

50376
1983
7

N° d'ordre : 1007

50376
1983
7

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THÈSE

présentée

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE TROISIÈME CYCLE

par

Philippe MORINVILLE



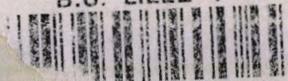
**ELABORATION D'ANTHOCYANES PAR LES
COLONIES TISSULAIRES DE CHOU-ROUGE**

(*Brassica oleracea* Var. Tête de Nègre).

Soutenu le 13 Sept. 1983 devant la Commission d'Examen

Président :	M.	R.	BOURIQUET
Rapporteur :	Mle	C.	PAUPARDIN
Examineur :	M.	J.C.	MERLIN

B.U. LILLE 1



139901 1

Ce travail a été réalisé à l'Université des Sciences et Techniques de Lille I, au laboratoire de Physiologie végétale sous la direction de Monsieur le Professeur BOURIQUET et au laboratoire de Spectrochimie infrarouge et Raman du C.N.R.S (L.P. 2641) que dirige Monsieur le Professeur DELHAYE, Directeur d'Institut au C.N.R.S.

Je prie Monsieur le Professeur BOURIQUET de trouver ici le témoignage de ma sincère gratitude pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir dirigé dans ce travail. Je lui sais gré d'avoir accepté de présider le Jury d'examen.

J'ai eu des discussions très fructueuses avec Mademoiselle le Professeur PAUPARDIN. Je suis sensible à l'honneur qu'elle me fait en examinant cette thèse en qualité de Rapporteur.

Je tiens à remercier Monsieur MERLIN, Maître assistant au laboratoire de Spectrochimie infrarouge et Raman, qui, en guidant les recherches dans le domaine de la spectrométrie Raman à laser, nous a permis d'appliquer cette méthode récente à la biologie. Je lui sais gré d'avoir accepté de juger cette thèse en qualité d'Examineur.

Que tous les membres du laboratoire qui m'ont permis de mener à bien ce travail soient assurés de ma profonde gratitude et amitiés.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION	2
HISTORIQUE	5
A) LA CULTURE DES TISSUS DE FEUILLES DE CHOU	5
B) INFLUENCE DES REGULATEURS DE CROISSANCE SUR L'ACCUMULATION DES ANTHOCYANES	6
C) INFLUENCE DE LA NUTRITION SUR LA BIOSYNTHESE DES ANTHOCYANES ET DES COMPOSES PHENOLIQUES	8
1) La nutrition carbonée	8
2) La nutrition azotée	8
3) Influence des acides aminés et de divers composés organiques	10
D) INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS SUR LA BIOSYNTHESE DES ANTHOCYANES	11
1) Lumière et biosynthèse d'anthocyanes	11
2) Mode d'action du phytochrome	13
3) La réaction à haute énergie	16
a) Exemples en faveur de l'intervention d'autres photorécepteurs	16
b) Exemple en faveur de l'intervention du phyto- chrome	17
E) EXTRACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES	18
1) Généralités	18
2) Extraction des anthocyanes en milieu acide	18

F) ANALYSE ET BIOSYNTHESE DES FLAVONOIDES	20
1) Formation des composés phénoliques à partir des glucides	20
2) Formation des flavonoïdes	20
3) Structure de la rubrobrassicine	21
G) UTILISATION DE LA SPECTROSCOPIE RAMAN ET APPLICATIONS A LA BIOLOGIE	23

MATERIEL ET TECHNIQUES

A) LE MATERIEL BIOLOGIQUE	24
B) LA CULTURE IN VITRO DES TISSUS DE FEUILLES DE CHOU ROUGE.		24
1) Préparation du matériel	24
2) Milieux de culture	24
3) Conditions de culture	25
4) Prélèvement des explantats	25
5) Le mode d'ensemencement	26
6) Evaluation de la croissance	26
C) ENTRETIEN DES COLONIES TISSULAIRES ET CONDITIONS DE CULTURE	26
1) Entretien des colonies tissulaires	26
2) Conditions de culture	27
D) CARACTERISTIQUES DES SOURCES LUMINEUSES	27

E) EXTRACTION ET PURIFICATION DES ANTHOCYANINES	29
1) Extraction totale	29
2) Purification des extraits totaux	29
F) MESURES SPECTROPHOTOMETRIQUES	30
G) EXPRESSION DES RESULTATS	30
H) DOSAGES DES NITRATES	32
I) IDENTIFICATION DES ANTHOCYANINES	33
1) Extraction totale	33
2) Purification des extraits	34
3) Hydrolyse acide	34
4) Oxydation à l'eau oxygénée	34
5) Chromatographies	35
J) UTILISATION DE LA MICROSONDE MOLE A EFFET RAMAN	36

RESULTATS ET DISCUSSION

PREMIERE PARTIE

LA CULTURE IN VITRO DES TISSUS DE FEUILLES DE CHOU ROUGE

A) INFLUENCE DU LIEU DE PRELEVEMENT DES EXPLANTATS ET ROLE DES REGULATEURS DE CROISSANCE	39
B) INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SACCHAROSE SUR LA CROISSANCE DES FRAGMENTS DE FEUILLES	41

DEUXIEME PARTIE

ISOLEMENT DES COLONIES TISSULAIRES ET ETUDE DE LA CROISSANCE

A) ISOLEMENT DES COLONIES TISSULAIRES	43
B) ETUDE DE LA CROISSANCE DES COLONIES NON PRODUCTRICES D'ANTHOCYANES	43
1) Action conjuguée de l'ANA et de la 6 BAP	43
2) Influence du saccharose et du glucose	44
3) Influence de la L ⁺ glutamine	44

TROISIEME PARTIE

ETUDE DE L'ELABORATION D'ANTHOCYANES PAR LES COLONIES TISSULAIRES

A) INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE	46
1) Evolution de la teneur en anthocyanes	46
2) Influence du récipient de culture	48
3) Influence de la température	50
4) Analyse de quelques facteurs favorisant la synthèse des anthocyanines	51
B) INFLUENCE DES LUMIERES MONOCHROMATIQUES	54
C) INFLUENCE DE LA LUMIERE FOURNIE PAR LES TUBES "GRO-LUX" ...	60
D) INFLUENCE DU TEMPS DE CULTURE ET DE LA PHOTOPERIODE	60
E) INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SACCHAROSE ET EN GLUCOSE..	63

1) En photopériodes 0 : $\bar{24}$, 6 : $\bar{18}$, 18 : $\bar{6}$ et 24 : $\bar{0}$	63
2) Influence des rythmes photopériodiques 1 : $\bar{1}$, 2 : $\bar{2}$ et 3 : $\bar{1}$	65
F) INFLUENCE DE LA QUANTITE D'ENERGIE LUMINEUSE ET DE LA CONCENTRATION EN SUCRE	68
G) INFLUENCE DE LA NUTRITION AZOTEE	70
1) Influence de l'azote nitrique	71
2) Variation de la concentration totale d'azote minéral du milieu de base	73
3) Influence du calcium et de la quantité d'azote minéral	76
4) Action combinée du nitrate de calcium et du nitrate d'ammonium	80
H) INFLUENCE DES PRECURSEURS	83
I) INFLUENCE DES REGULATEURS DE CROISSANCE	85
1) Influence des composés auxiniques	85
2) Influence des cytokinines	86
3) Interactions entre les cytokinines et les composés auxiniques	87

QUATRIEME PARTIE

A) IDENTIFICATION DES ANTHOCYANINES PAR CHROMATOGRAPHIE	88
1) Résultats de l'hydrolyse acide	89

2) Spectres d'absorption des anthocyanines	89
3) Résultats de l'oxydation à l'eau oxygénée	89
B) UTILISATION DE LA SPECTROSCOPIE RAMAN A L'IDENTIFICATION ET LA DETECTION DE DIVERSES MOLECULES	91
1) Etude spectroscopique d'extraits anthocyaniques obtenus à partir de colonies tissulaires de chou- rouge	91
2) Microanalyses <u>in situ</u> des cellules de colonies tissulaires de chou rouge	93
3) Analyse des phénomènes intervenant dans les variations d'intensité des raies spécifiques des anthocyanines	95
4) Microanalyse <u>in situ</u> des cellules dépourvues d'anthocyanines	98

CONCLUSIONS

A) LA CULTURE IN VITRO DES FRAGMENTS DE FEUILLES DE CHOU ROUGE	99
B) INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE SUR LA BIOSYNTHESE DES ANTHOCYANINES	100
C) INFLUENCE DE LA NUTRITION CARBONÉE ET DE LA PHOTOPERIODE ..	102
D) SUR LA NUTRITION AZOTÉE	104
E) SUR LA STRUCTURE DE LA RUBROBRASSICINE ET LES MICROANALYSES <u>IN SITU</u>	105

BIBLIOGRAPHIE	108
---------------------	-----

LISTE DES ABREVIATIONS

AIA : Acide indolyl-acétique.

ANA : Acide α naphthyl-acétique.

