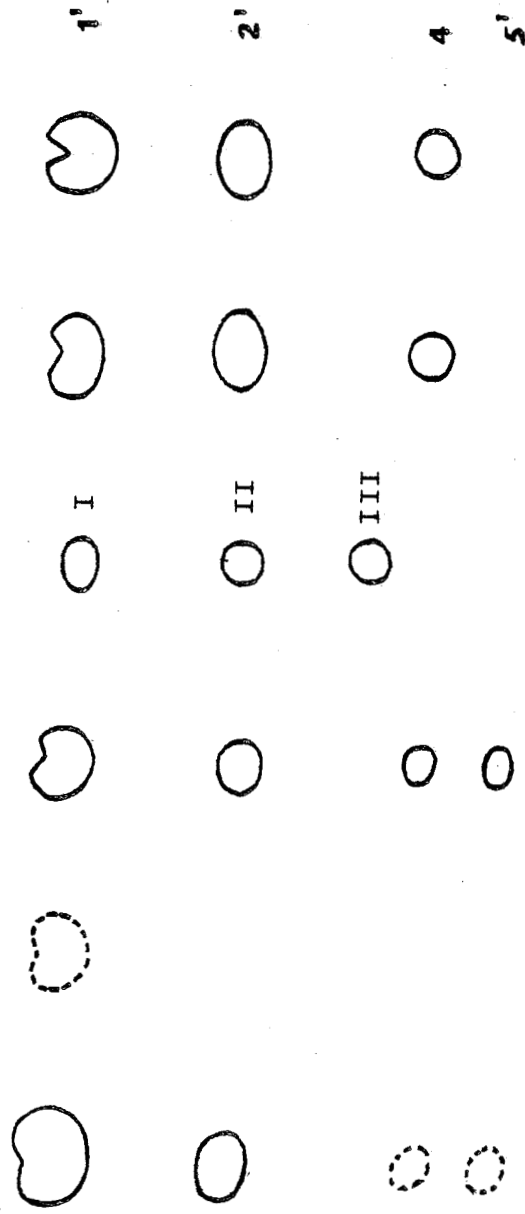
Le composé majeur (1') migre à un Rf proche de celui de l'oléanolate de méthyle ; l'aglycone 2' s'apparente à l'acide oléanolique ; les génines 4 et 5' sont détectées à un Rf inférieur à celui de l'acide échinocystique.

1.2.2.1.2- Les racines

Deux taches apparaissent, correspondant aux aglycones 1' (Rf : 0,84) et 2' (Rf : 0,66). Ce sont ces mêmes génines qui sont extraites des graines. Par contre, les sapogénines 4 et 5', détectées dans le cas précédent, ne sont trouvées qu'à l'état de traces.

FIGURE 6

Chromatogrammes des sapogénines de la var. Blanca de Junin



R F G T B C

1.2.2.1.3- Les tiges et les feuilles

L'aglycone 1' est révélé sous forme d'une tache diffuse. Aucune autre génine n'est, semble-t-il, isolée.

1.2.2.2- Les tissus cultivés "in vitro"

1.2.2.2.1- Les bourgeons

Ils renferment trois sapogénines différentes, dont le composé 1' (Rf : 0,83) et l'acide oléanolique (2' Rf : 0,66). La troisième a les mêmes caractéristiques chromatographiques que la génine 4 trouvée préalablement chez les graines (Rf : 0,43).

1.2.2.2.2- Les colonies tissulaires

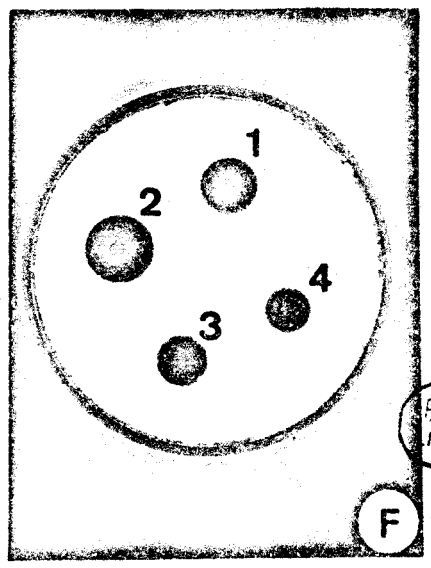
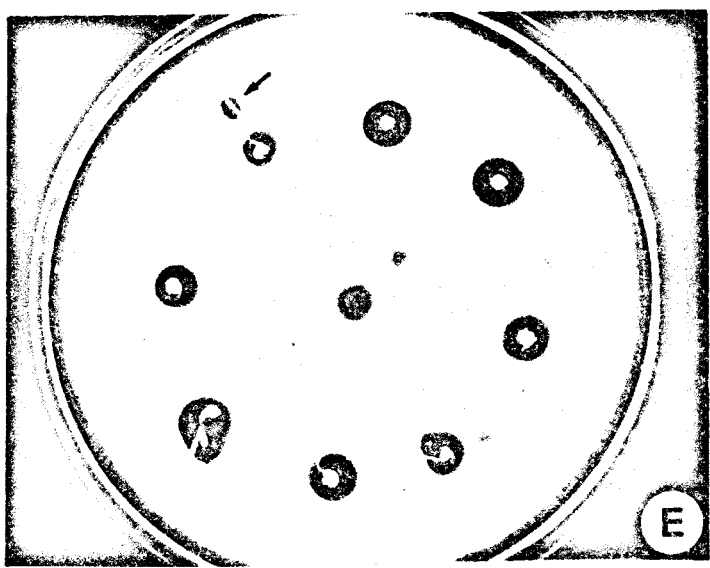
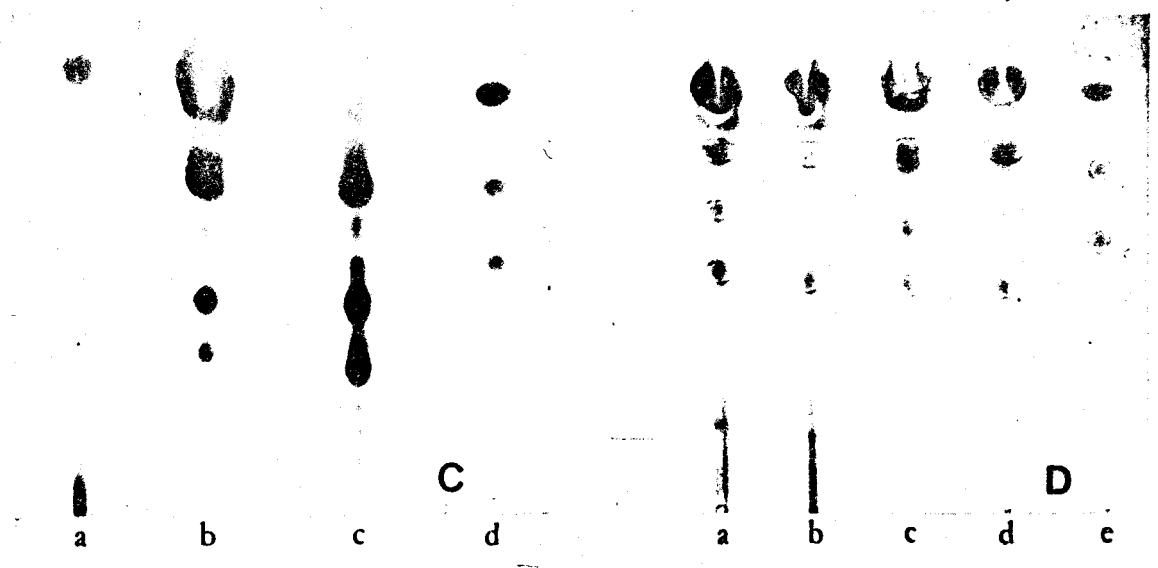
La composition en aglycones des cals est, apparemment, très semblable à celle des bourgeons.

1.2.3- Analyse comparée

De l'examen global des chromatogrammes, il ressort les points ci-après :

- L'acide oléanolique est une génine constitutive des saponines synthétisées à la fois par les plantes-mères, à l'exception des parties vertes des deux variétés, et par les tissus cultivés "in vitro". La variété amère contient une teneur supérieure en acide oléanolique si on appuie cette déduction sur l'intensité de coloration des taches.

- La mise en culture des fragments de la partie aérienne des plantules, entretenus à l'état de bourgeons, ou en colonies tissulaires inorganisées, se traduit par une synthèse d'acide oléanolique, alors que celui-ci n'est pas détecté dans les parties aériennes des plantes adultes.



BUS
ILLE

- La variété amère se différencie de la variété douce par l'élaboration d'un aglycone (5) présent en quantités relativement importantes dans les graines, de même que dans les racines, et en quantités moindres dans les bourgeons et dans les calcs obtenus "in vitro".

- L'acide échinocystique, aglycone des saponines isolées d'autres espèces de Chenopodium, ne serait présent que dans les colonies tissulaires et vraisemblablement dans les racines de la variété amère.

- Les colonies tissulaires de la variété Real de Puno élaborent les différentes génines distribuées dans les trois types d'organes étudiés dans la plante entière.

La planche III Aed montre les différents chromatogrammes obtenus.

2- Dosage semi-quantitatif par la méthode hémolytique

2.1- Courbe d'étalonnage

La courbe étalon (figure 7) montre la proportionnalité pour la gamme de concentration employée, entre la quantité de saponines commerciales (Coultronics S.A.) déposée dans les puits et le diamètre de l'anneau d'hémolyse, après 24 heures d'incubation.

2.2- Matériel végétal

La détermination semi-quantitative du contenu en saponines est réalisée, selon le cas, sur du matériel frais, lyophilisé ou sur les extraits bruts.

L'analyse des graines a porté sur un matériel non cryodesséché, ou sur des extraits bruts.

Le contenu en saponines des colonies tissulaires est apprécié sur le matériel frais, lyophilisé et, dans certains cas, sur les extraits bruts.

Les résultats sont rapportés en fonction de l'état du matériel examiné (Tableau 20).

COURBE ETALON DES SAPONINES HEMOLYTIQUES

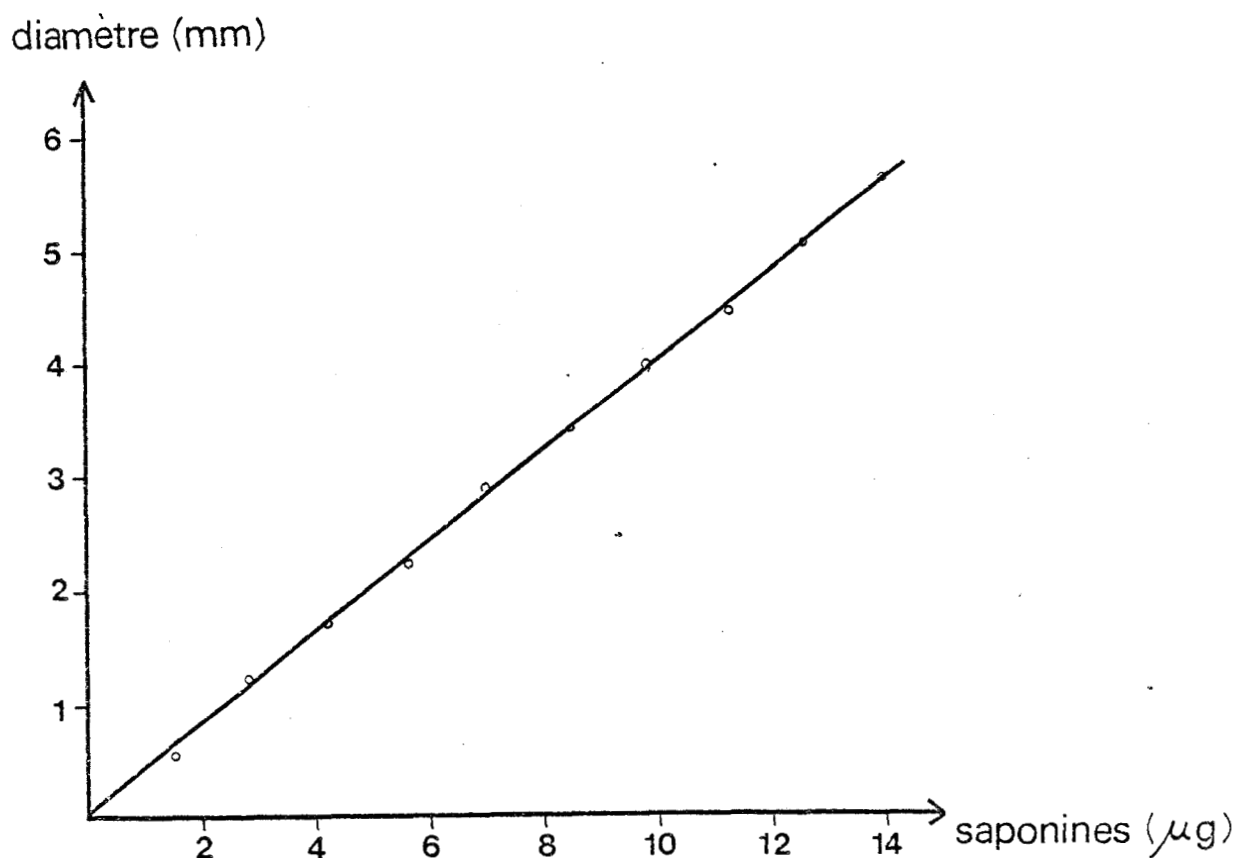


Figure 7: Mesure de diammètre (mm) de l'anneau d'hémolyse en fonction de la quantité (μg) de saponines commerciales témoins.



2.2.1- Echantillons frais

Les résultats obtenus pour les variétés Real de Puno et Blanca de Junin sont transcrits dans le tableau 20.

La sensibilité de la méthode d'estimation quantitative est suffisante pour autoriser la détection des saponines contenues dans une seule graine ; le poids moyen de celles-ci est de 2 à 3 mg.

De l'analyse des résultats, il transparait l'importance de la teneur moyenne en saponines hémolytiques des graines de la variété amère (0,53 %, pour une activité hémolytique identique à celle des saponines commerciales), en comparaison au taux détecté dans celles de la variété douce (inférieur à 0,015 pour cent).

Des essais parallèles ont été réalisés sur les graines de cinq autres variétés (tableau 21). L'analyse des akènes isolés suggère que deux d'entre elles élaborent des saponines hémolytiques, les trois autres en paraissent dépourvues. On a observé que les pointes des racines des jeunes plantules des variétés riches en saponines, mises au contact avec le substrat, causent l'hémolyse des hématies. C'est le cas également des graines de la variété Kcoito qui, quoique démunies de saponines hémolytiques détectables, donnent naissance à une racine dont la pointe renferme, elle, des substances hémolysantes.

Variétés	% saponines hémolytiques	
Kcancolla	0,44	Tableau 21 : Analyse quantitative (%) des saponines hémolytiques contenues dans des graines de différentes variétés de <u>Chenopodium quinoa</u> .
Wila Jiura	0,10	
Sajama	< 0,015	
Witulla	< 0,015	
Kcoito	< 0,015	

Les pourcentages sont exprimés par analogie avec l'activité hémolytique de différentes solutions de saponines commerciales (Coultronics S.A.) témoins. La méthode permet de détecter des pourcentages de saponines hémolytiques supérieurs à 0,015.

% Saponines hémolytiques

Echantillons	Matériel	Matériel	Extrait
	lyophilisé	frais	Brut
<u>Real de Puno</u>			
- Graines	—	0,53	0,81
- Racines	1,2	—	1,6
- Jeunes feuilles	< 0,015	< 0,015	< 0,015
- Bourgeons	0,13	—	0,15
- Cals (épicotyle)	0,09	0,03	0,10
- Cals (racine)	0,16	0,07	—
<u>Blanca de Junin</u>			
- Graines	—	< 0,015	0,09
- Racines	0,25	—	0,22
- Jeunes feuilles	< 0,015	< 0,015	< 0,015
- Bourgeons	0,10	—	0,13
- Cals (épicotyle)	0,07	< 0,015	0,09
- Cals (racine)	0,09	0,04	—

Tableau 20 : Analyse quantitative (%) des saponines hémolytiques contenues dans différents organes des plantes et dans des tissus cultivés "in vitro" de Chenopodium quinoa var. Real de Puno et Blanca de Junin.

Les pourcentages sont exprimés par analogie avec l'activité hémolytique de différentes solutions de saponines commerciales (Coultronics S.A.) témoins.

La méthode permet de détecter des pourcentages de saponines hémolytiques supérieurs à 0,015.

Les jeunes feuilles des deux variétés étudiées sont dépourvues de saponines hémolytiques détectables par cette méthode.

Les colonies tissulaires renferment des glucosides à propriété hémolytique, celles issues des racines en étant légèrement plus riches (0,07 et 0,04 %) que celles qui dérivent des épicotyles (0,03 % pour Real de Puno ; non détectables pour Blanca de Junin).

2.2.2- Matériel lyophilisé

Le système racinaire de la variété amère est particulièrement riche en saponines hémolytiques (1,2 %), tandis que celui de la variété douce est nettement plus pauvre (0,25%).

Les parties aériennes, dont les jeunes feuilles, n'élaborent pas ces substances, confirmant les données fournies par l'analyse du matériel frais.

Le contenu des bourgeons est proche chez les deux variétés : de l'ordre de 0,13 et 0,10 %.

Les quantités mises en évidence chez les calcs cryodesséchés des variétés amères et douces sont légèrement supérieures à celles déterminées sur le matériel frais. Elles demeurent néanmoins supérieures pour les calcs obtenus à partir des racines (respectivement, 0,16 % pour la variété amère et 0,09 % pour la variété douce) à celles des colonies dont les explantats primaires sont des épicotyles (respectivement, 0,09 % pour la variété amère et 0,07 % pour la variété douce).

2.2.3- Extraits bruts

Disposant de quelques extraits bruts renfermant des saponines, nous avons précisé l'activité hémolytique de ces échantillons et calculé cette valeur en fonction du matériel de départ soumis à l'extraction.

Les graines de la variété amère présentent, alors 0,81 % de saponines hémolytiques, la variété douce montrent, cette fois-ci, une activité détectable et égale à 0,09 %.

Les extraits bruts des racines ont une activité hémolytique relativement plus élevée que celle des graines et égale à 1,6 et 0,22 %, respectivement pour Real de Puno et Blanca de Junin.

L'absence de saponines hémolytiques dans les parties aériennes des deux variétés se confirme.

Le matériel "in vitro" manifeste, en ce qui concerne les bourgeons, une activité de 0,15 % (Real de Puno) et de 0,13 % (Blanca de Junin) ; les cals dérivés d'épicotyle montrent des teneurs proches pour les deux variétés (0,10 et 0,09 %).

L'activité hémolytique de certains de ces échantillons est illustrée à la planche III-E-F.

CONSIDERATIONS
GENERALES

CONSIDERATIONS GENERALES

Dans notre travail sur le Chenopodium quinoa, nous avons abordé les problèmes de l'organogénèse "in vitro" et de la biosynthèse des saponines triterpéniques. Tout d'abord, nous comparerons le schéma expérimental de multiplication végétative du Chenopodium quinoa, que nous avons établi, avec les résultats obtenus par nos devanciers sur des espèces de la même famille.

En absence de travaux sur la culture "in vitro" du Chenopodium quinoa, nous nous sommes appuyée sur quelques faits déjà établis qui nous ont guidée pour le choix d'un milieu de culture.

Les Chénopodiacées ont, dans la nature, certaines exigences ; on connaît, en particulier, leur avidité pour l'azote (HELLER, 1977). D'autre part, le Chenopodium quinoa apprécie les sols riches en phosphates (ANGLES, 1977).

Les essais préliminaires "in vitro" ont démontré que la composition du milieu B5 est mieux adaptée que celle du milieu MS à la culture des apex de Chenopodium quinoa. Le même phénomène s'observe pour les apex de Pisum sativum (KARTHA et al., 1974 BAJAJ et DHANJU, 1979), d'Allium sativum (BHOJWANI, 1980), de Glycine maximum (SAKA et al., 1980), de Medicago sativa, de Trifolium repens et de Trifolium pratense (CHEYNE et DALE, 1980). Dans certains cas, Rheum rhaponticum en est l'illustration, la culture sur le milieu MS est même irréalisable (WALKEY, 1968).

La comparaison de ces deux milieux, qui diffèrent par la richesse en éléments minéraux, en particulier, suggère que d'autres facteurs peuvent influencer la croissance des explantats de quinoa : d'une part, les concentrations de certains microéléments, d'autre part, la teneur en saccharose.

En substituant les microéléments du milieu B5 par ceux du milieu MS, le nombre moyen de bourgeons développés par culture diminue, tandis que le degré de chlorose s'accroît. Ces effets peuvent être surtout attribués au doublement de la concentration en sels de manganèse, et, à un degré moindre, au quadruplement de la teneur en sels de zinc.

- En effet, le manganèse, comme d'autres métaux lourds, lorsqu'il est présent à doses excessives, peut provoquer une déficience en fer très marquée. Cet élément entre en compétition pour les sites d'absorption et de transport du fer, et bloque les sites actifs de complexation (HEWITT, 1963).

- Des effets compétitifs similaires entre le zinc et le fer peuvent se produire lorsque les sels de zinc sont présents, dans le milieu de culture, à forte concentration. Il peut en résulter un endommagement des feuilles et un phénomène de chlorose (HOAGLAND 1963).

- On sait aussi que, fréquemment, les besoins en bore d'une plante sont strictes et confinés, pour chaque espèce, à une gamme de concentration étroite. Certaines exigent des quantités relativement élevées, d'autres préfèrent des doses de quelques ppm seulement (EPSTEIN, 1972) qui favorisent des processus d'organogénèse, comme c'est le cas pour les tissus de topinambour cultivés "in vitro" (TRIPATHI, 1972). La réduction de la teneur en bore, due à la substitution du milieu MS par le milieu B5, a pu se révéler bénéfique aux bourgeons de Chenopodium quinoa. Nous n'avons cependant pas étudié cet aspect.

La teneur initiale du milieu B5 en saccharose (2 %) est inférieure à celle du milieu MS (3 %). Une diminution accrue (1 %) se traduit par un jaunissement moins accentué des bourgeons. Le Chenopodium quinoa montre, en effet, des exigences très précises en sucre et constitue un matériel qui illustre les actions parfois inhibitrices que des teneurs trop importantes en sucre peuvent, d'une façon générale, causer sur le développement des bourgeons ou sur leur vitalité (CHENG et VOQUI, 1977). A une dose de glucose de 3 %, les explantats meurent ; aux mêmes teneurs en saccharose, leur croissance est très ralentie. En ce domaine, le comportement des apex de Chenopodium quinoa va à rebours de celui observé dans des cultures d'apex de Vicia faba. BALL et SOMA (1965), sur ce matériel, étudient la croissance sur des milieux à concentrations en sucre très différentes, de 10 à 80 g/l. A cette dernière concentration, si les divisions cellulaires sont moins rapides, les apex restent cependant vivants. La croissance optimale est obtenue pour des teneurs en glucose comprises entre 10 et

30 g/l. L'amélioration de la vigueur des plantules de Chenopodium quinoa, corrélative à la diminution à 1 % de la teneur en sucre, est plus nette lorsque le saccharose est la source sucrée plutôt que le glucose. Le saccharose apparaît donc comme une source plus bénéfique, sans que, pour autant, les raisons en soient éclaircies au plan expérimental; il en est de même pour d'autres espèces (MURASHIGE, 1973).

Cherchant à fournir aux explantats de Chenopodium quinoa un milieu nutritif mieux adapté, nous avons entrepris des modifications de la composition du milieu B5. Aussi, les teneurs en nitrates et en phosphates ont-elles été augmentées.

- Nous avons été amenée à apporter des nitrates à une dose supérieure à celle du milieu MS, et légèrement plus élevée que celle du milieu B5. Le caractère nitrophile des Chénopodiacées se manifeste donc aussi lors de la culture des apex de Chenopodium quinoa "in vitro", tout comme il en est pour la culture des cals organogènes de Beta vulgaris qui se développent sur un milieu contenant 2125 mg/l de nitrate de sodium et 808 mg/l de nitrate de potassium (MARGARA, 1970), ou pour les phases d'initiation des cultures cellulaires en suspension de Spinacia oleracea (DALTON, 1980), qui nécessitent 2956 mg/l en nitrate de potassium. Les apports d'azote, sous forme minérale, apparaissent comme un facteur stimulateur de la caulogénèse, sans qu'une diminution de l'aspect chlorotique ne soit enregistrée chez les bourgeons de quinoa développés "in vitro".

- Tout au contraire, les phosphates, à des concentrations supérieures à 270 mg/l, contribuent à la fois à la prolifération des bourgeons axillaires et à l'amélioration de la vigueur des explantats dont le jaunissement s'atténue. Ce point reflète les besoins importants en phosphates du Chenopodium quinoa, tant aux stades précoces de croissance que tardifs, tel qu'il en est aussi pour d'autres Chénopodiacées (PANDY et al., 1971). Nos observations sont à mettre en parallèle avec celles réalisées par MATHEWS et al. (1976) chez des bourgeons apicaux d'Ananas sativus; d'après ces auteurs, les teneurs élevées en sels de phosphate du milieu MS (170 mg/l), bien que faibles par rapport à celles requises pour la culture des apex de Chenopodium quinoa, sont hautement

stimulantes du développement des bourgeons axillaires. Les doses utilisées par MARGARA (1970), pour favoriser la néoformation des bourgeons de Beta vulgaris, sont plus élevées : 270 mg/l de phosphate acide de potassium, et se rapprochent de celles choisies lors de nos expériences.

De nombreuses espèces cultivées "in vitro" manifestent un besoin en acides aminés ; la quinoa semble s'inscrire dans cette catégorie. L'arginine et la L-glutamine, cette dernière étant présente dans le milieu de culture des suspensions cellulaires de Spinacia oleracea (DALTON, 1980), semblent ne pas favoriser la culture des bourgeons axillaires de quinoa ; cependant, les teneurs auxquelles elles ont été adjointes au milieu, faibles par rapport à celles employées par KAMADA et HARADA (1979), se maintiennent dans une gamme étroite qui laissent ouvertes les hypothèses d'un effet stimulateur de ces deux acides aminés à des doses supérieures (TULECKE et RUTNEK, 1965).

- La glycine est manifestement salutaire aux bourgeons, diminuant leur chlorose de manière très prononcée, tout en contribuant à augmenter le nombre des bourgeons développés par explantat. L'utilisation de cet acide aminé a été initialement préconisée par WHITE (1939), comme agent favorisant la culture des racines de tomate, même si l'adjonction de ce composé ne se justifie pas pour les cultures tissulaires de certaines espèces (GAUTHERET, 1959). Cet amino-acide est fréquemment utilisé en culture d'apex ou de méristèmes (WALKEY, 1972 ; CONGER, 1980).

Les cytokinines sont dotées de propriétés stimulatrices de la multiplication des bourgeons, qu'elles soient présentes seules ou combinées à d'autres régulateurs de la croissance. HUSSEY (1976) trouve que la culture des Monocotylédones "in vitro", chez lesquelles la dominance apicale est très nette, sur un milieu enrichi en 6-BA, est à même de stimuler la ramification du bourgeon. Chez les Dicotylédones, l'action stimulante de la benzyladénine a été de maintes fois vérifiée. En ce qui concerne le Chenopodium quinoa, une multiplication satisfaisante des bourgeons est assurée pour une gamme de 6-BA exogène supérieure à 0,02 mg/l et infé-

rieure à 2,2 mg/l. Aux concentrations plus élevées, la vitalité des bourgeons s'affaiblit. A des teneurs de 0,02 mg/l ou moins, un phénomène de dominance apicale se révèle, tandis que le nombre moyen de bourgeons développés par explantat diminue.

L'action de l'acide gibbérellique a retenu notre attention. D'une façon générale, ce régulateur de croissance, appliqué de manière exogène, stimule l'allongement des tiges (REY et MROGINSKI, 1978). Des incidences favorables sur la rhizogénèse sont parfois observées (REY et MROGINSKI, 1978 ; NOVAR et MASKOVA, 1979). Effectivement, les tiges de Chenopodium quinoa s'allongent après un traitement par immersion de trois à cinq secondes dans l'acide gibbérellique. Par contre, la rhizogénèse ne se manifeste pas, même lorsque les explantats subissent un transfert ultérieur sur un milieu dépourvu de substances de croissance. Il est intéressant de noter que ce sont des réactions du même ordre que développe une autre Chénopodiacée, l'Atriplex canescens, lorsqu'elle est placée dans des conditions de culture très semblables (WOCHOK et SLUIS, 1980). Chez cette espèce, un synergisme des actions de l'acide gibbérellique, de l'AIA et de la Kinétine stimulerait la multiplication des bourgeons, tout comme leur élongation, ce qui n'est pas le cas chez Chenopodium quinoa.

Les essais entrepris nous ont permis de dégager, dans leurs grandes lignes, les conditions favorables à l'enracinement du quinoa.

- En combinant ANA et 6-BA, un nombre, certes réduit, d'explantats développe des racines ; mais, la diminution de l'apport en cytokinines exerce un effet néfaste sur la vigueur de la région foliaire. L'apparition des bourgeons floraux est fréquemment observée, se concrétisant par un arrêt de la croissance végétative des bourgeons. Il aurait été intéressant de préciser les conditions qui favorisent la floraison des explantats. On peut citer, à ce propos, les expériences "in vivo" de SIMMONDS (1965) qui montre une relation entre la diminution de l'espace réservé aux racines et la propension des plantes à fleurir précocement.