Kin ; Kinétine

NOA : Acide β naphthoxyacétique.

6 BAP : 6 Benzyl amino purine

2,4 D : Acide 2,4 dichlorophénoxyacétique.

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétra-acétique.

EGTA : Acide éthylène glycol bis (β amino éthyl éther) N,N'
tétra-acétique.

R : Lumière rouge.

RL : Lumière rouge lointain

Photopériode 18 : $\overline{6}$: 18 heures d'éclairement pour 6 heures
d'obscurité.

Rythme photopériodique 2: $\overline{2}$: 2 heures d'éclairement pour 2 heures
d'obscurité (soit 12 heures d'éclairement par
jour).

MOLE : Molecular Optics Laser Examiner

INTRODUCTION

Quelques chercheurs, en faisant varier la composition des milieux nutritifs et les conditions physiques de culture, ont obtenu la néoformation de calcs compacts, de bourgeons et de racines à partir de fragments de feuilles de Brassica cultivés in vitro.

De plus, de nombreuses études ont été menées sur les facteurs qui favorisent la biosynthèse des anthocyanes par des plantules de chou rouge, mais aucune n'a été entreprise sur les tissus cultivés in vitro, de cette plante.

Notre travail consistait à faire proliférer par la technique de culture in vitro, des fragments de feuilles de chou rouge, d'en isoler des colonies tissulaires, nous permettant ensuite d'analyser les conditions physiques et chimiques nécessaires à l'élaboration des anthocyanines.

Les anthocyanes sont des molécules plus ou moins complexes, composées d'un aglycone et de sucre (glucose, rhamnose etc...). Elles constituent une famille très particulière des flavonoïdes.

Les aglycones les plus répandus dans la nature sont le pélargonidol, le cyanidol, le paeonidol, le delphinidol, le pétunidol et le malvidol qui définissent ainsi six anthocyanidines (Figure 1).

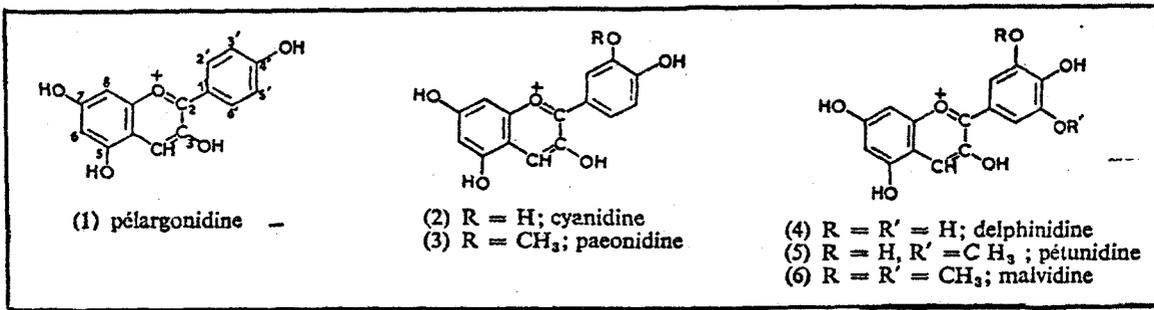


Figure 1 : - Structure de diverses anthocyanidines.

././././././././.

On définit par anthocyanine, une anthocyanidine qui forme des liaisons glycosidiques avec divers sucres. Ces liaisons peuvent se former en position 3 ou en position 3 et 5 de l'anthocyanidine (Figure 2).

Cependant, la terminologie peut être plus précise pour nommer une anthocyanine. Par exemple, la cyanidine 3,5 diglucoside est appelée cyanine.

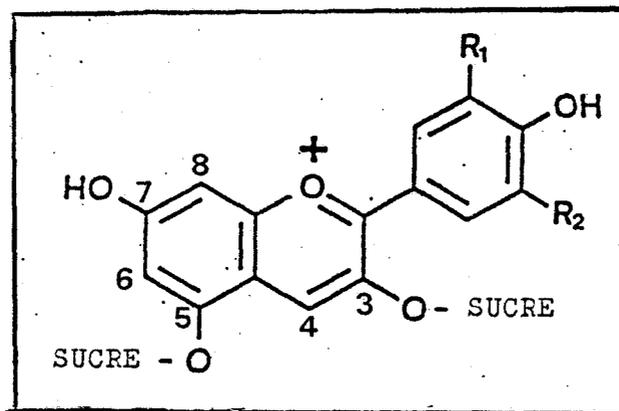


Figure 2 : - Structure générale d'une anthocyanine.

Dés groupements acylés (acide para-coumarique, acide férulique) peuvent être estérifiés sur un hydroxyle d'une molécule glucidique; cette dernière étant fixée en position 3 de l'aglycone. Ces molécules sont appelées anthocyanines acylées. Les anthocyanines du chou rouge sont acylées et portent le nom de rubrobrassicine.

De nombreuses recherches ont permis d'identifier les anthocyanines du chou rouge et d'établir leurs structures moléculaires (HARBORNE, 1964). Pour notre part, après avoir déterminé les différents types d'anthocyanines présents dans les colonies tissulaires isolées, nous avons pu mettre en évidence comment se présentent et évoluent ces composés dans les cellules, en appliquant à la biologie la technique récente de microanalyse in situ par spectrométrie Raman, à l'aide de la microsonde moléculaire à laser.

HISTORIQUE

A) LA CULTURE DES TISSUS DE FEUILLES DE CHOU

Généralement, la prolifération in vitro des tissus végétaux, n'a lieu qu'en présence de mélanges plus ou moins complexes en régulateurs de croissance.

TOPONI (1963) parvient à faire proliférer abondamment des fragments de feuilles de chou vert (Brassica oleracea L. var. acephala D.C) et de chou rouge (Brassica oleracea L var. capitata L.) quand les milieux de culture sont additionnés d'AIA et de kinétine. De plus, c'est essentiellement le bord de l'explantat qui prolifère de façon anarchique, pour donner une protubérance compacte qui est beaucoup plus importante dans le cas du chou rouge que dans celui du chou vert.

Des fragments de feuilles de chou rouge (Brassica oleracea var. capitata) cultivés in vitro, prolifèrent pour donner des cals compacts, en présence d'AIA et de lait de coco. Quand l'AIA et associé à la kinétine, les cals produisent de nombreux bourgeons (BAJAJ et NIETSCH, 1974).

En 1975 PRIMO-MILLO et HARADA montrent que néoformation de cals durs et compacts par des fragments de feuilles de chou rouge (Brassica oleracea L. var. Tête de nègre), peut être contrôlée par l'action du 2,4 D et de la 6 BAP. En outre, la 6 BAP associée à l'ANA ou au NOA induit la formation de bourgeons. Les composés auxiniques (AIA, ANA et NOA) provoquent une abondante rhizogénèse. Les bourgeons néoformés peuvent être

enracinés. De cette façon, ces auteurs ont montré qu'il est possible de reproduire végétativement le chou rouge à partir de tissus de feuilles cultivés in vitro.

Des explantats de limbe de brocoli (Brassica oleracea L. Italica group) produisent des cals, des racines et des bourgeons quand les milieux de culture sont additionnés d'AIA et de kinétine. Cependant, la nature de la prolifération est très différente suivant la concentration en régulateurs de croissance (JOHNSON et MITCHELL, 1978).

SEILLEUR et MARTIAT (1978) obtiennent la régénération de plantes entières (Brassica pekinensis) à partir d'explantats de limbe prélevés sur des plantes âgées d'un mois et demi.

B) INFLUENCE DES REGULATEURS DE CROISSANCE SUR L'ACCUMULATION DES ANTHOCYANES

BLACKELY et STEWART (1961) trouvent que l'accumulation des anthocyanines dans des cellules d'Haplopappus gracilis dépend de la concentration en AIA du milieu de culture qui contient également du lait de coco. Ces auteurs montrent également que l'ANA stimule la production d'anthocyanines.

En 1971, CONSTABEL et ses collaborateurs étudient l'influence de l'ANA et des cytokinines sur la production des anthocyanines par une suspension cellulaire d'Haplopappus gracilis. Ces auteurs montrent qu'il existe un seuil de concentration en régulateur de croissance (2,4 D ou ANA) qui permet une accumulation

des anthocyanines et que la benzyladénine et la kinétine à fortes doses améliorent cette accumulation mais diminuent la croissance.

MATSUMOTO et ses collaborateurs (1973) ne constatent pas grandes variations du taux de croissance d'une suspension cellulaire de Populus lorsqu'ils ajoutent du 2,4 D, de l'ANA ou de l'AIA aux milieux de culture mais observent que le 2,4 D inhibe la synthèse des anthocyanines au contraire de l'ANA et de l'AIA.

VON ALFERMANN et ses collaborateurs (1975) montrent que de grandes variations peuvent apparaître dans la biosynthèse des anthocyanines par une colonie tissulaire de carotte, suivant l'emploi des différents isomères du 2,4 D ou de l'ANA.