BUS
LILLE

- En présence d'auxines, et sans cytokinine, la formation des racines est plus fréquente que dans le cas précédent. Le succès dans la transplantation des explantats est très atténué par l'affaiblissement des bourgeons cultivés sans cytokinine. Tel est le phénomène enregistré également par HASEGAWA (1980) qui précise les conditions d'enracinement des bourgeons obtenus par culture d'apex de Rosa hybrida.

- Aucune amélioration de la rhizogénèse n'étant constatée après une immersion dans l'acide gibbérellique, nous nous sommes posée la question de savoir si des retardateurs de croissance, en inhibant l'allongement des tiges, ne favoriseraient pas l'enracinement. Si on adjoint à l'AMO-1618 ou au CCC une auxine et une cytokinine simultanément, aucun processus d'enracinement ne se manifeste. Par contre, en absence de S.C., l'AMO-1618 ou le CCC peuvent, dans une certaine mesure, favoriser la rhizogénèse. A en juger par les travaux de READ et GARTON (1979), sur Lycopersicum esculentum, c'est un prétraitement de la plante-mère avec une solution de CCC, 48 heures avant la mise en culture des feuilles qui stimulerait les potentialités des explantats cultivés "in vitro". Toutefois, ce travail ne mentionne aucun phénomène de rhizogénèse, et ne met en relief qu'une augmentation de la capacité bourgeonnante. Il serait utile d'examiner cet aspect chez le Chenopodium quinoa où la micropropagation des bourgeons prélevés sur des plantes adultes est susceptible de permettre la préservation d'écotypes sauvages menacés.

- Si le milieu de culture est dépourvu de régulateur de croissance, le taux d'enracinement des explantats de Chenopodium quinoa s'accroît. En effet, si la rhizogénèse se manifeste en présence d'auxine, cette dernière n'est pas strictement nécessaire. En ce sens, cette espèce suit le comportement de nombreuses autres, parmi lesquelles on peut citer Rheum rhaponticum (ROGGEMANS et CLAES, 1979). On retiendra cependant qu'en absence de cytokinine, le temps de culture des bourgeons est limité à cinq semaines ; cette durée est suffisante au développement des racines.

- Une thermopériode est souvent favorable à l'initiation des racines, comme cela a été montré chez des tissus de rhizomes

de topinambour (SAUSSAY et GAUTHERET, 1971 ; 1973). Pour la quinoa, il faut encore déterminer si la rhizogénèse est stimulée par une alternance de température ou par le froid. Des expériences soumettant les bourgeons à différentes thermopériodes seraient intéressantes à mener.

- Cultiver les bourgeons sur un papier filtre, au lieu d'un milieu gélosé, permet un développement des racines secondaires et des poils absorbants. De tels effets bénéfiques sont constatés par QUAZI (1980) chez Lavandula angustifolia et L. latifolia.

- Nous avons enfin recherché si l'agitation du milieu liquide, assurant l'aération des tissus, permet le développement des tiges et du système racinaire. Ce procédé améliore les cultures d'apex de Solanum tuberosum (ROCA et al., 1978), les ébauches florales de Brassica oleracea (WALKEY et WOOLFITT, 1970), et des bourgeons axillaires d'Asparagus (READ et GAVINLERTVATANA, 1976). Lors de la réalisation de nos expériences, nous pensons que divers facteurs ont nuit à l'obtention de résultats plus satisfaisants : d'une part, les explantats recevaient une quantité de lumière nettement insuffisante, d'autre part, la température était constante et, sans doute, trop élevée (25°C) et, enfin la rotation de la table d'agitation était vraisemblablement excessive (environ 140 tours/minute). Il aurait été intéressant de pouvoir faire varier ces divers facteurs pour atteindre un meilleur taux d'enracinement.

Les différentes étapes décrites nous ont conduite à présenter pour la première fois, un modèle de propagation du Chenopodium quinoa ; il est bâti, successivement, sur les stades de multiplication puis d'élongation des bourgeons, et d'enracinement qui précèdent la transplantation en pots remplis de vermiculite et le transfert en terre.

Jusqu'à ce jour, l'organogénèse de trois espèces de Chénopodiacées a été étudiée "in vitro" avec un objectif de propagation: Beta vulgaris, Atriplex canescens et Spinacia oleracea. Beta vulgaris peut être multiplié en faisant appel à des méthodes de régénération de plantules à partir de colonies tissulaires (MARGARA,

1970 ; ROGOZINSKA et al. 1977 ; DE GREEF, 1979) ou par culture de bourgeons axillaires (HUSSEY et HEPHER, 1978). Les bourgeons d'Atriplex canescens sont multipliés par culture d'apex mais l'enracinement ne se produit que pour des plantes de petites tailles qui ne peuvent être transplantées avec succès (WOCHOK et SLUIS, 1980). En ce qui concerne Spinacia oleracea, NESKOVIC et RADOJEVIC (1973) ont isolé, de façon aléatoire, un cal organogène, sans réussir la régénération des plantes ni à répéter l'induction de colonies tissulaires du même type.

Sauf méconnaissance de notre part, le Chenopodium quinoa est donc, après la betterave, la deuxième espèce de Chénopodiacées à avoir été multipliée végétativement "in vitro".

Il convient d'insister sur le fait que le nombre des plantes propagées avec succès est modeste. A notre avis, certaines étapes du schéma expérimental que nous définissons demandent à être affinées et précisées.

En particulier, nous sommes convaincue que les bourgeons cultivés "in vitro" profiteraient de conditions de culture plus proches de celles que la plante connaît dans la nature. Poussant dans les Andes, le Chenopodium quinoa subit des variations de température quotidiennes importantes, ceci tout au long de sa croissance (REA et al., 1979). Il est soumis fréquemment à l'action éventuelle des basses températures. D'autre part, l'intensité lumineuse de ces lieux de culture dépasse 20000 lux (ELLENBERG, Université de Gottingen, R.D.A. ; communication personnelle). On imagine donc aisément qu' "in vitro" une alternance mieux définie des températures jouerait vraisemblablement, un rôle stimulant lors de la phase d'enracinement des bourgeons. L'éclairage de ceux-ci sous une intensité lumineuse nettement accrue devrait augmenter leur vigueur, faciliter la reprise en terre, comme cela a déjà été établi pour d'autres espèces (MURASHIGE et al. 1974), et accroître, ainsi, les possibilités de multiplication végétative "in vitro" du Chenopodium quinoa.

*

*

*

En ce qui concerne l'induction des colonies tissulaires, des trois auxines essayées, seuls l'ANA et le 2,4-D permettent la prolifération des amas cellulaires. En présence d'ANA, l'adjonction d'une cytokinine semble nécessaire ; ce n'est pas le cas avec le 2,4-D, mais ce régulateur de la croissance conduit aussi à un brunissement des cellules de culture. Ce phénomène a été également observé par KAMIMURA et AKUTSU (1976), en cultivant des cals dérivés de pétioles et de racines des plantules de Papaver bracteatum. D'autre part, ces auteurs mentionnent aussi que l'ANA donne de meilleurs résultats que le 2,4-D pour la culture des colonies tissulaires en milieu gélosé.

Par contre, les explantats primaires dérivés de fragments d'épicotyles ne montrent une formation racinaire qu'en présence d'ANA et d'AIB et qui s'amplifie en absence de régulateurs exogènes de la croissance.

La différenciation des trachéides, qui se manifeste toujours après deux ans de culture, dans les conditions d'entretien des cals (Kinétine 1 mg/l et ANA 8 mg/l) quel que soit l'explantat de départ (épicotyle et racine), évoque les observations réalisées sur de nombreuses autres colonies tissulaires (GAUTHERET, 1959 ; BUTCHER, 1977 ; GOULD, 1978).

L'absence de primordium racinaire ou de méristème caulinaire peut s'interpréter comme étant dû aux auxines qui, employées à doses élevées pour induire et entretenir les colonies tissulaires, se montrent inhibitrices de la morphogénèse (BONGA, 1977).

*

*

*

L'analyse chromatographique des échantillons des variétés Real de Puno et Blanca de Junin montre des différences qualitatives dans le contenu en saponines et en sapogénines.

L'identification des saponines ne fut pas possible faute de produits témoins commerciaux, la constitution chimique de ces composés étant encore inconnue. Il n'empêche que la richesse supérieure en saponines des graines de la variété amère est bien évidente.

On observe une différence de composition en saponines chez ces deux variétés, de la même façon que CARDOZO et TAPIA (1979) le mentionnent pour deux autres variétés, l'une amère et l'autre douce.

Comparer nos résultats avec ceux obtenus par les autres auteurs s'avère délicat. En effet, l'appréciation de la couleur des taches après leur révélation demeure subjective et la labilité de la coloration est un obstacle (GESTETNER et al., 1966). D'autre part, si on s'accorde généralement pour reconnaître que les composés triterpéniques donnent des dérivés rouges ou violet par traitement au réactif de Liebermann-Burchard, certains auteurs (RUIZ, 1979 ; CARDOZO et TAPIA, 1979) considèrent comme positives des taches colorées en jaune par ce réactif. On ne peut négliger aussi le fait que ce révélateur n'est pas spécifique des saponines mais, plus largement, de la présence d'un groupement hydroxyle sur le carbone 3 qui caractérise également les saponines stéroïdiques (HIAI et al., 1976).

Compte tenu de ces réserves, on peut estimer que le nombre de saponines au sein des graines de Chenopodium quinoa de la variété Real de Puno est compris entre trois et six. La variété Blanca de Junin en élabore une à trois, selon ces mêmes critères.

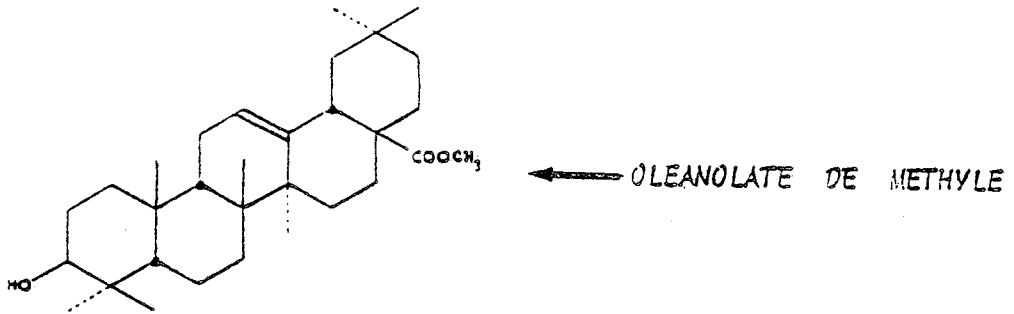
RUIZ (1979) dénombre, lui, près de dix taches différentes dans la variété Kcancolla qui est riche en saponines ; la couleur dominante des taches est le jaune.

Nous ne parvenons pas aux mêmes constatations que celles rapportées par CARDOZO et TAPIA (1979) selon lesquelles, après révélation, une distinction entre les saponines des variétés amères et douces est apparente. D'après ces analyses, qui ont portées sur deux variétés, les échantillons dérivant du chénopode amer présenteraient une majorité de taches de coloration marron, tandis que, dans l'autre cas, seules des taches jaunes sont présentes. Mais, les extractions sont réalisées à l'eau, la révélation étant effectuée à l'aide d'acide sulfurique. En analysant un matériel délipidé ayant subi quelques phases de purification, la révélation au Liebermann-Burchard ne peut nous conduire à des affirmations aussi définies.

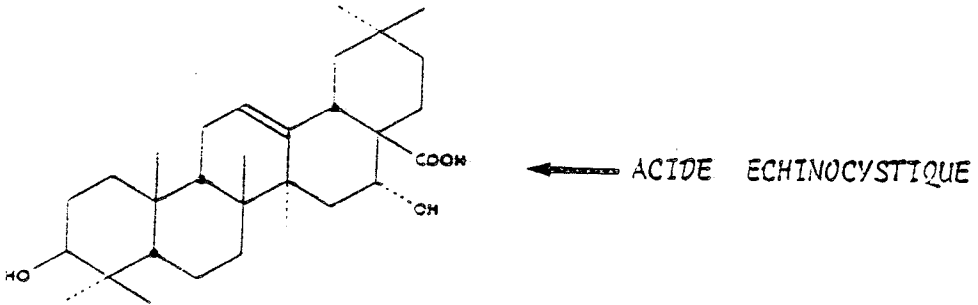
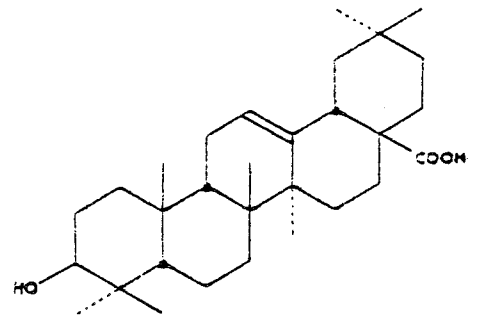
En ce qui concerne les sapogénines, l'un des points marquants de notre étude est, à notre avis, l'identification d'acide oléanolique dans les graines et, ce qui est un fait nouveau, dans les racines de la plante ; les tiges et les feuilles en sont dépourvues. Nous mettons, pour la première fois, en évidence que l'élaboration de ce composé se réalise aussi dans les colonies tissulaires et les bourgeons qui ont été entretenus durant deux années en culture "in vitro". Cet aglycone a déjà été détecté dans des extraits de graines de la variété Kcancolla (RUIZ, 1979) ; par chromatographie en phase gazeuse, l'auteur précise que cette sapogénine représente 79,5 % de l'ensemble des aglycones élaborés par la plante. Nous n'avons pu réaliser une étude quantitative de la composition en génines ; il n'en demeure pas moins que, en particulier dans les échantillons extraits des graines de la variété Real de Puno, la tache correspondant à l'acide oléanolique est la plus importante. La présence d'acide oléanolique n'est pas limitée au Chenopodium quinoa ; il est isolé d'autres espèces de Chénopodiacées : Atriplex canescens (NORD et VAN ATTA, 1960), Beta vulgaris (MARSH et LEVY, 1956), Kochia scoparia (KERNAN et al., 1973) et Spinacia oleracea (TSCHESCHE et al., 1969).

La présence d'oléanolate de méthyle est moins sûre, bien que l'existence de composé à mobilité comparable ait été révélée. Malgré l'utilisation de dioxane qui atténue les pertes de produits d'hydrolyse et abrège le temps de réaction (GESTETNER et al.,

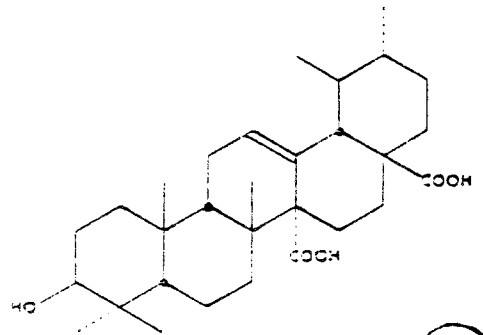
EXEMPLES DE SAPOGENINES TRITERPENIQUES PENTACYCLIQUES



ACIDE OLEANOLIQUE →



ACIDE QUINOVIQUE →



1966 ; JURZYSTA et NOWACKI, 1979), les concentrations en acide sulfurique que nous avons utilisées (6N) sont élevées pour permettre, semble-t-il, la récupération des produits méthylés (BECCHI et al., 1979). Les composés très hydrophobes (1 ; 1' ; 1'') qui sont synthétisés par le Chenopodium quinoa sont donc vraisemblablement d'une nature chimique différente. On ne peut écarter l'hypothèse de produits de dégradation dus, non seulement, à l'hydrolyse acide mais aussi aux effets de l'extraction méthanolique (OTSUKA et al., 1978).

L'acide échinocystique ne semble être élaboré que par la variété amère, où il n'est produit que par les racines. On le détecte de même, en quantités réduites, dans les colonies tissulaires. Sa présence n'a jamais été signalée chez Chenopodium quinoa ; pourtant, cette sapogénine a été isolée de deux espèces de Chenopodium : C. anthelminticum (CHIRVA et al., 1971) et C. ambrosioïdes (BOGACHEVA et al., 1972).

Un aglycone plus polaire (composé 5) est aussi identifié. A en juger par l'importance de la tache chromatographique qui lui correspond, il est produit en quantité notable par la variété amère. Sa présence est particulièrement manifeste dans les graines et dans les racines. D'une façon générale, il est constaté que les sapogénines présentant de l'amertume, l'acide quinovique en est un exemple, ont une structure dicarboxylique. Il vient à l'esprit que ce composé, qui a d'ailleurs, à l'image des triterpènes dicarboxyliques, une faible mobilité dans le système de solvants choisi, puisse porter deux groupes carboxyles et être tenu responsable de la saveur amère (DELFEL, Northern Regional Research Center, Peoria, U.S.A., communication personnelle).

Tout au moins, quantitativement, les différents organes de la plante présentent une composition en sapogénines différente. Ceci va dans le sens des travaux réalisés chez Fatsia japonica où la distribution des huit saponines, et, au delà, des sapogénines, différent selon l'organe étudié (AOKI et SUGA, 1978).

En comparant la plante et les cultures "in vitro" de la variété amère, il ressort que la plus grande diversité de génines triterpéniques se retrouve dans les colonies tissulaires. Cependant,

le système de solvants utilisé restreint la résolution des composés les moins hydrophiles. Aussi, nous ne pouvons savoir si les colonies tissulaires synthétisent des saponines élaborées par les différents organes d'une plante adulte de la même façon que des cals dérivés des pétioles de *Panax ginseng* synthétisent des composés similaires à celles des racines (FURUYA et al., 1973), ou si des composés nouveaux apparaissent. La dernière hypothèse s'appuie sur le fait que, libérées des corrélations présentes dans une plante qui limitent l'expression du génome, les cellules des colonies tissulaires acquièrent la propriété de synthétiser, voire d'accumuler, de nouveaux composés.

L'appréciation de la teneur en saponines triterpéniques a été entreprise par une méthode hémolytique. Cette propriété est caractéristique de l'ensemble des saponines, qu'elles soient de nature triterpénique, stéroïdique ou stéroïde-alcaloïdique. L'étude de la répartition de ces composés dans la feuille des *Chénopodiacees* n'a pas révélé la présence de saponines autres que triterpéniques (BOITEAU et al., 1964 ; HEGNAUER, 1963). On peut donc estimer que, dans le cas précédent, le dosage entrepris est spécifique des saponines triterpéniques, comme le pensent d'autres auteurs (GONNERMANN, 1919 ; KOFLER, 1931 ; KOSOVA et al., 1958 ; AGUILAR et al., 1979). Mais on gardera, néanmoins, à l'esprit, que les saponines bidesmosidiques lysent les hématies dans une moindre ampleur que les saponines monodesmosidiques (ROMUSSI et al., 1980).

Comme nous l'avons constaté, la méthode sur plaque d'agarose-hématies est suffisamment sensible pour autoriser la détection de quantités de saponines hémolytiques aussi minimes que 1,5 µg. Aussi, le dosage des saponines élaborées par une seule graine est-il possible (le poids moyen des graines est de 2 à 3 mg). De ce fait, la méthode décrite est plus fine que celle réalisée en tube car cette dernière exige des quantités de matériel plus importantes en raison des dilutions qu'elle impose (COXWORTH et al., 1969). Enfin, ces analyses, réalisables par une seule graine, pourraient faciliter l'étude du déterminisme génétique de la synthèse des saponines hémolytiques, au sein de populations d'hybrides F2 et F3 obtenus par croisement entre variétés plus ou moins riches en ces substances.

Les racines sont plus riches en saponines hémolytiques que les graines, à la fois dans Real de Puno et dans Blanca de Junin, fait qui était inconnu pour l'espèce. On peut émettre l'hypothèse que la présence de saponines en concentration élevée dans les racines joue un rôle physiologique, en particulier de protection contre des parasites, comme cela est montré chez Medicago sativa (QUAZI, 1976). On sait, par exemple, que le rendement en graines des variétés pauvres en saponines est inférieur, en raison des prédatations exercées par les oiseaux qui se nourrissent des graines, lorsqu'elles sont à l'état laiteux ; les pertes occasionnées peuvent atteindre 40 % de la production (REA et al., 1979).

Nos analyses indiquent que les tiges et les feuilles, qui n'avaient pas encore fait l'objet d'études de ce point de vue, jusqu'à maintenant, sont pratiquement dépourvues de saponines. Ceci explique, et doit encourager, l'usage du feuillage en alimentation (OSTROWSKI-MEISSNER et al., 1980) ; précisons que sa richesse en protéines, égale à 3,3 % du poids frais, est supérieure à celle de l'épinard, 2,2 % (CARDOZO et TAPIA, 1979).

Les résultats acquis par l'analyse des tissus cultivés "in vitro" montrent que les colonies tissulaires renferment des quantités appréciables de saponines hémolytiques (de l'ordre de 0,1 %). Les cals dérivant d'épicotyle renferment des teneurs supérieures à celles des parties vertes de la plante (inférieures à 0,015 %). Les cals dérivant des racines sont, par contre, moins riches que les racines de la plante (1,2 et 0,25 %, respectivement pour Real de Puno et Blanca de Junin). Si l'on a souvent constaté que la production de métabolites "secondaires" est inférieure dans les colonies tissulaires, il n'empêche que FURUYA et al., (1973) ont réussi à sélectionner des cals de Panax ginseng aptes à synthétiser et accumuler des quantités de saponines triterpéniques en quantités comparables à celles des racines. Il ne faut pas perdre de vue cependant, que les déterminations quantitatives des teneurs en composés "secondaires" sont, mis à part les conditions de culture, influencées par la variabilité clonale, et les méthodes d'extraction et de dosage (TRISONTHI et al., 1980 ; COSSON et PETIARD 1981). La mise en place de colonies tissulaires de Chenopodium

quinoa riches en saponines triterpéniques peut se révéler utile, en raison des propriétés pharmacodynamiques de ces substances.

Un fait important que nous mettons en évidence est la richesse, tant qualitative que quantitative, des cultures de bourgeons obtenus à partir d'apex, comparativement à celles des tiges et des feuilles de la plante. Peu de travaux se rapportent à la synthèse des saponines dans des tissus de feuilles. Il est intéressant de citer, ici, les travaux de LUI et STABA (1981) qui concernent la production des génines des glucosides cardiotoniques. Pour la digoxigénine et la gitoxigénine, les cultures de feuilles élaborent des quantités inférieures à celles des feuilles des plantes ; avec le temps de culture, les quantités synthétisées atteignent la moitié des glucosides produits par le végétal. Il n'en est pas de même pour la digitoxigénine élaborée en quantités supérieures (jusqu'à quatre fois plus) par les feuilles cultivées "in vitro".

CONCLUSIONS

et

PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail nous a permis de jeter les bases expérimentales de la multiplication végétative "in vitro" du Chenopodium quinoa soit à partir d'apex de plantules, soit à partir de bourgeons axillaires prélevés sur des plantes adultes.

En bref, la multiplication des bourgeons est stimulée sur le milieu B5 modifié par enrichissement en sources d'azote inorganique et organique, ainsi qu'en sels de phosphate, et par une diminution parallèle de la quantité de saccharose. Les meilleurs taux d'enracinement sont enregistrés en absence de tout régulateur de croissance exogène ; la rhizogénèse est favorisée par l'aération du milieu et une alternance journalière de température.

La mise au point de ce schéma expérimental est susceptible de faciliter la sauvegarde, la conservation, puis la multiplication des génotypes intéressants, comme on le fait pour la pomme de terre qui est originaire des mêmes régions, pour leur implication ultérieure dans des programmes d'amélioration de l'espèce. La culture d'apex présente l'avantage de préserver au mieux l'uniformité génétique du matériel végétal multiplié, en évitant la variabilité qui caractérise les plantes régénérées à partir de colonies tissulaires. D'autre part, en culture d'apex, les potentialités morphogénétiques ne sont pas altérées par des subcultures successives. Ces points sont importants quand on sait que la quinoa, par la qualité de ses protéines et sa souplesse d'adaptation, sera peut-être, après des sélections judicieuses et raisonnées, une plante alimentaire d'avenir.

L'induction des colonies tissulaires est facilement réalisée sur le milieu de Murashige et Skoog, en présence d'une dose élevée d'acide naphthalène-acétique, qui peut être tenu responsable, en association avec la teneur élevée en saccharose du milieu de culture, de la cytodifférenciation des trachéides. La création d'individus obtenus par régénération fera appel, alors, à la variabilité qui caractérise les proliférations cellulaires et pourra favoriser l'introduction de propriétés nouvelles telles que des modifications de la synthèse des saponines, la résistance à des maladies etc...

Dans un autre domaine, il est permis d'émettre l'hypothèse que les colonies tissulaires dérivées de cette espèce adaptée à des régions montagneuses puissent constituer un matériel intéressant pour les études de conservation des tissus végétaux par le froid.

Les analyses de la composition en saponines triterpéniques établissent que l'acide oléanolique est une génine élaborée par le Chenopodium quinoa, tant par les tissus de la plante, exception faite des parties vertes, que par les bourgeons et les colonies tissulaires développés "in vitro". L'acide échinocystique, ou une substance à mobilité chromatographique très voisine, non synthétisé ou concentré dans les graines, est identifié dans les racines et les colonies tissulaires de la variété amère. Un composé, non identifié, est détecté exclusivement chez la variété amère, prédominant dans les graines et dans les racines. On peut imaginer, connaissant sa mobilité chromatographique, qu'il s'agit d'un aglycone possédant des groupements polaires, des radicaux dicarboxyliques par exemple, et qui, en tant que tel, soit responsable de l'amertume des graines.

La sélection de variétés dépourvues de substances amères est essentielle pour que le Chenopodium quinoa soit utilisé à l'échelle industrielle. En ce sens, l'analyse chromatographique des saponines et des sapogénines est importante puisqu'elle peut permettre de comparer, au sein d'un échantillonnage plus vaste de variétés, la distribution des composés saponinés et d'établir un lien avec leurs propriétés physico-chimiques ou biologiques respectives. D'autre part, l'identification et l'isolement du composé responsable de l'amertume est indispensable pour que puissent être utilisées des méthodes de dosage radio-immunologiques ; ceci ouvrirait la voie à la sélection de souches tissulaires de Chenopodium quinoa à l'origine de la régénération d'individus dépourvus de composés amers (DELFEL, communication personnelle).

Un point important à élucider est de savoir si un parallèle peut être établi entre l'amertume de certaines saponines et leur pouvoir hémolytique. S'il en est ainsi, l'analyse de l'activité hémolytique de quantités réduites de matériel biologique, tel qu'un fragment de cal, s'inscrira comme une méthode simple permettant un tri rapide et préliminaire de souches dépourvues ou appauvries en ces composés.

BIBLIOGRAPHIE

- AGARWAL S.K. et RASTOGI R.P., 1974.- Triterpenoid saponins and their genins. *Phytochemistry*, 13: 2623-2645
- AGUILAR R.H., GUEVARA L. et ALVAREZ J.O., 1979.- Un nuevo metodo para la determinacion cuantitativa de saponinas y su aplicacion a diversas variedades de quinua peruana. *Acta Cient. Venezolana*, 30: 167-171
- AHMAD V.U., SAQIB Q.N. et USMANGHANI K., 1980.- Pridentigenin E, a triterpenoid sapogenin from Primula denticulata. *Phytochemistry*, 19: 1875-1876
- AKAHORI A., YASUDA F., KAGAWA K., ANDO M. et TOGAMI M., 1970.- Intracellular distribution of the steroidal sapogenins in Dioscorea tokoro. *Phytochemistry*, 9: 1921-1928
- ALLEN E.H. et KUC J., 1968.- α -solanine and α -chaconine as fungitoxic compounds in extracts of Irish potato tubers. *Phytopathology*, 58: 776-781
- ANGLES J., 1977.- Deficiencias nutricionales de elementos mayores en el cultivo de la quinua (Chenopodium quinoa W.). Tesis, Puno, Peru. Universidad Nac. Tech. del Altiplano.
- ANIL H., 1979.- 21-benzoyl-barringtogenol C, a sapogenin from Styrax officinalis. *Phytochemistry*, 18: 1760-1761
- AOKI T., SHIDO K., TAKAHASHI Y. et SUGA T., 1981.- Structures of 3,28-O-bisglycosidic triterpenoid saponins of Fatsia japonica. *Phytochemistry*, 20: 1681-1686
- AOKI T., SUGA T., 1978.- Triterpenoid saponins from the flower buds of Fatsia japonica. *Phytochemistry*, 17: 771-773
- AOKI T., TANIO Y. et SUGA T., 1976.- Triterpenoid saponins from Fatsia japonica. *Phytochemistry*, 15: 781-784
- ARIGONI D., 1958.- Zur Biogenese pentazyklischer Triterpene in einer höheren Pflanze. *Experientia* 14: 153-155
- ASADA M., AMAGAYA S., TAKAI M. et OGIHARA Y., 1980.- New triterpenoids from the leaves of Tetrapanax papyriferum. *J. Chem. Soc., Perkin transactions I*, 325-329
- ASAKAWA J., KASAI R. YAMASAKI K. et TANAKA O., 1977.- ^{13}C NMR study of ginseng sapogenins and their related dammarane type triterpenes. *Tetrahedron*, 33: 1935-1940
- BAJAJ Y.P.S. et DHANJU M.S., 1979.- Regeneration of plants from apical meristem tips of some legumes. *Curr. Sci.*, 48: 906-907
- BALANSARD J. et PELLISSIER F., 1943.- Action of Quillaya saponin on germination of wheat. *C.R. Soc. Biol.*, 137: 246-247; *Chem. Abstr.*, 38: 1766 (1944)