La biosynthèse des anthocyanines chez les tissus de vigne cultivés in vitro, est plus sensible à l'action de l'acide abscissique et de l'acide 2 chloroéthylphosphonique qui agissent synergiquement avec le saccharose (PIRIE et MULLINS, 1976).

Plus récemment, NAKUMURA et ses collaborateurs (1980) montrent que l'accumulation des anthocyanines dans des pétales de rose (Rosa hybrida Hort. cv. Ehigasa), peut être favorisée par la lumière visible et la lumière ultraviolette. Cependant, l'action des rayons ultraviolets peut être remplacée par celle de la kinétine. Ces auteurs suggèrent que les rayons ultraviolets et la kinétine peuvent augmenter la perméabilité membranaire et permettre ainsi le passage des substances nécessaires à la biosynthèse des anthocyanines.

C) INFLUENCE DE LA NUTRITION SUR LA BIOSYNTHESE DES ANTHOCYANINES
ET DES COMPOSES PHENOLIQUES

1) La nutrition carbonée

La coïncidence des facteurs favorisant l'accumulation des sucres (haute intensité lumineuse, ralentissement de croissance) avec la biosynthèse des anthocyanines, est établie pour de nombreux tissus cultivés in vitro. La concentration en saccharose qui favorise l'accumulation des anthocyanines est très variable suivant la nature des tissus cultivés in vitro : 3 % pour des tissus de carotte (GAUTHERET, 1941), 9 % pour des tissus de Vitis vinifera (SLABECKA SZWEYKOWSKA, 1952) et 4 % pour des plantules de chou rouge (SZWEYKOWSKA, 1959).

Quelques auteurs, en comparant les effets du saccharose à ceux du glucose, du fructose, du mannitol et du galactose, montrent que ce sont le saccharose et le glucose qui favorisent le mieux la biosynthèse des anthocyanines (THIMANN et EDMONDSON, 1949; THIMANN et Coll., 1951; KLEIN et HAGEN, 1961; MATSUMOTO et Coll. 1973).

2) La nutrition azotée.

En évaluant les quantités d'anthocyanines, de sucres et d'azote dans des plantules de chou rouge, FREY-WYSSLING et BLANK (1943) ne trouvent pas de relation entre le contenu en azote et celui en anthocyanines,

HELLER (1948) montre que la suppression de l'azote du milieu de culture, détermine dans des tissus de vigne vierge qui normalement n'en présentent pas, la formation d'anthocyanines. Cette détermination est d'autant plus remarquable que d'autres

carences ne la présentent pas. Cela incite HELLER à conclure que le facteur responsable de la synthèse des anthocyanines, est bien la carence en azote. HELLER met donc l'accent sur les rapports qui doivent exister entre la formation des anthocyanines et le métabolisme de l'azote.

L'influence des composés azotés sur la biosynthèse des anthocyanines est en relation avec celle des sucres. En effet, SZWEYKOWSKA (1959) montre que la présence de composés azotés dans un milieu de culture, cause une forte diminution du taux de sucre dans des plantules de chou rouge, donc une baisse de la quantité d'anthocyanines. Toutefois, le sucre, en absence ou en présence d'une faible dose de composés azotés, engendre une accumulation des anthocyanines. Une relation similaire est mise en évidence par la mise en culture de fragments de feuilles de vigne en présence de KNO_3 et de saccharose (PIRIE et MULLINS, 1976).

AMORIN et ses collaborateurs (1977), KUBEK et SHULER, (1980) en s'intéressant au problème de l'action des composés azotés et des sucres sur la biosynthèse de composés phénoliques par des colonies tissulaires, retrouvent la même relation.

En 1978, SHAH et MEHTA étudient l'action de l'azote organique et minéral, sur l'accumulation des composés phénoliques par des cals (Crotalaria juncea L.), et montrent que l'azote organique fourni sous forme d'hydrolysats de caséine ou d'extrait de levure favorise la biosynthèse des composés phénoliques sans avoir d'effets néfastes sur la croissance.

3) Influence des acides aminés et de divers composés organiques.

La nature des agents inhibiteurs ou stimulateurs de la biosynthèse des composés phénoliques et des anthocyanes en particulier, est souvent caractéristique de l'espèce considérée.

THIMANN et RADNER (1955) montrent que la biosynthèse des anthocyanines chez Spirodela oligorrhiza est inhibée par les antagonistes des purines et des pyrimidines. En 1958, ces auteurs montrent que la riboflavine supprime l'inhibition causée par beaucoup de ces substances.

Dans les tissus de blé, STRAUS (1960) trouve que la riboflavine, la méthionine, l'asparagine, la glutamine et la valine sont des inhibiteurs de la biosynthèse des anthocyanines alors que l'acide aspartique, la cystine, les acides adényliques et cytidiliques en sont des stimulateurs. Pour les analogues des purines et des pyrimidines, les résultats obtenus sont similaires à ceux de THIMANN et RADNER, mais les expériences montrent que les nucléotides ne participent pas directement à la biosynthèse des anthocyanines.

En 1978, SHAH et MEHTA étudient l'influence de la L tyrosine, de la L phénylalanine et du couplage de ces deux acides aminés. Dans tous les cas, ils constatent une augmentation du taux de composés phénoliques dans des plantules de Crotalaria juncea L. Cependant, les effets de la L tyrosine sont meilleurs

que ceux de la L phénylalanine ou de ces deux composés réunis.

D) INFLUENCE DE LA LUMIERE SUR LA BIOSYNTHESE DES ANTHOCYANES

1) Lumière et biosynthèse d'anthocyanes.

Selon DOWNS (1964), SENEBIER (1799) montre que la lumière est généralement nécessaire à la biosynthèse des anthocyanes. En 1932, ARTHUR obtient une accumulation d'anthocyanes dans un épiderme de pomme en utilisant une lumière artificielle. SLABECKA-SZWEYKOWSKA (1952) montre qu'il existe une relation étroite entre les quantités d'anthocyanes et de sucres solubles dans des tissus de Vitis vinifera cultivés in vitro et éclairés continuellement.

La nature et le temps d'éclairement ainsi que la photopériode sont des facteurs qui influencent également la biosynthèse des anthocyanines. En effet, GEZA HRAZDINA et LEROY (1979) montrent que des plantules de chou rouge (Brassica oleracea cv. Red Radish) accumulent des anthocyanines quand elles sont éclairées avec des lampes fluorescentes de types "Gro Lux" et "Cool White". Cependant, pour obtenir une accumulation optimale d'anthocyanines, il faut éclairer longtemps les plantules (48 heures) après leur incubation à l'obscurité (72 heures). La biosynthèse des anthocyanines dans des racines de maïs, est favorisée par la lumière blanche et en photopériode 18 : 5 (PILET et TAKAHASHI, 1979).

La biosynthèse des anthocyanines peut être stimulée par l'action de lumières monochromatiques. L'accumulation des anthocyanines dans l'épiderme de pomme, est optimale en utilisant des lumières monochromatiques de longueurs d'ondes comprises entre 290 et 310 nm et 360 et 450 nm (ARTHUR, 1932). En 1955, SLABECKA-SZWEYKOWSKA met en évidence l'influence de la lumière bleue sur la biosynthèse des anthocyanines par des tissus de Vitis vinifera cultivés in vitro. SLABECKA-SZWEYKOWSKA (1955), SZWEYKOWSKA (1957) ainsi que SIEGELMAN et HENDRICKS (1957) montrant que la lumière rouge stimule la biosynthèse des anthocyanines par des plantules de chou rouge.

L'influence et le rôle des lumières monochromatiques sur sur la biosynthèse des anthocyanines par des plantules de chou-rouge ont été également étudiés par de nombreux auteurs qui utilisent la lumière rouge (λ de 590 à 690 nm) et la lumière rouge lointain ($\lambda = 730$ nm). L'utilisation de ces types de lumière, est de courte durée (quelques minutes) et toujours après une période d'incubation du matériel végétal à l'obscurité (DOWNS, 1964 ; KU et MANCINELLI, 1972 ; MANCINELLI et Coll., 1974 1975 ; MANCINELLI et RABINO, 1974 ; PECKET et HATHOUT BASSIM, 1974 ; RABINO et Coll., 1977).

L'accumulation des anthocyanines par une suspension cellulaire de Peuplier, peut être obtenue en utilisant la lumière bleue ou rouge. Dans ce cas, c'est la lumière bleue qui

stimule au maximum la biosynthèse, mais la croissance est considérablement ralentie (MATSUMOTO et Coll., 1973). Pour une suspension cellulaire d'Haplopappus gracilis, ce sont les rayons ultraviolets ($\lambda = 345$ nm) qui sont les plus favorables à la biosynthèse des flavonoïdes et plus particulièrement à celle des anthocyanines (WELLMANN et Coll., 1976). Dans tous les cas, l'utilisation des lumières monochromatiques pour stimuler la biosynthèse des anthocyanines, nécessite une période d'incubation à l'obscurité des colonies tissulaires ou des cellules isolées.

L'action des rayons ultraviolets sur l'accumulation des anthocyanines, est également montrée par DRUMM et MOHR (1978) qui trouvent une relation entre des récepteurs de rayons ultraviolets, le phytochrome et l'accumulation des anthocyanines. De même il existe une relation entre la lumière rouge, la lumière rouge lointain, le phytochrome et la biosynthèse des anthocyanines (MOHR et Coll., 1979 ; JOHNSON, 1980).

2) Mode d'action du phytochrome

Le phytochrome est une chromoprotéine de couleur bleu-vert sous la forme P_{660} et vert sous la forme P_{730} . Cette modification de couleur est obtenue en irradiant une solution de phytochrome (HENDRICKS, 1968). En outre, le phytochrome sous sa forme active (P_{fr}) après irradiation en lumière rouge ($\lambda = 660$ nm), est très instable; aussi peut-il revenir sous

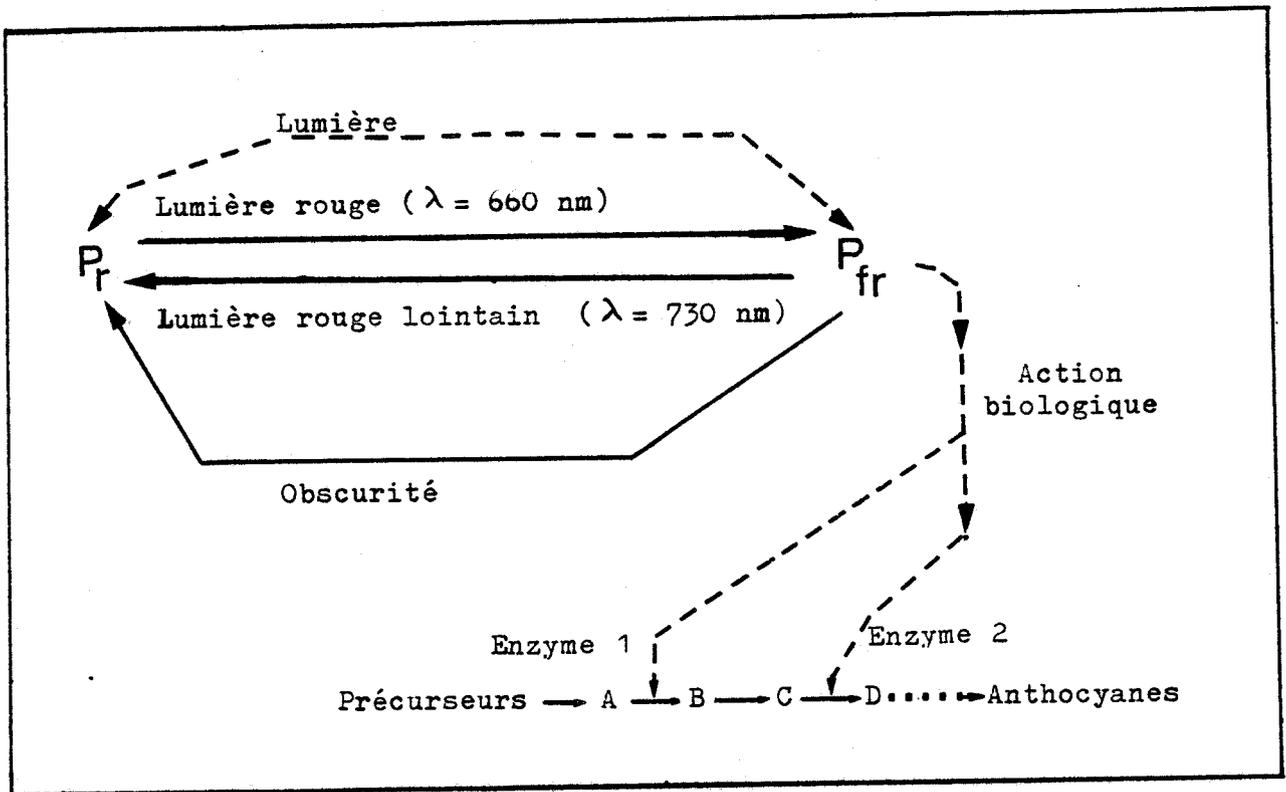


Figure 3 :- Schéma théorique montrant la transformation du phytochrome sous l'action de la lumière rouge , rouge lointain et de l'obscurité ainsi que l'intervention possible du phytochrome dans la synthèse des anthocyanes (d'après PRATT , 1978)

P_r - Phytochrome sous sa forme inactive

P_{fr} - Phytochrome sous sa forme active

sa forme inactive (P_r) après irradiation en lumière rouge lointain ($\lambda = 730$ nm) (HUAULT, 1969) ou à l'obscurité (PRATT, 1978 ; PILL-SOON SONG et QUAE CHAE, 1979) (Figure 3). On pense également que cette réaction s'effectue dans des tissus cultivés in vitro (BOISARD et Coll., 1974 ; AUGUSTO et Coll., 1978).

De nombreux phénomènes de photobiosynthèse sont contrôlés par le phytochrome. En effet, pour le chou rouge, il a été constaté que la lumière rouge et la lumière rouge lointain contrôlent la biosynthèse des anthocyanines par l'intermédiaire du phytochrome et que le site d'action de ce dernier est dans la membrane des cellules (PECKET et HATHOUT BASSIM, 1974). En outre, l'action de la lumière rouge peut être remplacée totalement ou partiellement par des réactifs tels que le n propanol ou la kinétine qui stimulent la biosynthèse des anthocyanines chez des plantules de chou rouge mises en incubation à l'obscurité. Cette stimulation peut être annulée par exposition du matériel végétal à la lumière rouge lointain (PECKET et HATHOUT BASSIM, 1974 ; HATHOUT BASSIM et PECKET, 1975). Des expériences semblables ont été réalisées par DUMORTIER et VENDRIG (1977) sur Phaseolus aureus. Ces auteurs remplacent la kinétine et le n propanol par la diméthylformamide et du diméthylsulfoxyde pour obtenir une stimulation de la biosynthèse des anthocyanines. Cependant, les effets du diméthylsulfoxyde ne sont pas réversibles en irradiant le matériel végétal à la lumière rouge lointain.

D'autres travaux réalisés par HATHOUT BASSIM et PECKET (1975), montrent que l'induction de la biosynthèse des anthocyanines chez des plantules de chou rouge par irradiation en lumière rouge, est inhibée lorsqu'on fournit du chlorure de calcium aux plantules. De même, la stimulation de la biosynthèse des anthocyanines à l'obscurité, due aux traitements à la kinétine et au n propanol, est réduite par les ions Ca^{++} . Par contre, l'EDTA qui chélate les ions Ca^{++} , stimule la biosynthèse quand les plantules sont placées à l'obscurité. De plus, ces auteurs constatent qu'il y a une augmentation significative du calcium extractible lorsque les plantules sont traitées à l'EDTA puis soumises à l'action de la lumière rouge.

Ces observations permettent à HATHOUT BASSIM et PECKET de suggérer que le photocontrôle de la biosynthèse des anthocyanines peut entraîner des changements dans la perméabilité cellulaire. Ces changements résulteraient d'une altération de la capacité de rétention des ions Ca^{++} au niveau de la membrane suivant la configuration moléculaire du phytochrome. S'il en est ainsi, le phytochrome sous sa forme inactive doit avoir une plus grande capacité à retenir les ions Ca^{++} que sous sa forme active.

Des expériences montrent d'ailleurs que le phytochrome isolé sous sa forme inactive capte les ions Ca^{++} et que le système est réversible en irradiant la solution de phytochrome avec la lumière rouge (YAMAMOTO et FURUYA, 1975). Pour d'autres espèces végétales, l'induction de la biosynthèse due à la

lumière rouge créant un changement de configuration moléculaire du phytochrome nécessite l'intervention d'autres facteurs biochimiques plus complexes tels les phospholipides (KOTARO et Coll., 1979).

Cependant, il est intéressant de noter qu'en 1957, MOHR, SIEGELMAN et HENDRICKS discernent deux photoréactions responsables de la biosynthèse des anthocyanines chez Brassica oleracea et Brassica alba : "l'une est caractérisée par l'antagonisme -lumière rouge / lumière rouge lointain - et a le phytochrome comme récepteur, l'autre présente une action prépondérante de la lumière bleue et de la lumière rouge lointain ainsi qu'une dépendance vis à vis de la densité du flux d'où la dénomination de réaction à haute énergie"(ROLLIN, 1970).

3) La réaction à haute énergie.

La lumière rouge lointain et la lumière bleue ont les mêmes effets que la lumière rouge dans l'induction de la biosynthèse des anthocyanines chez Fagopyrum esculentum (MOHR et VAN NES, 1963) et chez Phacelia tanacetifolia (BREGEAUT et ROLLIN, 1965) et dans l'induction de la biosynthèse des composés phénoliques (ENGELSMA, 1967) . Cependant, les avis sont partagés quant à l'intervention du phytochrome dans ce type de réaction.

a) Exemples en faveur d'autres photorécepteurs.