- BALL E. et SOMA K., 1965.- Effect of sugar concentration on growth of the shoot apex of Vicia faba, p. 269-285. In: Proceedings of an international conference on plant tissue culture. WHITE P.R. et GROVE A.R., Mc Cutchan publishing corporation, Berkeley, California.
- BANERJI N., 1977.- A new saponin from stem bark of Anthocephalus cadamba Miq.. Indian J. Chem., 15: 654-655
- BARUA A.K. et BASAK A., 1972.- Chemical examination of the seeds of Entada phaseoloides. J. Indian Chem. Soc., 49: 1199; Chem. Abstr., 78: 133374 (1973)
- BASU N. et RASTOGI R.P., 1967.- Triterpenoid saponins and sapogenins. Phytochemistry, 6: 1249-1270
- BECCHI M., BRUNETEAU M., TROUILLOUD M., COMBIER H., SARTRE J. et MICHEL G., 1979.- Structure of a new saponin: Chrysantellin A from Chrysantellum procumbens Rich.. Eur. J. Biochem. 102: 11-20
- BERRANG B., DAVIS K.H., WALL M.E., MANSON, C.H. et PEDERSEN M.E., 1974.- Saponins of two alfalfa cultivars. Phytochemistry, 13: 2253-2260
- BESSO H., SARUWATARI Y., FUTAMURA K., KUMINORI K., FUWA T. et TANAKA O., 1979.- High performance liquid chromatographic determination of ginseng saponin by ultraviolet derivation. Planta Med., 37: 226-233
- BHOJWANI S.S., 1980.- In vitro propagation of garlic by shoot proliferation. Scientia Hortic., 9: 227-236
- BIRK Y., 1969.- Saponins, p. 169-210. In: Toxic constituents of plant foodstuffs. Food Science and Technology, LIENER, ed. Acad. Press, New York, London.
- BLUNDEN G., CULLING C. et JEWERS K., 1975.- Steroidal sapogenins: a review of actual and potential plant sources. Trop. Sci., 17: 139-154
- BOGACHEVA N.G., KOGAN L.M. et LIBIZOV N.I., 1972.- Triterpene glycosides of Chenopodium ambrosioides. Chem. Nat. Comp., 8: 392
- BOITEAU P., PASICH B. et RATSIMANANGA A.R., 1964.- Les Triterpénoïdes en physiologie végétale et animale. Gauthiers-Villars, Paris.
- BOITEAU P., RAHANDRAHA T. et RATSIMANANGA A.R., 1962.- Incidences of vegetable nutrition on animals' weight increase and the states of protein deficiency. FAO/ISHS, Meeting on significance of tropical horticulture in connection of human nutrition, 3-4 septembre, Bruxelles.
- BOMBARDELLI E., BONATI A., GABETTA B., MARTINELLI M. et MUSTICH G., 1976.- Gas-liquid chromatography and mass spectrometric investigation on saponins in Panax ginseng extracts. Fitoterapia, 47: 99-106

- BONGA J.M., 1977.- Applications of tissue culture in forestry, p. 93-108. In: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. REINERT J. et BAJAJ Y.P.S., ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- BRACHET J., 1953.- The use of basic dyes and ribonuclease for the cytochemical detection of ribonucleic acid. Quart. J. Microsc. Sci., 94: 1-10
- BRAIN K.R. et LOCKWOOD G.B., 1976.- Hormonal control of steroid levels in tissue cultures from Trigonella foenum-graecum. Phytochemistry, 15: 1651-1654
- BROUK B., 1975.- Plants consumed by man. Acad. Press, London, New York, San Francisco.
- BROWN N.L. et PARISER E.R., 1975.- Food science in developing countries. Science, 188: 589-593
- BUCHNER K.H., ZIMMERMANN U. et BENTRUP F.-W., 1981.- Turgor pressure and water transport properties of suspension-cultured cells of Chenopodium rubrum L.. Planta, 151: 95-102
- BUDZIKIEWICZ H., WILSON J.M. et DJERASSI C., 1963.- Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. J. Am. Chem. Soc., 85: 3688-3699; Chem. Abstr. 60: 1215 (1964)
- BUKHAROV V.G. et KARNEEVA L.N., 1970.- Glycosides of ursolic acid from Empetrum sibiricum. Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim. 1: 171-172; Chem Abstr., 73: 4146 (1970)
- BUKHAROV V.G., SHCHERBAK S.P. et BESHCHKOVA A.P., 1971.- Triterpenoid glycosides of Dianthus deltooides. Khim. Prir. Soedin, 7: 33-38; Chem. Abstr., 74: 112253 (1971)
- BUTCHER D.N., 1977.- Secondary products in tissue cultures, p. 668-693. In: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. REINERT J. et BAJAJ Y.P.S., ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- BUTENKO R.G., 1968.- Plant tissue culture and plant morphogenesis. CHAILAKHYAN M.Kh. ed., Israël programm for scientific translations, Jerusalem.
- BUTENKO R.G., ATANASSOV A. et URMANTSEVA W., 1972.- Some features of the sugarbeet tissue culture. Phytomorphology, 22: 140-143
- CARDOZO A. et TAPIA M., 1979.- Valor nutritivo, p. 149-192. In: Quinua y Kaniwa, cultivos andinos. TAPIA M. et al., ed. IICA, Bogota, Colombia.
- CATTEL L., BALLIANO G. et CAPUTO O., 1979.- Sterols and triterpenes from Cucurbita maxima. Planta Med., 37: 264-267
- CHEEKE P.R., 1971.- Nutritional and physiological implications of saponins. Can. J. Anim. Sci., 51: 621-632

- CHEEKE P.K. et OLDFIELD J.E., 1970.- In vitro inhibition of succinate oxydation by alfalfa saponin. *Can. J. Anim. Sci.*, 50: 107-112
- CHENG T.-Y. et VOQUI T.H., 1977.- Regeneration of Douglas fir plantlets through tissue cultures. *Science*, 108: 306-307
- CHEYNE, V.A. et DALE T., 1980.- Shoot tip culture in forage legumes. *Plant Sci. Lett.*, 19: 303-309
- CHIRVA V. Ya., CHEBAN P.L., KINTYA P.K. et BOBEIKO V.A., 1971.- Structure of the triterpene glycoside from the roots of Chenopodium anthelminticum. *Chem. Nat. Comp.*, 7: 23-25
- CHIRVA V. Ya., KINTYA P.K. et SOSNOVSKII V.A., 1970.- Triterpenoid glycosides of Koelreuteria paniculata. IV. Structure of Koelreuteria saponins A and B. *Khim. Prir. Soedin*, 6: 323-331; *Chem. Abstr.*, 73: 110063 (1970)
- CHOU S.C., RAMANATHAN S., MATSUI A., ROGERS J. et CUTTING W.C., 1971.- Isolation of saponins with antifertility activity from Gleditsia horrida. *Indian J. Exp. Biol.*, 9: 503-504; *Chem. Abstr.*, 76: 110291 (1972)
- COLE A.R.H., THORNTON D.W. et WHITE D.E., 1956.- Infrared spectra and the structure of α -amyrin. *Chemistry and Industry*, 1956: 795-796; *Chem. Abstr.*, 51: 2661 (1957)
- CONGER B.V., 1980.- Agronomic crops, p. 165-215. In: *Cloning agricultural plants via in vitro techniques*. Ed. CONGER B.V., CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- CONNER H.W., 1937.- Effect of light on solanine synthesis in the potato tuber. *Plant Physiol.*, 12: 79-98
- CONNOLLY J.D., 1979.- Triterpenoids, p. 186-217. In: *Specialist Periodical Reports. Terpenoids and Steroids*, Vol.9. Ed. The Chemical Society, Burlington House, London
- CONSTABEL F., 1967.- Pigmentbildung in Kalluskulturen aus Beta-Rüben. *Naturwissenschaften*, 54: 175-176
- CONSTABEL F., GAMBORG O.L., KURZ W. et STECK W., 1974.- Production of secondary metabolites in plant cell cultures. *Planta Med.*, 25: 158-165
- CONSTABLE D.N., BIGAT T. et CONSTABLE F.H., 1960.- Infrared absorption in the spectrum of tea saponin. *Istanbul Univ. Fen. Fak. Mecmuasi, Seri C*, 25: 21801; *Chem. Abstr.*, 55: 21808 (1961)
- COSSON L. et PETIARD V., 1981.- Adaptation des techniques habituelles d'extraction des alcaloïdes aux cultures de tissus d'Apocynacées. 3ème colloque de la section française de l'IAPTC. Toulouse, 20-21 nov.
- COXWORTH E.C.M., BELL J.M. et ASHFORD R., 1969.- Preliminary evaluation of russian thistle, Kochia, and garden Atriplex as potential high protein content seed crops for semi-arid areas. *Can. J. Plant Sci.*, 49: 427-434

- CURRIER W.W. et KUC J., 1975.- Effect of temperature on rishitin and steroid glycoalkaloid accumulation in potato tuber. *Phytopathology*, 65: 1194-1197
- DALTON C.C., 1980.- Photoautotrophy of spinach cells in continuous culture: photosynthetic development and sustained photoautotrophic growth. *J. Exp. Bot.*, 31: 791-804
- DALTON C.C. et STREET H.E., 1977.- The influence of applied carbohydrates on the growth and greening of cultured spinach (*Spinacia oleracea* L.) cells. *Plant Sci. Lett.*, 10: 157-164
- DE BRUIN A., 1964.- Investigation of the food value of Quinoa and Cañihua seed. *J. Fd.Sci.*, 29: 872-876
- DEFAGO G., 1977.- Rôle de saponines dans la résistance des plantes aux maladies fongiques. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, 87: 79-132
- DEFAGO G. et KERN H., 1975.- Absorption et transport du cholestérol par le *Pythium paroecandrum*. *Phytopath. Z.*, 84: 34-36
- DEFAGO G., MEMMEN K.F. et KERN H., 1975.- Influence du cholestérol et des saponines sur le pouvoir pathogène du *Pythium paroecandrum*. *Phytopath. Z.*, 83: 167-184
- DE GREEF W., 1979.- Plant regeneration from sugarbeet cell culture, a survey. Groupe de contact, Culture in vitro des tissus végétaux: "Variabilité", Bruxelles, 28 mars.
- DENECHÉAU C., 1981.- Influence de quelques facteurs de l'environnement nutritif sur la croissance de cultures de tissus de *Choisya ternata* et la production d'alcaloïdes dihydrofuroquinoléiques. Thèse 3ème cycle, Faculté de Pharmacie, Tours, 152 p.
- ELBARY A.A. et NOUR S.A., 1979.- Correlation between the spermicidal activity and the hemolytic index of certain plant saponins. *Die Pharmazie*, 34: 560-561
- ELDER J.W., BENVENISTE P. et FONTENEAU P., 1977.- In vitro cyclisation of squalène 2,3-epoxide to α -amyrin by microsomes from bramble cell suspension cultures. *Phytochemistry*, 16: 490-492
- ENCARNACION R., KENNE L., SAMUELSON G. et SANDBERG F., 1981.- Structural studies on some saponins from *Lecaniodiscus cupanioides*. *Phytochemistry*, 20: 1939-1942
- EPSTEIN E., 1972.- Mineral metabolism, p. 285-322. In: Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. EPSTEIN E., Ed: John Wiley and sons, Inc., New York, London, Sydney.
- EVANS F.J. et COWLEY P.S., 1972.- Variation in cardenolides and sapogenins in *Digitalis purpurea* during germination. *Phytochemistry*, 11: 2729-2733
- FOOTE P.A. et GRAMLING L.G., 1940.- Chemical investigation of the seeds of *Glottidium vesicarium* (Jacq.) Harper. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 29: 311-312

- FORGACS P. et PROVOST J., 1981.- Olaxoside, a saponin from Olax andronensis, Olax glabriflora and Olax psittacorum. Phytochemistry, 20: 1689-1691
- FUJITA M., ITOKAWA H. et SHIBATA S., 1962.- Saponin-bearing drugs. IV. Chemical studies on ginseng. Isolation of saponin and sapogenin from Radix ginseng. Yakugaku Zasshi, 82: 1634-1638; Chem. Abstr., 59: 1710 (1963)
- FURUYA T., KOJINA H., SYONO K., ISHII T., UOTANI K. et NISHIO, M., 1973.- Isolation of saponins and sapogenins from callus tissue of Panax ginseng. Chem. Pharm. Bull., 21: 98-101
- FURUYA T., KOJINA H., SYONO K. et ISHII T., 1970.- Isolation of panaxatriol from Panax ginseng callus. Chem. Pharm. Bull., 18: 2371-2372
- GAL I.E., 1965.- Neuere Angaben über Capsicidin. Experientia, 21: 383
- GAMBORG O.L., MILLER R.A. et OJIMA K., 1968.- Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., 50: 151-158
- GANDARILLAS H., 1979.- Mejoramiento genético, p. 65-82. In: Quinoa y Kañiwa, cultivos andinos. TAPIA et al., ed. IICA, Bogota, Colombia
- GAUTHERET R.J., 1959.- La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisations. Masson et Cie, Paris.
- GENKINA G.L., MZHEL'SKAYA L.G., SHAKIROU T.T., ABUBAKIROV N.K., 1977.- Spectrophotometry of glycosides of oleanolic acid and hederagenin in concentrated sulfuric acid. Khim. Prir. Soedin., 2: 220-227
- GESTETNER B., 1971.- Structure of a saponin from lucerne (Medicago sativa). Phytochemistry, 10: 2221-2223
- GESTETNER B., ASSA Y., HENIS Y., BIRK Y. et BONDI A., 1971.- Lucerne saponins. IV. Relationship between their chemical constitution, and haemolytic and antifungal activities. J. Sci. Fd Agric., 22: 168-172
- GESTETNER B., BIRK Y. et BONDI A., 1966.- Soya bean saponins. VI. Composition of carbohydrate and aglycone moieties of soya bean saponin extract and of its fractions. Phytochemistry, 5: 799-802
- GESTETNER B., BIRK Y., BONDI A. et TENCER Y., 1966.- Soya bean saponins. VI. A method for the determination of sapogenin and saponin contents in soya beans. Phytochemistry, 5: 803-806
- GESTETNER B., BIRK Y. et TENCER Y., 1968.- Soybean saponins. Fate of ingested soybean saponins and the physiological aspect of their hemolytic activity. J. Agr. Fd. Chem., 16: 1031-1035
- GLANERT A.M., DINGLE J.T. et LUCY J.A., 1962.- Action of saponin on biological cell membranes. Nature, 196: 953-955