La biosynthèse des anthocyanines chez Brassica rapa est induite par une exposition à la lumière rouge, uniquement si celle-ci est précédée par une longue durée d'irradiation à la lumière bleue. Cependant, la présence des cotylédons est

indispensable pour obtenir une induction de la biosynthèse des anthocyanines dans les hypocotyles. Avec la lumière bleue, la quantité d'anthocyanines accumulée dans les hypocotyles est la même, que les cotylédons soient présents ou non (GRILL et VINCE, 1965 ; VINCE et GRILL, 1966).

En 1967, ENGELSMA montre d'une part que la lumière bleue induit la biosynthèse de composés phénoliques dans des hypocotyles de Cucumis sativus et d'autre part que cette biosynthèse dépend du temps d'exposition et de la quantité d'énergie lumineuse. En outre, la lumière rouge, rouge lointain ou bleue inhibe la croissance des hypocotyles de Cucumis sativus. L'étude de la cinétique d'inhibition montre que la lumière bleue agit avec un temps de latence beaucoup plus court que celui obtenu avec la lumière rouge ou rouge lointain (MEIJER, 1968). A partir de ces éléments, les auteurs suggèrent que la lumière bleue est active par l'intermédiaire d'un pigment autre que le phytochrome. Les caroténoïdes et les flavines sont des composés pouvant intervenir dans ce type de photoréaction. Toutefois, la nature des photorécepteurs autres que le phytochrome n'est pas clairement élucidée.

b) Exemple en faveur de l'intervention du phytochrome

En 1968, Mc LURE montre que les effets de la lumière bleue sur la biosynthèse des anthocyanines chez Spirodela intermedia, s'expliquent par l'établissement d'un état photo-stationnaire intermédiaire entre ceux déterminés par les radiations rouge et rouge lointain. Cependant, l'intensité de la réponse est toujours fonction de la quantité d'énergie lumineuse

E) EXTRACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES.

1) Généralités

Les premières expériences réalisées sur les anthocyanes datent de 1664 quand BOYLE (selon ARTHUR, 1936) note qu'un extrait d'anthocyanes, de couleur bleue, vire au rouge lorsqu'on ajoute de l'acide au milieu d'extraction.

Divers procédés d'extractions ont été décrits dans les ouvrages de SANNIE et SAUVAIN (1952), GEISSMAN (1955) et SESHADRI (1962). Le but de ces extractions est d'isoler un produit pur à l'état cristallisé ou non. En fait ces méthodes d'extractions sont difficiles à appliquer à l'analyse d'un mélange complexe renfermant de nombreux composés phénoliques.

Avec le développement des techniques de chromatographies sur papier, sur colonne ou en phase gazeuse et l'utilisation de la spectroscopie, il n'est plus nécessaire pour isoler, doser et identifier les composés phénoliques d'en extraire une quantité importante.

En 1948, BATE SMITH fait la première mise au point moderne d'une méthode analytique des anthocyanes. Par la suite, l'extraction et le dosage des anthocyanidines et des anthocyanines ont fait l'objet de nombreux travaux et de mises au point (BATE SMITH, 1954 ; BLANK, 1958 ; RIBEREAU GAYON, 1959, 1963, 1968 ; BILLOT, 1969 ; DEUBERT, 1978 ; NAKATANI et Coll., 1979).

2) Extraction des anthocyanes en milieu acide

Les anthocyanidines sont des dérivés du phényl-2-benzo-

pyrylium ou flavylum. Le cation pyrylium (Figure 4) est un ion oxonium dont la stabilité est assurée par la présence de doubles liaisons conjuguées dans le cycle pyrylium.

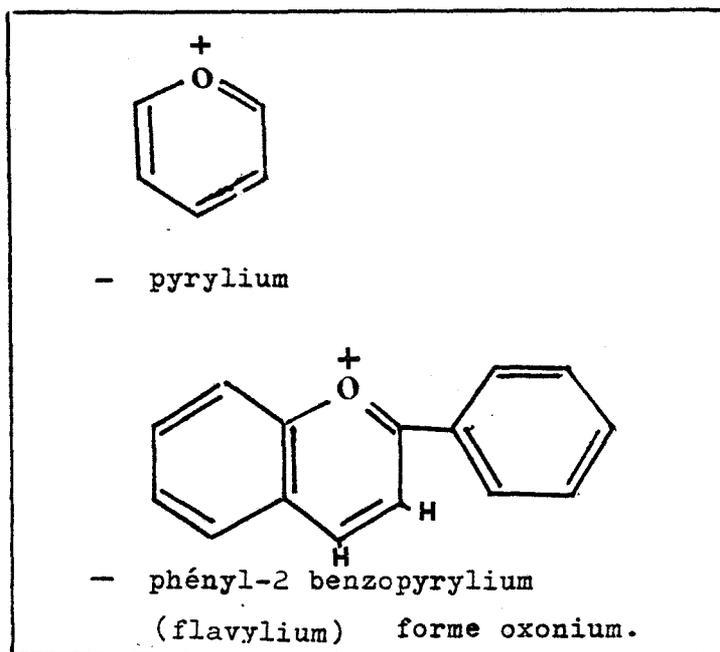


Figure 4 : Structure des cations pyrylium et flavylum

(d'après RIBEREAU-GAYON, 1968).

././././././././././.

L'obtention de chlorures lors de l'extraction des anthocyanes en milieu acide (méthanol, éthanol ou eau à 0,1 % d'HCl) est donc due au caractère cationique des anthocyanidines. En outre, la couleur des anthocyanines et des anthocyanidines en solution acide, est déjà un critère de reconnaissance de leur identité biochimique (HAYASHI, 1962). De plus le milieu acide limite les phénomènes d'oxydation des polyphénols (FOURY et AUBERT, 1977).

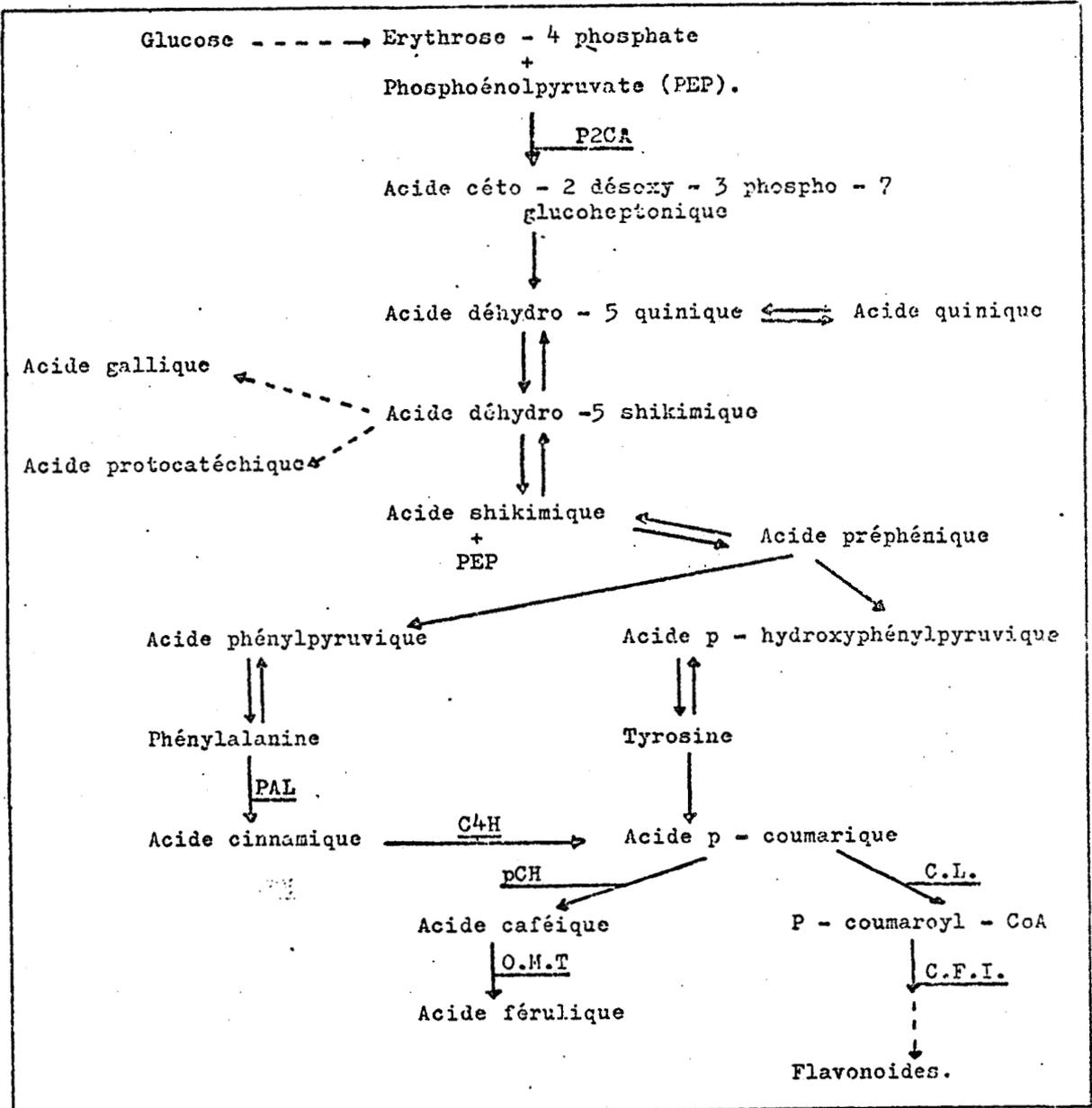


Figure 5 : Formation des composés phénoliques à partir des glucides par l'intermédiaire de l'acide shikimique (d'après RIBEREAU-GAYON, 1968 et RANJEVA 1978)

- P2CA Phospho - 2 - céto - 3 - deoxy-heptonate aldolase.
- PAL Phénylalanine-ammoniac-lyase.
- C4H Acide cinnamique - 4 - hydrolase.
- pCH Acide p-coumarique - 3 - hydrolase.
- O.M.T S- adénosyl méthionine : caféoyl : O-méthyltransférase.
- C.L " Cinnamate : Coenzyme A-ligase"
- C.F.I Chalcone - flavanone - isomérase.

RHS
LILLE

F) ANALYSE ET BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES

1) Formation des composés phénoliques à partir des glucides

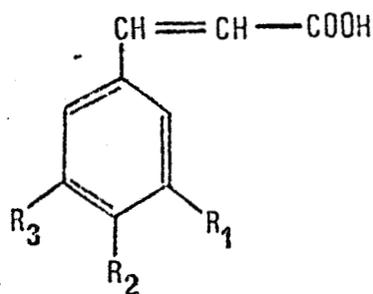
Les végétaux supérieurs renferment en abondance des composés phénoliques (substances qui comportent dans leurs molécules un à plusieurs cycles aromatiques mono ou polyhydroxylés). Les composés phénoliques les plus importants quantitativement, sont issus du métabolisme primaire par désamination enzymatique de la phénylalanine (KOUKOL et CONN, 1961). La phénylalanine provient de l'acide shikimique issu lui même du métabolisme des glucides (Figure 5).

L'acide cinnamique initialement formé, se trouve à l'origine des acides phénols en C_6-C_3 qui occupent une position intermédiaire dans la séquence menant aux différents termes de la série cinnamique (NEISH, 1960) et qui interviennent dans la synthèse de molécules plus complexes tels les esters d'acide organique ou de sucre, les flavonoïdes en $C_6-C_3-C_6$ et les lignines. Par la connaissance de quinze grandes familles de composés phénoliques présentant des différences dans l'arrangement des éléments constitutifs, nous ne rappèlerons ici que les caractéristiques structurales de diverses familles (Figure 6) très largement décrites dans des ouvrages spécialisés (RIBEREAU-GAYON, 1968 ; SARKANEN et LUDWIG, 1971 ; HARBORNE et Coll., 1975).

2) Formation des flavonoïdes

La structure chimique des flavonoïdes ($C_6-C_3-C_6$) comporte deux cycles benzéniques (Figure 6) ; le premier (noyau A)

Acides cinnamiques C_6-C_3 ou $C_6-CH=CH-COOH$ (unités de base)



- $R_1=R_2=R_3=H$ ————— Acide cinnamique
- $R_1=R_3=H, R_2=OH$ ————— Acide p-coumarique
- $R_1=R_2=OH, R_3=H$ ————— Acide caféique
- $R_1=OCH_3, R_2=OH, R_3=H$ — Acide férulique
- $R_1=R_3=OCH, R_2=OH$ ————— Acide sinapique

$C_6-CH=CH-CO-O-R$ Esters

R est un acide organique : "ester d'acide organique" - Fig A .

R est un sucre : "ester de glucide" - Fig B .

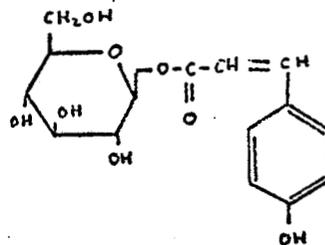
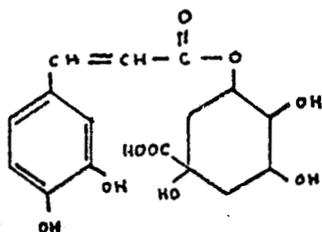


Fig A - Acide 3-caféoyl-quinique / Fig B - p-coumaroyl-1-glucose

Flavonoïdes $C_6-C_3-C_6$ (au sens large).

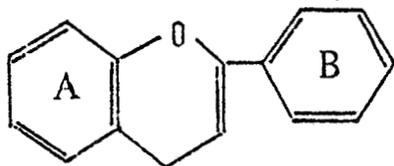


Figure 6 : Structure générale des principaux dérivés hydroxycinnamiques.

provient de la condensation de trois unités malonyl-CoA, le second (noyau B) d'un para-coumaroyl CoA (KREUZALER et HAHBROCH, 1972).

Les modifications dans le détail du squelette en C₁₅ (position des hydroxyles, méthylation etc...) conduisent au cent cinquante aglycones actuellement répertoriés (ROBINSON, 1975). Les anthocyanes comme les autres flavonoïdes (flavonols, flavones etc...) n'existent pas dans la nature sous forme d'aglycones, mais sous forme d'hétérosides. Les aglycones forment des liaisons glycosidiques avec différents sucres : glucose, rhamnose et divers di ou tri-holosides.

3) Structure de la rubrobrassicine

La rubrobrassicine est une anthocyanine des tissus de feuilles de chou rouge. Sa structure moléculaire a été caractérisée par HARBORNE en 1964. C'est une cyanidine 3,5 di-glucoside qui présente la particularité d'être acylée (Figure 7).

HARBORNE montre que les groupements acylés (acide paracoumarique ou acide férulique) sont toujours estérifiés sur un hydroxyle d'une molécule glucidique; cette dernière étant fixée en position 3 de l'aglycone. Si le sucre est un di-holoside, un résidu acylé peut être fixé sur chaque molécule constituant le di-holoside.

Par l'utilisation de la spectroscopie et de diverses méthodes d'analyses par chromatographie, HARBORNE élucide trois structures pour la rubrobrassicine.

Ces trois molécules sont composées chacune d'une molécule de glucose et d'une molécule de sophorose (glucose β 1-2 glucose) réparties respectivement en position 5 et 3 de l'aglycone. Seuls le nombre et la nature des groupements acylés estérifiés sur un ou deux OH de la molécule de sophorose, permet de différencier les trois anthocyanines. La rubrobrassicine - A - comporte un résidu d'acide para-coumarique ; la rubrobrassicine - B -, un résidu d'acide férulique ; la rubrobrassicine - C -, deux résidus d'acide férulique (Figure 7).

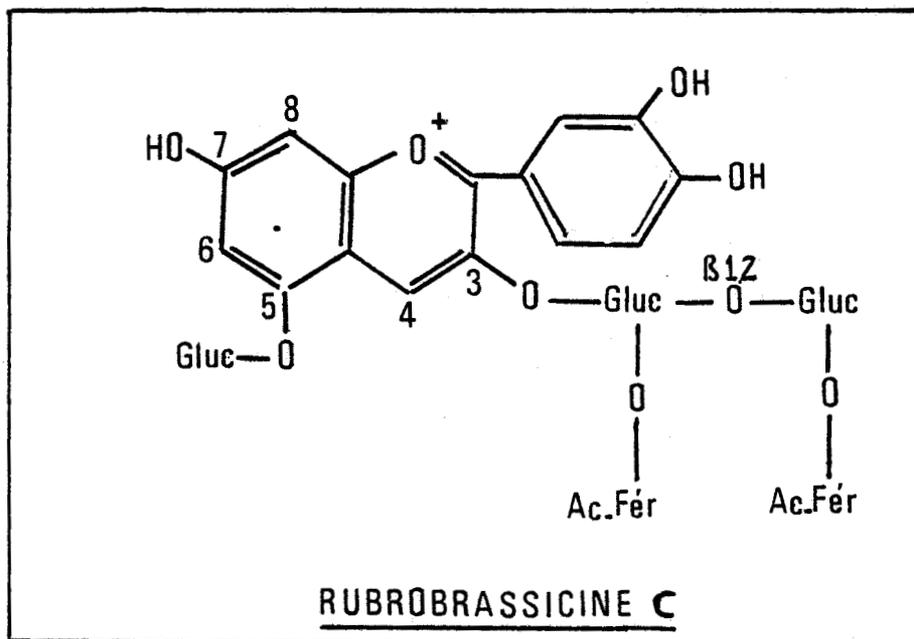


Figure 7 : - Structure de la rubrobrassicine - C -
d'après HARBORNE (1964).

- Ac. Fér : acide férulique.

- Gluc : glucose.