- GONNERMANN M., 1919.- The saponins of Chenopodium quinoa, Euphorbia helioscopia (Tithymatus helioscopus), Euphorbia peplus and Mercurialis perennis. Biochem. Z., 97: 24-40; Chem. Abstr., 14: 1553 (1919)
- GONZALES R., 1917.- Investigation of Chenopodium quinoa. Expt. Sta. Res., 39:610, 45 p.; Chem Abstr., 13: 1083 (1919)
- GORBITZ A. et LUNA DE LA FUENTE R., 1965.- La quinua en el Perú. Ministerio de Agricultura, Lima. Servicio de Investigación y promoción agraria. Boletín técnico, 54, 19 p..
- GOULD A.R., 1978.- Diverse pathways of morphogenesis in tissue cultures of the composite Brachycome lineariloba. Protoplasma, 97: 125-135
- GUHA J. et SEN S.P., 1973.- Antigitberellins of the Cucurbitaceae. Nature, 244: 223-224
- HARVALA C. et HYLANDS P.J., 1978.- Saponins from Cyclamen hederifolium and C. graecum. Planta Med., 33: 180-184
- HASHIMOTO Y. et YASUMOTO T., 1960.- Confirmation of saponin as a toxic principle of starfish. Bull. Jap. Soc. Scient. Fish., 26: 1132-1138
- HASEGAWA P.M., 1980.- Factors affecting shoot and root initiation from cultured rose shoot tips. J. Am. Soc. Hort. Sci., 105: 216-220
- HAYNES R.J. et GOH K.M., 1978.- Ammonium and nitrate reduction of plants. Biol. Rev., 53: 465-510
- HEBLE M.R., NARAYANASWAMY S. et CHADHA M.S., 1971.- Hormonal control of steroid synthesis in Solanum xanthocarpum tissue cultures. Phytochemistry, 10: 2393-2394
- HEFTMANN E., 1963.- Biochemistry of plant steroids. Ann. Rev. Plant Physiol., 14: 225-248
- HEFTMANN E. et SCHWIMMER S., 1972.- Degradation of tomatine to 3 β -hydroxy-5 α pregn-16 en 20- one by ripe tomatoes. Phytochemistry, 11: 2783-2787
- HEGNAUER R., 1973.- Chemotaxonomie des Pflanzen-Band 6- Dicotyledoneae: Rafflesiaceae-Zygophyllaceae. Ed. Birkhauser Verlag, Stuttgart.
- HELLER R., 1977.- Abrégé de physiologie végétale. I- Nutrition. Masson, Paris.
- HELMKAMP G. et BONNER J., 1953.- Some relationship of sterols to plant growth. Plant Physiol., 28: 428-436
- HENRY M., 1981.- Obtention de suspensions cellulaires de Caryophyllacées (Silene alba Miller E.H.L. Krause, Saponaria ocymoides L., Saponaria officinalis L.). Etude de la croissance et de la production de saponines triterpéniques. Thèse Doct. Etat, Paris Sud, 293 p.

- HEWITT E.J., 1963.- The essential nutrient elements: requirements and interactions in plants, p. 137-360. In: Plant Physiology. A treatise. Vol 3. STEWARD F.C., Ed. Acad. Press, New York, London.
- HIAI S., OURA H. et NAKAJIMA, T., 1976.- Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Med.*, 29: 116-122
- HIAI S., SASAKI S. et OURA, H., 1979.- Effect of ginseng saponin on rat adrenal cyclic AMP. *Planta Med.*, 37: 15-19
- HILLER K. et VOIGT G., 1977.- Neue Ergebnisse in der Erforschung der Triterpensaponine. *Die Pharmazie*, 32: 365-393
- HOAGLAND D.R., 1944.- Lectures on the inorganic nutrition of plants. Chronica botanica Company, Waltham, Mass., U.S.A.
- HOSODA N. et YATAZAWA M., 1979.- Sterols, steroidal sapogenin and steroidal alkaloid in callus culture of Solanum laciniatum Ait.. *Agric. Biol. Chem.*, 43: 821-825
- HUI L.H. et ZEE S.Y., 1980.- The effect of ginseng on the plant-let regeneration % of cotyledon and hypocotyl explants of broccoli. *Z. Pflanzenphysiol.*, 96: 297-302
- HUSEMANN W. et BARZ W., 1977.- Photoautotrophic growth and photosynthesis in cell suspension cultures of Chenopodium rubrum. *Physiol. Plant.*, 40: 77-81.
- HUSEMANN W., RADWAN S.S., MANGOLD H.K. et BARZ, W., 1980.- The lipids in photoautotrophic and heterotrophic cell suspension cultures of Chenopodium rubrum. *Planta*, 147, 379-383
- HUSSEY G., 1976.- In vitro release of axillary shoots from apical dominance in Monocotyledonous plantlets. *Ann. Bot.*, 40: 1323-1325
- HUSSEY G. et HEPHER A., 1978.- Clonal propagation of sugar beet plants and the formation of polyploids by tissue culture *Ann. Bot.*, 42: 477-479
- IKEKAWA N., NATORI S., ITOKAWA H., TOBINAGA S. et MATSUI M., 1965.- Gas chromatography of triterpenes- I- Ursanane, Oleanane and Hopane group. *Chem. Pharm. Bull.*, 13: 316-319
- ISHAAYA I. et BIRK Y., 1965.- Soybean saponins. IV- The effect of proteins on the inhibitory activity of soybean saponins on certain enzymes. *J. Fd. Sci.*, 30: 118-120
- JACKSON H.D. et SHAW R.A., 1959.- Chemical and biological properties of a respiratory inhibitor from alfalfa saponins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 84: 411-416
- JANISZOWSKA W. et KASPRZYK Z., 1977.- Intracellular distribution and origin of pentacyclic triterpene in Calendula officinalis leaves. *Phytochemistry*, 16: 1919-1923
- JELLEMA R., ELEMA E.T. et MALINGRE Th. M., 1981.- Fluorodensitometric determination of potato glycoalkaloids on thin-layer chromatograms. *J. Chromatogr.*, 210: 121-129

- JENTZSCH K., SPIEGL P. et FUCHS L., 1961.- In vitro anthelmintic effects of saponins. *Arzneimittel-Forsch*, 11: 413-414; *Chem Abstr.*, 55: 19026 (1961)
- JEPPSEN R.B., SALUNKHE D.K., WU M.T. et SHARMA R.P., 1975.- Effects of N6-benzyladénine on glycoalkaloids in potatoes as determined by thin-layer chromatography. *Experientia*, 31: 345-346
- JHANG J.J., STABA E.J. et KIM J.Y., 1974.- American and Korean ginseng tissue cultures: growth, chemical analysis, and plantlet production. *In vitro*, 9: 253-259
- JONES M. et ELLIOTT F.C., 1969.- Two rapid assays for saponin in individual alfalfa plants. *Crop Sci.*, 9: 688-691
- JURZYSTA M., 1979.- Haemolytic micromethod for rapid estimation of toxic alfalfa saponin. *Acta Agrobot.*, 32: 5-11
- JURZYSTA M. et NOWACKI E., 1979.- Saponins of the genus Medicago. *Acta Agrobot.*, 32: 13-17
- KAMADA H. et HARADA H., 1979.- Influence of several growth regulators and amino acids on in vitro organogenesis of Torenia fournieri Lind.. *J. Exp. Bot.*, 30: 27-36
- KAMIMURA S. et AKUTSU M., 1976.- Cultural conditions on growth of the cell culture of Papaver bracteatum. *Agr. Biol. Chem.*, 40: 899-906
- KARTHA K.K., GAMBORG O.L. et CONSTABEL F., 1974.- Regeneration of pea (Pisum sativum L.) plants from shoot apical meristems. *Z. Pflanzenphysiol.*, 72: 172-176
- KARTNIG Th. et MIKULA G., 1970.- Spectrophotometric determination of steroids and triterpenoid compounds. *Arch. Pharm.*, 303: 767-770; *Chem. Abstr.*, 74: 9429 (1971)
- KAUL B., STOHS S.J. et STABA E.J., 1969.- Dioscorea tissue cultures. I- Biosynthesis and isolation of diosgenin from Dioscorea deltoidea callus and suspension cells. *Lloydia*, 31: 171-179
- KAWAI K-I. et SHIBATA S., 1978.- Pseudojubilogenin, a new sapogenin from Bacopa monniera. *Phytochemistry*, 17: 287-289
- KERNAN J.A., COXWORTH E. et FLEMING S., 1973.- Microdetermination of triterpene sapogenin content of Kochia scoparia seed using gas-liquid chromatography. *J. Agr. Fd. Chem.*, 21: 232-234
- KESSELMEIER J. et BUDZIKIEWICZ H., 1979.- Identification of saponins as structural building units in isolated prolamellar bodies from etioplasts of Avena sativa L. *Z. Pflanzenphysiol.*, 91: 333-344
- KESSELMEIER J. et RUPPEL H.G., 1979.- Building units of prolamellar bodies from etioplasts of Avena sativa L.: saponin content and reaggregation experiments, p. 187-191. In: *Advances in the biochemistry and physiology of plants lipids*. APPELQUIST L.A. et LILJENBERG C., ed., Elsevier

North Holland Biomedical Press.

- KHALIL A.M., ASHY M.A., EL-TAWIL B.A.H., TAWFIQ N.I., 1979.- Constituents of local plants. 5- Coumarin and triterpenoid constituents of Lavandula dentata L. Plant. Die Pharmazie, 34, 564-565
- KHANNA P., BANSAL R. et JAIN S.C., 1975.- Effect of various hormones on production of saponin and sterols in Trigonella foenum-graecum L. suspension cultures. Indian J. Exp. Biol., 13: 582-583
- KHORLIN A. Ya., CHIRVA V. Ya., KOCHETKOV N.K., 1967.- Triterpenic saponins. XXI- Structure of clematoside C.. Izv. Akad. Nauk. SSSR, Ser. Khim., 6: 1306-1311; Chem. Abstr., 67: 117188 (1967)
- KIM S.K., SAKAMOTO I., MORIMOTO K., SAKATA M., YAMASAKI K. et TANAKA O., 1981.- Seasonal variation of saponins, sucrose and monosaccharides in cultivated ginseng roots. Planta Med., 42, 181-186
- KIMATA H., HIYAMA C., YAHARA S., TANAKA O., ISHIKAWA O., AIURA M., 1979.- Application of high performance liquid chromatography to the analysis of crude drugs: separatory determination of saponins of bupleuri radix. Chem. Pharm. Bull., 27: 1836-1841
- KITAGAWA I., SUZUKI H., KITAZAWA K., YAMAO N., YOSIOKA I., 1975.- Saponin and saponin. IX- Structure of spergulagenin A, a new migrated hopane-type saponin isolated from Mollugo spergula L.. Chem. Pharm. Bull., 23: 355-364
- KITAGAWA I., YAMANAKA H., NAKANISHI T. et YOSIOKA I., 1977.- Saponin and saponin. XII- Structure of spergulatriol, a new bisnorhopane-type genuine saponin of isoanhydro-spergulatriol from the root of Mollugo spergula L.. Chem. Pharm. Bull., 25: 2430-2436
- KIZU H. et TOMIMORI T., 1979.- Studies on the constituents of Clematis species. I- On the saponins of the root of Clematis chinensis Osbeck. Chem. Pharm. Bull., 27: 2388-2393
- KODRAS R., COONEY W.T. et BUTTS J.S., 1951.- Chick growth depressing factor in sun cured and dehydrated alfalfa meals. Poultry Sci., 30: 280-292
- KOFLER L., 1922.- Differentiation and quantitative determination of the saponins. Z. Nahr. Genussm., 43: 278-287; Chem. Abstr., 16: 3605 (1922)
- KOFLER L., 1931.- The effects of the saponin of spinach. Wiener klin. Wochschr., 44, 852-855; Chem. Abstr., 26: 515 (1932)
- KOFLER L., SCHRUTKA W., 1925.- Toxicity of saponins and detoxication by cholesterol. Biochem. Z., 159: 327-336; Chem. Abstr., 20: 2202 (1926)

- KONOSHIMA T., FUKUSHIMA H., INUI H., SATO K. et SAWADA T., 1981.- The structure of prosapogenin obtained from the saponin of Gleditsia japonica. Phytochemistry, 20, 139-142
- KONOSHIMA T., INUI H., SATO K., YONEZAWA M. et SAWADA T., 1980.- Legume saponin of Gleditsia japonica Miquel. II- Desmonoterpenyl glycoside of echinocystic acid. Chem. Pharm. Bull., 28: 3473-3478
- KOSOVA V., CHLADEK M. et PETRIK F., 1958.- Pharmacology and evaluation of several Chenopodium species. Die Pharmazie, 13: 631-647; Chem. Abstr., 53: 6532 (1959)
- KREMNEV L.Ya. et KUIBINA N.I., 1957.- Emulsifying properties of saponin. Trudy Leningrad Tekhnol. Inst. im. Lensoveta, 37: 146-149; Chem. Abstr., 52: 11519
- KRETSU L.G. et LAZUR'EVSKII G.V., 1970.- Triterpenic glycosides of Beta vulgaris. Khim. Prir. Soedin., 6: 272-273; Chem. Abstr., 73: 63200 (1970)
- KUHN R. et LOW I., 1954.- The constitution of solanine. Angew. Chem., 66: 639-640; Chem. Abstr., 49, 3966 (1954)
- KUSZLIK-JOCHYM K. et MAZUR B., 1973.- A search for inhibitors of anaerobic metabolism of carbohydrates among the triterpene saponin glycosides. Preliminary screening of plant extracts. Acta Biol. Cracov., Ser. Bot., 26: 203-213
- LATCHE A., PECH J.C., AMBID C. et FALLOT J., 1980.- Production par culture de tissus, et cellules végétales, de métabolites présentant un intérêt alimentaire. Fra. DGRST 77. 70365, 13 p.
- LEE T.M. et DER MARDEROSIAN A., 1981.- Two-dimensional TLC analysis of ginsenosides from root of dwarf ginseng (Panax trifolius L.) Araliaceae. J. Pharm. Sci., 70: 89-91
- LOCCI R. et KUC J., 1967.- Steroid alkaloids as compounds produced by potato tubers under stress. Phytopathology, 17: 1272-1273
- LOCKWOOD G.B. et BRAIN K.R., 1976.- Influence of hormonal supplementation on steroid levels during callus induction from seeds of Trigonella foenum-graecum. Phytochemistry, 15: 1655-1660
- LUCHANSKAYA V.N., KONDRATENKO E.S., GOROVITS T.T. et ABUBAKIROV, N.K., 1971.- Triterpenoid glycosides from Gypsophylla trichotoma. II- Structure of trichoside A. Khim. Prir. Soedin., 7: 151-153; Chem. Abstr., 75: 49495 (1971)
- LUI J.H.C. et STABA E.J., 1981.- Effects of age and growth regulators on serially propagated Digitalis lanata leaf and root cultures. Planta Med., 41: 90-95
- LUNING H.U. et SCHLOSSER E., 1976.- Saponine in Avena sativa. Angew. Bot., 50: 49-60