G) UTILISATION DE LA SPECTROSCOPIE RAMAN ET APPLICATIONS A LA BIOLOGIE.

Un spectromètre Raman réalisé par DELHAYE et DHAMELINCOURT (1975), permet d'effectuer une microanalyse des échantillons dans un mélange hétérogène, à l'air libre ou sous atmosphère contrôlée et offre la possibilité d'identifier, de manière non destructive, tout édifice polyatomique à partir de son spectre de vibration. On peut ainsi obtenir le spectre Raman d'un composé de quelques microns carrés à quelques dizaines de microns carrés de surface.

La microanalyse in situ de la matière, sans préparation spéciale de l'échantillon, à l'aide de la microsonde MOLE à effet Raman apporte des informations uniques sur la structure et la nature des édifices moléculaires situés dans l'échantillon. En général, les applications de la MOLE à la biologie sont limitées à la caractérisation de substances localisées à concentration élevée (BALLAN DUFRANCAIS et Coll., 1979 ; LARGEAU et Coll., 1980 ; DHAMELINCOURT ,1980), car la spectrométrie Raman n'est pas une méthode très sensible quand on utilise une radiation excitatrice incluse dans une fenêtre de transmission de l'échantillon. Si la fréquence excitatrice se situe au voisinage d'une bande d'absorption électronique de la molécule étudiée, une forte exaltation de certaines raies du spectre est observée. Ce phénomène appelé effet Raman de résonance permet l'obtention de spectres Raman de composés à très faible concentration, inclus dans un milieu complexe dont les molécules ne sont pas résonantes.

	MURASHIGE et	
<u>MACRO-ELEMENTS</u>	SKOOG	MARGARA
KNO ₃	1900	1313
NH ₄ NO ₃	1650	480
Ca(NO ₃) ₂ , 4 H ₂ O ..	-	590
Mg SO ₄ , 7 H ₂ O	370	246
Ca Cl ₂ , 2 H ₂ O	440	-
KH ₂ PO ₄	170	136
KCl	-	74,5
<u>OLIGOELEMENTS</u>		NITSCH et NITSCH
Fe SO ₄ , 7 H ₂ O	29,8	27,8
Na ₂ EDTA	37,3	37,3
Mn SO ₄ , 4 H ₂ O	22,3	25
Zn SO ₄ , 7 H ₂ O	8,606	10
Cu SO ₄ , 5 H ₂ O	0,075	0,025
H ₃ BO ₃	6,2	10
Na ₂ Mo ₄ , 2 H ₂ O	0,25	0,25
Co Cl ₂ , 6 H ₂ O	0,025	-
KI	0,83	-
<u>VITAMINES</u>		
Glycocolle	2	2
Acide nicotinique.	0,5	5
Pyridoxine HCl	0,5	0,5
Thiamine	0,5	0,5
Acide folique	-	0,5
Biotine	-	0,05

Tableau 1 : - Composition des solutions nutritives ayant servi de base aux différents milieux de culture.
(les valeurs sont données en mg.l⁻¹).



MATERIEL et TECHNIQUES

A) LE MATERIEL BIOLOGIQUE

Le matériel biologique utilisé, est une colonie tissulaire friable, isolée à partir de fragments de feuilles de chou-rouge (*Brassica oleracea* var. tête de nègre), cultivés in vitro.

B) LA CULTURE IN VITRO DES TISSUS DE FEUILLES DE CHOU ROUGE

1) Préparation du matériel

Les feuilles de chou rouge sont séparées une à une et les nervures principales sont obturées à la paraffine. Les feuilles ainsi préparées sont trempées dans une solution mouillante de Teepol à 2 % en solution aqueuse pendant cinq minutes.

La stérilisation est réalisée par trempage des feuilles dans une solution obtenue après filtration d'un mélange d'hypochlorite de calcium à 7 % dans l'eau (degré chlorométrique - 115 120) pendant dix minutes. Les feuilles sont ensuite rincées trois fois à l'eau stérile.

2) Milieux de culture

Les cultures in vitro de fragments de feuilles ont été réalisées sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) et sur le milieu composé des macro-éléments de la solution de MARGARA (1977) et des oligoéléments et des vitamines de la solution de NITSCH et NITSCH (1965) (Tableau 1). A chacune de ces solutions nous avons ajouté du myoinositol (100 mg.l^{-1}), de la L⁺ glutamine (100 mg.l^{-1}) et de l'hydrolysate de caséine (500 mg.l^{-1}). Les

régulateurs de croissance sont l'ANA ($5 \cdot 10^{-6}$ g.ml⁻¹) et la 6 BAP (10^{-5} g.ml⁻¹). Les milieux sont additionnés de saccharose (30 g.l⁻¹)

Le pH des milieux est ajusté à 5,5 avant l'addition d'agar (8 g.l⁻¹). Les milieux sont répartis dans des tubes (Ø 24 mm X long 160 mm) qui sont ensuite bouchés à l'aide de capuchons en matière plastique. Ils sont stérilisés à l'autoclave pendant vingt minutes à la température de 120°C.

3) Conditions de culture

Chaque tube contient environ 20 ml de solution nutritive. Après ensemencement, le capuchon en matière plastique est rendu solidaire du tube par une bande de "parafilm" afin d'éviter une évaporation trop intense. Les cultures sont placées dans une pièce climatisée (26°C le jour et 22°C la nuit) et éclairées douze heures par jour. En plus de la lumière du jour, les cultures reçoivent un éclairage d'appoint fourni par des tubes fluorescents (environ 8000 Erg.cm⁻².s⁻¹).

4) Prélèvement des explantats

Le chou rouge possède des feuilles régulièrement imbriquées, se recouvrant par verticilles de trois. Cette disposition permet de prélever les feuilles une à une suivant leur ordre d'insertion sur la tige et de les classer en trois lots :

- feuilles externes
 - feuilles moyennes
 - feuilles internes
- } → avec anthocyanes
- sans anthocyanes

Pour cette étude, nous avons utilisé les feuilles moyennes qui constituent la "pomme" du chou.

Les explantats sont prélevés à l'aide d'un trocard (1 cm \varnothing) dans la région basale, médiane ou apicale des feuilles au niveau de la nervure principale et du limbe avec ou sans nervure secondaire.

5) Le mode d'ensemencement

Les explantats peuvent être ensemencés horizontalement, c'est à dire avec la face ventrale ou dorsale, au contact du milieu de culture. Les fragments de feuilles peuvent également être ensemencés dans le milieu de culture, soit par leur partie basale (ensemencement en sens normal), soit par leur partie apicale (ensemencement en sens inverse).

6) Evaluation de la croissance

La croissance d'un explantat peut être suivie par l'augmentation de sa masse de matière fraîche et de matière sèche. Les explantats sont extraits des tubes, essuyés afin d'éliminer tout le milieu gélosé pouvant adhérer à leur surface, puis pesés de façon à déterminer les poids de matière fraîche. Les poids de matière sèche sont déterminés après passage des explantats à l'étuve à 100°C pendant 48 heures .

C) ENTRETIEN DES COLONIES TISSULAIRES ET CONDITIONS DE CULTURE

1) Entretien des colonies tissulaires

L'entretien des colonies tissulaires qui élaborent des anthocyanines, est réalisé sur milieu gélosé (8 g.l⁻¹ d'agar) additionné des macro-éléments de la solution de MARGARA, des oligoéléments et des vitamines de la solution de NITSCH et NITSCH (Tableau 1), de L⁺glutamine (50 mg.l⁻¹), d'hydrolysate de caséine

(150 mg.l^{-1}), de régulateurs de croissance ($\text{ANA-}10^{-6} \text{ g.ml}^{-1}$ et $6 \text{ BAP-}5.10^{-6} \text{ g.ml}^{-1}$) et de sucre (saccharose 30 g.l^{-1} ou glucose 40 g.l^{-1}). Ce milieu constitue le milieu de base.

2) Conditions de culture

Les explantats de 100 mg environ sont repiqués soit individuellement dans des tubes renfermant 20 ml de milieu, soit dans des boîtes de Pétri contenant 30 ml de milieu. Après ensemencement, les boîtes sont fermées à l'aide de bandes adhésives afin d'éviter une évaporation qui est plus importante que celle obtenue avec les cultures en tubes.

Les cultures en tubes sont placées face à la source lumineuse et à 5 centimètres de cette dernière. Les cultures en boîtes de Pétri sont placées à 5 centimètres sous les rampes lumineuses et perpendiculairement à ces dernières afin d'éviter les phénomènes de réflexion des rayons lumineux au niveau des couvercles des boîtes. Les cultures sont éclairées 18 heures par jour.

Les cultures sont placées dans des pièces thermorégulées automatiquement. La température utilisée est de 23°C , jour et nuit.

D) CARACTERISTIQUES DES SOURCES LUMINEUSES

L'énergie lumineuse est fournie par des tubes "Osram - 40 w 15 , lumière du jour" et la quantité d'énergie reçue par les colonies tissulaires est voisine de $19000 \text{ Erg.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$. L'énergie est mesurée à l'aide d'une thermopile "Philips DC micrometer PM 2436".