- LUTOMSKI J. et NHAM N.T., 1977.- Studies on the saponin fraction from the root of Aralia mandshurica rupr. et maxim. II- Isolation and separation of the saponosides. Herba polon., 23: 93-104
- LYTHGOE B. et TRIPETT S., 1950.- Constitution of the disaccharide of glycyrrhinic acid. J. Chem. Soc., 45: 1522
- MAHATO S.B., DAS M.C. et SAHU N.P., 1981.- Triterpenoids of Scoparia dulcis. Phytochemistry, 20: 171-173
- MAHONEY A.W., LOPEZ J.G. et HENDRICKS D.G., 1975.- An evaluation of the protein quality of quinoa. J. Agr. Fd. Chem., 23: 190-193
- MAHUZIER G. et HAMON M., 1978.- Abrégé de chimie analytique. II- Méthodes de séparation. Masson et Cie, Paris.
- MAIZEL J.V., BURKHARDT H.J. et MITCHELL, H.K., 1964.- Avenacin, an antimicrobial substance isolated from Avena sativa. I- Isolation and antimicrobial activity. Biochemistry, 3: 424-426
- MALINOW R., CONNOR W.E., Mc LAUGHLIN P., STAFFORD C., LIN, D.S., LIVINGSTON A.L., KOHLER G.O., Mc NULTY W.P., 1981.- Cholesterol and bile acid balance in Macaca fascicularis. Effects of alfalfa saponins. J. Clin. Invest., 67: 156-162
- MALINOW M.R., Mc LAUGHLIN P., KOHLER G.O. et LIVINGSTON A.L., 1977a.- A prevention of elevated cholesterolemia in monkeys by alfalfa saponins. Steroids, 29: 105-110
- MALINOW M.R., Mc LAUGHLIN P., PAPWORTH L., STAFFORD C., KOHLER, G.O., LIVINGSTON A.L. et CHEEKE P.R., 1977b.- Effect of alfalfa saponins on intestinal cholesterol absorption in rats. Am. J. Clin. Nutr., 30: 2061-2063
- MALINOW M.R., Mc LAUGHLIN P. et STAFFORD C., 1980.- Alfalfa seeds: effects on cholesterol metabolism. Experientia 36: 562-564
- MALINOW M.R., Mc LAUGHLIN P., STAFFORD C., LIVINGSTON A.L., KOHLER G.O. et CHEEKE P.R., 1979.- Comparative effects of alfalfa saponins and alfalfa fibers on cholesterol absorption in rats. Am. J. Clin. Nutr., 32: 1810-1812
- MANDLOI D. et SANT P.G., 1981.- A saponin from Asparagus conocladus. Phytochemistry, 20: 1687-1688
- MANGAN J.L., 1959.- Bloat in cattle. XI- The foaming properties of proteins, saponins and rumen liquor. New Zealand J. Agr. Res., 2: 47-61
- MANITTO, P., 1981.- The isoprenoids, p. 215-313. In: Biosynthesis of natural products. Ellis Horwood Publishers.
- MARGARA J., 1970.- Néoformation de bourgeons in vitro chez la betterave sucrière, Beta vulgaris L. C.R. Acad. Sci., Paris, (D), 270, 698-701

- MARSH C.A. et LEVY G.A., 1956.- Glucuronic metabolism in plants. III- Triterpene glucuronides. *Biochem. J.*, 63: 9-14
- MARSHALL J.G. et STABA E.J., 1976.- Hormonal effects on diosgenin biosynthesis and growth in Dioscorea deltoidea tissue cultures. *Phytochemistry*, 15: 53-55
- MASOOD M., MINOCHA P.K., TIWARI K.P. et SRIVASTAVA K.C., 1981.- Narcissiflorine, narcissiflorinine and narcissifloridine, three triterpene saponins from Anemone narcissiflora *Phytochemistry*, 20: 1675-1679
- MATHEWS V.H., RANGAN T.S. et NARAYANASWAMY S., 1976.- Micro-propagation of Ananas sativus in vitro. *Z. Pflanzenphysiol.*, 79: 450-454
- MITA A., SHIDA R., KASAI N. et SHOJI J., 1979.- Enhancement and suppression in production of IgM-antibody in mice treated with purified saponins. *Biomedicine* 31: 223-227
- MORGAN B., HEALD M., BROOKS J.C., TEE J.L. et GREEN J., 1972.- Interaction between dietary saponin, cholesterol and related sterols in the chick. *Poult. Sci.*, 51: 677-682
- MORRIS R., DYE W. et GISLER P., 1961.- Isolation, purification and structural identity of an alfalfa root saponin. *J. Org. Chem.*, 26: 1241
- MULHEIRN L.T., 1980.- Biosynthesis of triterpenoids, steroids and carotenoids, p. 95-154. In: *Specialist periodical reports. Biosynthesis*, Vol. 6. The Royal Society of Chemistry.
- MULLER M., 1981.- Red light induced change in the saponin content of prolamellar bodies in Avena sativa. *Z. Naturforsch.* 36: 869-874
- MURASHIGE T., 1973.- Nutrition of plant cells and organs in vitro. *In vitro* 9: 81-85
- MURASHIGE T., SERPA M. et JONES J.B., 1974.- Clonal multiplication of gerbera through tissue culture. *HortScience*, 9: 175-180
- MURASHIGE T. et SKOOG F., 1962.- A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497
- NESKOVIC M. et RADOJEVIC L., 1973.- The growth of and morphogenesis in tissue cultures of Spinacia oleracea L. *Bull. Inst. Jardin Bot., Université Beograd*, 8: 35-37
- NICHOLAS H.J., WADKINS C.L. et HILTIBRAN R.C., 1955.- The distribution of triterpenes in plants. Chenopodium album. *J. Am. Chem. Soc.*, 77: 495-496
- NIGRELLI R.F., 1952.- The effects of holothurin on fish and mice with sarcoma 180. *Zoologica*, 37: 89-90
- NITSCH J.P. et NITSCH C., 1965.- Terpénoides naturels actifs sur la croissance végétale. *Ann. Physiol. Veg.*, 7: 259-271

- NORD E.C. et VAN ATTA G.R., 1960.- Saponin, a seed germination inhibitor. *Forest Sci.*, 6: 350-353
- NOWACKI F., JURZYSTA M. et GORSKI P., 1975.- Effect of availability of nitrogen on alkaloid synthesis in Solanaceae. *Bull. Acad. Pol. Sci.*, 23: 219-225
- OHKAWA T., KOHLER K. et BENTRUP F.W., 1981.- Electrical membrane potential and resistance in photoautotrophic suspension cells of Chenopodium rubrum L. *Planta*, 151: 88-94
- OKABE H., MIYAHARA Y., YAMAUCHI T., MIYAHARA K. et KAWASAKI T., 1980.- Studies on the constituents of Momordica charantia L. I- Isolation and characterization of momordicosides A and B, glycosides of a pentahydroxycucurbitane triterpene. *Chem. Pharm. Bull.*, 28: 2753-2762
- OKADA Y., KOYAMA K., TAKAHASHI K., OKUYAMA T. et SHIBATA S., 1980.- Gleditsia saponins. I- Structures of monoterpene moieties of Gleditsia saponin C. *Planta Med.*, 40: 185-192
- OSTROWSKI-MEISSNER H.T., CARLSSON R. et TRAECAARDH C., 1980.- Isolation and purification of proteins from green vegetation for direct human consumption, p. 864-870, In: *Food Process Eng.*, (Proc. Int. Congr.). Ed. LINKO P., MALKKI Y. et OLKKU J., J. Appl. Sci., London.
- OTSUKA H., KOBAYASHI S. et SHIBATA S., 1978.- Separation and determination of saponins of bupleuri radix by droplet counter current chromatography (DCC). *Planta Med.*, 33: 152-159
- PANDY H.N., MISRA K.C. et MUKHERJEE K.L., 1971.- Phosphate uptake and its incorporation in some crop plants and their associated weeds. *Ann. Bot.*, 35: 367-372
- PANOSYAN A.G. et MNATSAKANYAN V.A., 1977.- Structure of a pentacyclic triterpenic alcohol from Centaurea squarrosa. *Khim. Prir. Soedin.*, 1: 59-69; *Chem Abstr.*, 87: 117972 (1977)
- PAQUIN R. et LACHANCE R.A., 1964.- Effets des glycoalcaloïdes de la pomme de terre sur la croissance de Corynebacterium sepedonicum (Spieck. and Kott.) Shapt and Burkh. *Can. J. Microbiol.*, 10: 115-122
- PASCUAL TERESA J. (de), DIAZ F. et GRANDE M., 1980.- Componentes del Verbascum thapsus L. III- Contribución al estudio de las saponinas. *An. Quim.*, 76, 107-110
- PEDERSEN N.W. et WANG L-C., 1971.- Modification of saponin content of alfalfa through selection. *Crop Sci.*, 11: 833-835
- PEGEL K.H. et ROGERS C.B., 1976.- Mollie acid 3- β -D-glucoside, a novel 1 α -hydroxycyartane saponin from Combretum molle (Combretaceae). *Tetrahedron Lett.*, 47: 4299-4302
- PERI I., HEFTMANN E., BONDI A. et TENCER Y., 1979.- Biosynthesis of triterpenoid sapogenols in soybean and alfalfa seedlings. *Phytochemistry*, 18: 1671-1674

- PETERSON D.W., 1950.- Some properties of a factor in alfalfa meal causing depression of growth in chicks.
J. Biol. Chem., 183: 647-653
- POTTER J.D., TOPPING D.L. et OAKENFULL D., 1979.- Soy, saponins, and plasma cholesterol. Lancet, 1: 223
- POURRAT H., REGERAT F., LAMAISON J-L. et POURRAT A., 1979.- Utilisation d'une souche d'Aspergillus niger pour la purification de la saponine principale des tubercules de ficaria, Ficaria ranunculoides Moench.
Ann. Pharm. Fr., 37: 441-444
- QUAZI H.M., 1975.- Effect of cultivar and season on the concentration of saponins in lucerne (Medicago sativa L.).
N.Z. J. Agr. Res., 18: 227-232
- QUAZI H.M., 1976.- Distribution of saponins in roots of lucerne (Medicago sativa). N.Z. J. Agr. Res., 19: 347-348
- QUIROS-PEREZ F. et ELVEHJEM C.A., 1957.- Nutritive value of quinoa proteins. J. Agr. Fd Chem., 5: 538-541
- RANDERATH K., 1971.- Chromatographie sur couches minces.
Gauthier Villars, Paris
- PATHORE A.K. et KHANNA P., 1978.- Production of diosgenin from Costus speciosus (Koen) sm and solanum nigrum L. suspension cultures. Curr. Sci., 47: 870-871
- PATHORE A.K. et KHANNA P., 1979.- Steroidal constituents of Costus speciosus (Koen) sm callus cultures.
Planta Med., 35: 289-290
- RAVIKUMAR P.R., HAMMESFAHP P. et SIH C.J., 1979.- Cytotoxic saponins from the chinese herbal drug Yunnan Bai Yao.
J. Pharm. Sci. 68: 900-903
- REA J., TAPIA M. et MUJICA A., 1979.- Practicas agronomicas, p. 83-120. In: Quinoa y kañiwa, cultivos andinos.
TAPIA et al., ed. IICA, Bogotá, Colombia.
- READ P.E. et GARTON S., 1979.- Programming stocks plants for tissue culture success. Proceedings of the sixth annual meeting of the plant growth regulator working group, Las Vegas, Nevada. 20-24 août.
- READ E.P. et GAVINLERTVATANA P., 1976.- Advances in tissue culture: rayflower and protoplast culture. Proceeding of the Intern. Plant Propagators' Society, 26: 275-286
- REINHARD V.E., BOY M. et KAISER F., 1975.- Umwandlung von Digitalis-Glycosiden durch Zellsuspension-Skulturen.
Planta Med., suppl., 163-168.
- REVERS F.E., 1956.- Clinical and pharmacological investigations on extract of licorice. Acta Med. Scand., 154, 749-751;
Chem. Abstr., 50: 14961 (1956)
- REY H.Y. et MROGINSKI L.A., 1978.- Cultivo in vitro de apices caulinares de mandioca (Manihot esculenta Crantz).
Phyton, 36: 171-176

- RICE C.A., RYMAL K.S., CHAMBLISS O.L. et JOHNSON F.A., 1981.- Chromatographic and mass spectral analysis of cucurbitacins of three Cucumis sativus cultivars. Agr. Fd. Chem., 29: 194-196
- ROCA W.M., ESPINOZA N.O., ROCA M.R. et BRYAN J.E., 1978.- A tissue culture method for the rapid propagation of potatoes. Am. Potato J., 55: 691-701
- RODDICK J.G., 1974a.- The steroidal glycoalkaloid α -tomatine. Phytochemistry, 13: 9-25
- RODDICK J.G., 1974b.- Biosynthesis and distribution of tomatine in cultured excised Lycopersicum esculentum roots. Phytochemistry, 13: 1459-1462
- ROGGEMANS J. et CLAES M-C., 1979.- Rapid clonal propagation of rhubarb by in vitro culture of shoot tips. Scientia Hortic., 11: 241-246
- ROGOZINSKA J.W., GOSKA M. et KUZDOWICZ A., 1977.- Induction of plants from anthers of Beta vulgaris cultured in vitro. Acta Soc. Bot. Pol., 46: 471-479
- RUCKER W. JENTZSCH K. et WICHTL M., 1981.- Organ differentiation and glycoside-formation in tissues of Digitalis purpurea L. cultured in vitro; the effect of various growth substances, basal media and light conditions. Z. Pflanzenphysiol., 102: 207-220
- RUIZ W.A., 1979.- Estudo cromatografico das saponinas de quinoa (Chenopodium quinoa Willd., var. Kancolla). Tesa de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agricola, 135 p..
- ROMUSSI G., CAFAGGI S. et BIGNARDI G., 1980.- Hemolytic action and surface activity of triterpene saponins from Anchusa officinalis L.. Die Pharmazie, 35: 498-499
- SAKA H., VOQUI-DINH T.H. et CHENG T-Y., 1980.- Stimulation of multiple shoot formation on soybean stem nodes in culture. Plant Sci. Lett., 19: 193-201
- SANADA S., KONDO N., SHODI J., TANAKA O. et SHIBATA S., 1974.- Studies on the saponins of ginseng. II- Structures of ginsenoside-Re, -Rf and Rg2. Chem. Pharm. Bull., 22: 2407-2412
- SANDBERG F. et MICHEL K.H., 1962.- Phytochemical studies on Egyptian flora. VI- The saponins and prosapogenins of Anabasis articulata. Lloydia 25: 142-150
- SANDBERG F. et SHALABY A.F., 1960.- Phytochemical studies on the flora of Egypt. IV- The saponins of Anabasis articulata and A. setifera. Svensk. Farm. Tidskr., 64: 677-690; Chem. Abstr., 55: 2817 (1961)
- SANZ-MUNOZ M. et ALSASUA DEL VALLE M.T., 1976.- Influence of cold stratification and germination on saponins in Pinus pinus seeds. Rev. Esp. Fisiol., 32: 181-186

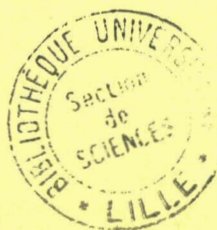
- SASTRY K.V. et VENKATA RAO E., 1976.- Pentacyclic triterpenoids from the stem bark of Xanthoxylum acanthopodium DC. Curr. Sci., 45: 739
- SAUSSAY R. et GAUTHERET R.J., 1971.- Effets de variation de température sur les tissus de rhizomes de topinambour cultivés in vitro, p. 187-199. In: Colloques internationaux CNRS, N° 193; les cultures de tissus de plantes. Ed. CNRS, Paris.
- SAUSSAY R. et GAUTHERET R.J., 1973.- Action de variations journalières de température sur les phénomènes de rhizogénèse manifestés par des tissus de rhizomes de topinambour cultivés à l'obscurité. C.R. Acad. Sci., Paris, (D), 276: 27-32
- SAUTIER C., DOUCET C., FLAMENT C. et LEMONNIER D., 1979.- Effects of soy protein and saponins on serum, tissue and feces steroids in rat. Atherosclerosis, 34: 233-241
- SAUVAIRE Y. et BACCOU J.C., 1978.- L'obtention de la diosgénine, (25 R)-Spirost-5-ene-3 β -ol; problèmes de l'hydrolyse acide des saponines. Lloydia, 41: 247-256
- SCHLOESSER E. et WULFF G., 1969.- Structural specificity of saponin hemolysis. I- Triterpene saponins and aglycons Z. Naturforsch., 24: 1284-1290; Chem. Abstr., 72: 53412 (1970)
- SCHLOSSER E., 1971.- Cyclamin, an antifungal resistance factor in Cyclamen species. Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung., 6: 85-95
- SCHLOSSER E., 1973a.- Role of saponins. II- Increased cyclamin contents in leaves of Cyclamen persicum as a response to microorganisms ? Phytopath. Z., 77: 184-186
- SCHLOSSER E., 1973b.- Role of saponins in antifungal resistance. II- The hederasaponins in leaves of English ivy (Hedera helix L.). Z. Pflkrantch. Pflschutz, 30, 704-710
- SCHUTZ F., 1942.- Experiments on foam time. I- Method of measuring foam time and some experiments with saponin and methylcellulose. Trans. Faraday Soc., 38: 85-93; Chem. Abstr. 36: 5075 (1942)
- SEGAL R., SHATKOVSKY P. et MILO-GOLDZWEIG P., 1974.- On the mechanism of saponin hemolysis. I- Hydrolysis of the glycosidic bond. Biochem. Pharmacol., 23: 973-981
- SHAABAN A.H. et AHMED Z.F., 1959.- A new spermatocidal principle from Phytolacca americana. Gaz. Egypt. Soc. Gynaecol. Obstet., 9: 27-34; Chem. Abstr., 53: 17340 (1959)
- SHANY S., BIRK Y., GESTETNER B. et BONDI A., 1970.- Preparation, characterisation and some properties of saponins from lucerne tops and roots. J. Sci. Fd. Agr., 21: 131-135
- SHARMA O.P et MAKKAR H.P.S., 1980.- Thin-layer chromatography of lantadene A and some related triterpenoids. J. Chromatogr. 196: 515-517

- SHAVER T.N., CAMP B.J. et DOLLAHITE J.W., 1964.- The chemistry of a toxic constituent of Xanthocephalum species. Ann. N.Y. Acad. Sci., 111: 737-743
- SIMES J.J.H., TRACEY I.G., WEBB L.J. et DUNSTAN W.J., 1959.- An Australian phytochemical survey. III- Saponins in Eastern Australian flowering plants. Australia, Commonwealth Sci. Ind. Res. Organization, Bull. 281, 31 p.; Chem. Abstr., 53: 22277 (1959).
- SIMMONDS N.W., 1965.- The grain Chenopods of the Tropical American highlands. Economic Bot., 19: 223-235
- SIMMONDS N.W., 1971.- The breeding system of Chenopodium quinoa. I- Male sterility. Heredity 27: 73-82
- SIMMONDS N.W., 1979.- Quinoa and relatives, Chenopodium spp (Chenopodiaceae), p. 29-30. In: Evolution of crop plants; SIMMONDS N.W., ed., Longman Group limited, London, New York.
- SINSHEIMER J.E., RAO G.S., Mc ILHENNY H.M., SMITH R.V., MAASSAB, H.F. et COCHRAN K.W., 1968.- Isolation and antiviral activity of the gymnemic acids. Experientia, 24: 302-303
- SOKOL'SKAYA A.M., et MAGZUMOV A., 1958.- The isolation of saponins from catchfly. Uchenye Zapiski Kazakh. Univ., 44: 99-104; Chem. Abstr., 55: 12555 (1961).
- STEIMULLER F. et BENTRUP F-W., 1981.- Amino acid transport in photoautotrophic suspension cells of Chenopodium rubrum L.: stereospecificity and interaction with potassium ions. Z. Pflanzenphysiol., 102: 353-361
- SUGA T., MARUYAMA Y., KAWANISHI S. et SHOJI J., 1978.- Studies on the constituents of phytolaccaceous plants. I- On the structures of Phytolaccasaponin B, E and G from the roots of Phytolacca americana L.. Chem. Pharm. Bull., 26: 520-525
- SUGA T., TANGE K., ICCHO K. et HIRATA T., 1980.- Biosynthesis of triterpenoids from amino acids in Pisum sativum. The distribution of the radioactivity in squalene biosynthesized from radioisotopically labelled L-leucine and L-valine. Phytochemistry, 19: 67-70
- TAKAGI K., PARK E-H. et KATO H., 1980.- Anti-inflammatory activities of hederagenine and crude saponin isolated from Sapindus mukorossi Gaertn. Chem. Pharm. Bull., 28: 1183-1188
- TAKINO Y., KOSHIOKA M., SHIOKAWA M., ISHII Y., MARUYAMA S., HIGASHIMO M. et HAYASHI T., 1979.- Quantitative determination of glycyrrhizic acid in liquorice roots and extracts by TLC densitometry. Planta Med., 36: 74-78
- TALUKDER N.M. et PAUPARDIN C., 1981.- Action de la solanine sur la croissance et la tubérisation de fragments de germes de pomme de terre cultivés in vitro. C.R. Acad. Sci., Paris, (D), 293: 549-552
- TANAKA O., 1977.- Recent studies on the chemistry of ginseng saponins. Korean J. Ginseng Sci., 2: 9-15

- TANAKA O. et YAHARA S., 1978.- Dammarane saponins of leaves of Panax pseudo-ginseng subsp. himalaicus. Phytochemistry, 17: 1353-1358
- TAPIA M., 1979.- Industrialización, p. 193-201. In: Quinoa y kañiwa, cultivos andinos. TAPIA et al., IICA, Bogotá, Colombia
- TOPPING D.L., STORER G.B., CALVERT G.D., ILLMAN R.J., OAKENFULL D.G. et WELLER R.A., 1980.- Effects of dietary saponins on fecal bile acids and neutral sterols, plasma lipids and lipoprotein turnover in the pig. Am. J. Clin. Nutr. 33: 783-786
- TRIPATHI B.K., 1972.- Nutrition minérale et rhizogénèse des tissus de topinambour cultivés in vitro. Thèse Doct. Etat, Paris VI, 164 p.
- TRISONTHI P., BACCOU J-C. et SAUVAIRE Y., 1980.- Essai d'amélioration de la production de saponogénines stéroïdiques par les tissus de fénugrec (Trigonella foenum-graecum L.) cultivés in vitro. C.R. Acad. Sci., Paris, (D), 291: 357-360
- TSCHESCHE R., REHKAMPER H. et WULFF G., 1969.- Über Triterpene XXVIII-Über die Saponine des Spinats (Spinacia oleracea L.). Liebigs Ann. Chem., 726: 125-128
- TSCHESCHE R. et WULFF G., 1967.- Sarsaparilloside, a saponin derived with bisglycosidic furostanol structure. Tetrahedron Lett., 29: 2785-2790
- TSCHESCHE R. (von) et WULFF G., 1973.- Chemie und Biologie der Saponine, p. 461-606. In: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe. Ed. HERZ W., GRISEBACH H. et KIRBY G.W., Springer Verlag, Wien New York.
- TSUDA Y., TABATA Y. et ICHINOHE Y., 1980.- Lycopodium triterpenoids. 10- Triterpenoid constituents of Lycopodium wightianum collected in Borneo. Chem. Pharm. Bull., 28: 3275-3282
- TULECKE W. et PUTNER A., 1965.- Changes in the amino acid composition of medium and cells of a plant tissue culture during growth in a liquid medium containing arginine, p. 103-116. In: Proceedings of an international conference on plant tissue culture. WHITE P.R. et GROVE A.R., Mc Cutchan publishing corporation, Berkeley, California.
- TURNER E.M., 1960.- The nature of the resistance of oats to the take-all fungus. III- Distribution of the inhibitors in oat seedlings. J. Exp. Bot., 11: 403-412
- VAN ATTA, G.R., GUGGOLZ J. et THOMPSON C.P., 1961.- Determination of saponins in alfalfa. J. Agr. Fd. Chem., 9: 77-79
- VARMA A. et SINGH U.B., 1979.- Techniques of removing saponins from mahua (Bassia longifolia) seed cake and its suitability as animal feed. Experientia, 35: 520-521
- VENDRIG J.C., 1964.- Growth-regulating activity of some saponins. Nature, 203: 1301-1302

- VERHOEFF K. et LEIM J.I., 1975.- Toxicity of tomatine to Botrytis cinerea, in relation to latency. Phytopath. Z., 82: 333-338
- VESK M., POSSINGHAM J.V. et MERCER F.V., 1966.- The effect of mineral nutrient deficiencies on the structure of the leaf cells of tomato, spinach, and maize. Austral. J. Bot., 14: 1-18
- VILLAR P.V., 1948.- Saponinas en el reino vegetal. Farmacognosia, 13: 305-340; Chem. Abstr., 43: 4729 (1948)
- VOOCT P.A. et HUISKAMP R., 1979.- Sex-dependence and seasonal variation of saponins in the gonads of the starfish Asteria rubens: their relation to reproduction. Comp. Biochem. Physiol., 62: 1049-1055
- WALKEY D.G.A., 1968.- The production of virus-free rhubarb by apical tip culture. J. Hort. Sci., 43: 283-287
- WALKEY D.G.A., 1972.- Production of apple plantlets from axillary bud meristems. Can. J. Plant Sci., 52: 1085-1087
- WALKEY D.G.A. et WOOLFITT, J.M.G., 1970.- Rapid clonal multiplication of cauliflower by shake culture. J. Hort. Sci., 45: 205-206
- WALL M.E., EDDY C.R., Mc CLENNAN M.L. et KLUMPP M.E., 1952.- Detection and estimation of steroidal sapogenins in plant tissue. Anal. Chem., 24: 1337-1341
- WEBER E.J., 1978.- The Inca's ancient answer to food shortage. Nature, 272: 486.
- WEETE J.D., 1973.- Sterols of the fungi: distribution and biosynthesis. Phytochemistry, 12: 1843-1864
- WEILER E.W., 1977.- Radioimmuno-screening methods for secondary plant products, p. 266-277. In: Plant tissue culture and its bio-technological application; ed. BARK W., REINHARD E. et ZENK M.H., Springer Verlag, Berlin.
- WEILER E.W., KRUGER H. et ZENK M.H., 1980.- Radioimmunoassay for the determination of the steroidal alkaloid solasodine and related compounds in living plants and herbarium specimens. Planta Med., 39: 112-124
- WESCOTT R.J., HENSHAW G.G. et ROCA W.M., 1977.- Tissue culture storage of potato germplasm; culture initiation and plant regeneration. Plant Sci. Lett., 9: 309-315
- WHITE Ph. R., 1939.- Glycine in the nutrition of excised tomato roots. Plant Physiol. 14: 527-538 (d'après GAUTHERET R.J., 1959).
- WHITE P. L., ALVISTUR E., VINAS C.D.E., WHITE H.S. et COLLAZOS C., 1955.- Nutrient content and protein quality of quinoa and cañihua, edible seed products of the Andes mountains. J. Agr. Fd. Chem., 3: 531-534

- WOCHOK Z.S. et SLUIS C.J., 1980.- Gibberellic acid promotes Atriplex shoot multiplication and elongation. Plant Sci. Lett., 17: 363-369
- WOLF M.J., 1946.- Estimation and physiological role of solanine in the potato. J. Agr. Res., 73: 1-32
- WOLTERS B., 1968.- The antibiotic action of saponins. III- Saponins as plant fungistatic compounds. Planta, 79: 77-83
- YAHARA S., TANAKA O. et KOHORI T., 1976.- Saponins of the leaves of Panax ginseng C.A. Meyer. Chem. Pharm. Bull., 24: 2204-2208
- YAHARA S., TANAKA O. et NISHIOKA I., 1978.- Dammarane type saponins of leaves of Panax japonicus C.A. Meyer. 2- Saponins of the specimens collected in Tottori-ken, Kyoto-shi, and Niigata-ken. Chem. Pharm. Bull., 26: 3010-3016
- YOSIOKA I., FUJIO M., OSAMURA M. et KITAGAWA I., 1966.- A novel cleavage method of saponin with soil bacteria, intending to the genuine sapogenin on the Panax saponins. Tetrahedron Lett., 4: 63603
- ZACHARIUS R.M., KALAN E.B., OSMAN S.F. et HERB S.F., 1975.- Solanidine in potato (Solanum tuberosum) tuber tissue disrupted by Erwinia atroseptica and by Phytophthora infestans. Physiol. Plant Pathol., 6: 301-305
- ZIMMER D.E., PEDEPSEN M.W. et Mc GUIRE C.F., 1967.- A bioassay for alfalfa saponins using the fungus, Trichoderma viride Pers. ex Fr.. Crop Sci., 7: 223-224



ERRATUM

+ Au lieu de *absorbant*, lire *adsorbant*:

- dans le sommaire (p 72)
- p 49
- p 72

+ En bas de la page 30, ajouter:

les glucosides B et C formés tous les deux d'acide oléanolique, mais qui se distinguent, toutefois, par la présence de glucose pour le premier et d'acide glucuronique pour le deuxième.

+ p 36: la référence (NITSCH et NITSCH, 1962) est à supprimer, ce travail se rapportant à l'action d'autres substances glucosylées, mais de nature phénolique.

+ p 66, tableau 8, au lieu de *myo-inositol (g/l)*, lire *myo-inositol (mg/l)*.

+ dans la bibliographie, ajouter :

QUAZI M.H., 1980.- In vitro multiplication of Lavendula spp.. Ann. Bot.
45, 361-362.