Pour l'entretien des colonies tissulaires, et dans la suite de nos

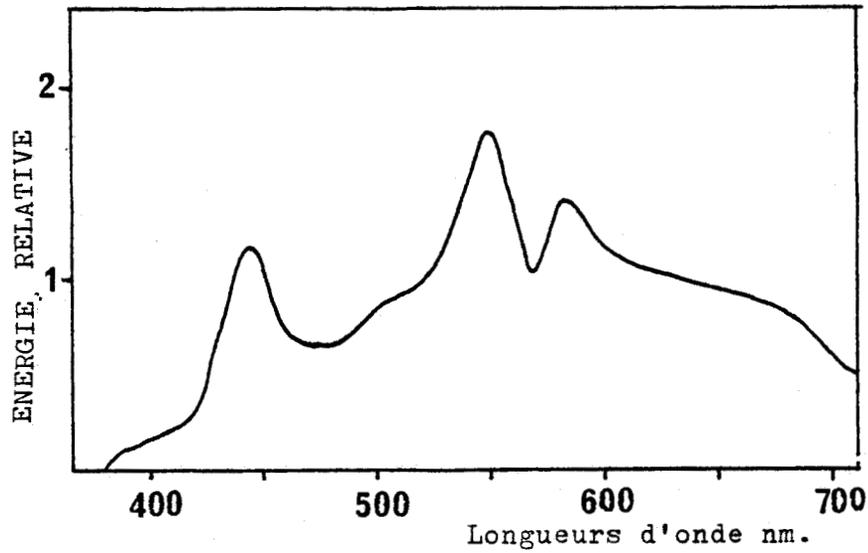


FIGURE 8 : - Répartition spectrale des tubes " Osram - 40 W 15 ,
lumière du jour (DUBOIS, 1980).

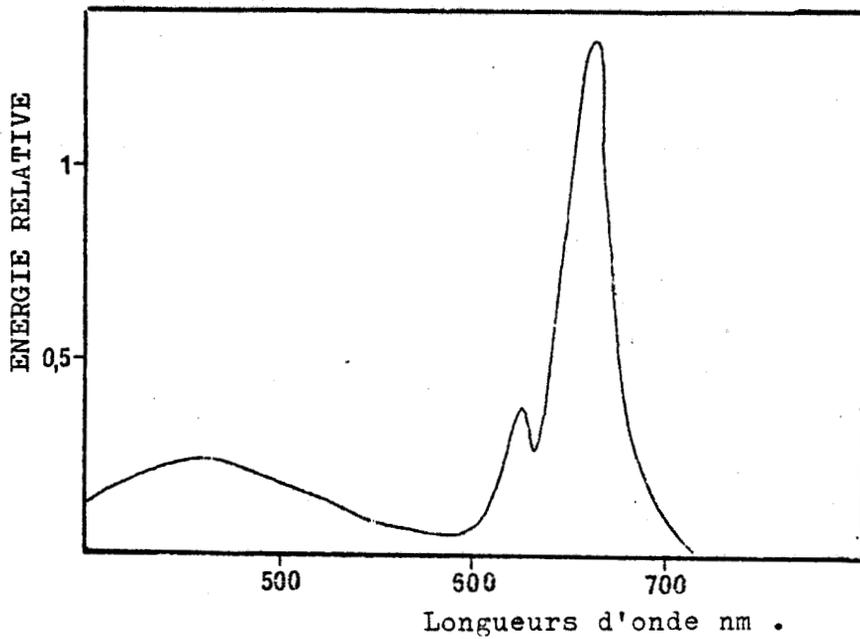


FIGURE 9 : - Répartition spectrale des tubes " Sylvania - 40 W,
gro-lux (document Sylvania France).

expériences, nous avons utilisé ce type de source lumineuse dont la répartition spectrale s'étale de 400 à 700 nm (Figure 8). Nous avons également soumis les colonies tissulaires à l'action des lampes fluorescentes "Sylvania - 40 w, gro-lux". La répartition spectrale de ce genre de lampe, au plus fort pourcentage d'émission, se situe dans le bleu (λ de 430 à 490 nm) et le rouge (λ de 630 à 700 nm). (Figure 9). L'énergie lumineuse reçue par les colonies tissulaires, est de l'ordre de $16000 \text{ Erg.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Les caractéristiques des diverses lumières monochromatiques sont données dans le tableau ci-dessous :

LUMIERE	FILTRE	ENERGIE ($\text{Erg.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	LONGUEUR D'ONDE (nm)
BLEUE	ROHM et HAAS	4600	440
VERTE	ROHM et HAAS	1880	525
ROUGE	ROHM et HAAS	25000	665
ROUGE LOINTAIN	INTERVEX I interférenciel	12000	729

Tableau 2 : - Caractéristiques des lumières monochromatiques. Les quantités d'énergie lumineuse sont mesurées contre les filtres.

E) EXTRACTION ET PURIFICATION DES ANTHOCYANINES

1) Extraction totale

Les extractions sont réalisées en présence de méthanol à froid (5°C) exempt de trace d'acétone, et renferment 0,1 % d'acide chlorhydrique. Les colonies tissulaires sont retirées des tubes ou des boîtes de Pétri, puis essuyées soigneusement de façon à enlever le milieu gélosé pouvant adhérer aux cellules.

Après détermination des poids de matière fraîche, les colonies tissulaires sont mises à macérer dans le solvant pendant 48 heures et à basse température (BILLOT, 1965).

Pour obtenir une extraction totale, les cellules sont séparées de la solution rouge obtenue et broyées en présence de quelques millilitres de solvant. L'extraction est ainsi totale.

Les extraits réunis sont filtrés puis centrifugés (10000 t.mn⁻¹ pendant 15 minutes).

2) Purification des extraits totaux

Suivant les conditions de culture, les colonies tissulaires contiennent plus ou moins d'eau. Après le broyage des colonies, la libération d'eau dans les extraits entraîne une dilution, donc une erreur possible au niveau du dosage spectrophotométrique. Dans le but d'éliminer l'eau et d'isoler les anthocyanines, les extraits totaux sont traités à l'acétate de plomb (500 mg pour 50 ml d'extrait brut).

Les anthocyanines donnent un précipité bleu-vert. Après centrifugation (5000 t.mn^{-1} pendant 15 minutes), le surnageant est éliminé, le culot de centrifugation séché puis repris par un volume de méthanol à 0,1 % d'acide chlorhydrique de façon à ce que le rapport $\frac{V \cdot \text{ml d'extrait}}{P \cdot \text{grammes de colonies}}$ soit égal à 10.

Une seconde centrifugation est nécessaire pour éliminer le précipité blanc de chlorure de plomb.

Cette méthode rapide de purification, n'altère pas les anthocyanines et n'occasionne pas de déplacement du maximum d'absorption.

F) MESURES SPECTROPHOTOMETRIQUES

Les mesures de densité optique sont réalisées sur les extraits totaux et les extraits purifiés (spectrophotomètre LERES S 67 Schneider - cuve en quartz 10 mm. QS 82). Pour les extraits totaux, les densités optiques sont mesurées en fonction des différentes longueurs d'onde, des UV à 700 nm. Pour les dosages des anthocyanines (extraits purifiés), les densités optiques sont mesurées à 527 nm.

Les mesures spectrophotométriques à 527 nm; sont réalisées à température ambiante, aussitôt après les extractions

G) EXPRESSION DES RESULTATS

Pour chaque expérience, les poids de matière fraîche et les poids de matière sèche ainsi que les densités optiques sont

déterminés à partir du troisième passage.

Après chacun des trois passages suivants, les poids moyens de matière fraîche et de matière sèche, sont établis à partir de douze colonies tissulaires. Les résultats finaux sont calculés en faisant la moyenne des valeurs obtenues après chacun des trois passages.

Les anthocyanines sont dosées après chaque passage. Elles sont extraites à partir des colonies tissulaires utilisées pour la détermination du poids moyen de matière fraîche. La densité optique moyenne est obtenue à partir de trois dosages spectrophotométriques à 527 nm.

Pour établir les valeurs témoins de poids moyens de matière fraîche et de matière sèche ainsi que les valeurs témoins de densité optique, nous avons pris en considération les résultats obtenus quand les colonies tissulaires ont proliféré en boîte de Pétri sur le milieu de base additionné d'ANA (10^{-6} g.ml⁻¹), de 6 BAP ($5 \cdot 10^{-6}$ g.ml⁻¹), de L⁺ glutamine (50 mg.l⁻¹), d'hydrolysate de caséine (150 mg.l⁻¹) et de saccharose (30 g.l⁻¹) ou de glucose (40 g.l⁻¹).

Les densités optiques obtenues après dosages des anthocyanines contenues dans les colonies tissulaires, pourront être également comparées à la densité optique d'un extrait de feuille de chou rouge. Les extractions sont réalisées de façon à ce que le rapport V.ml de solvant / P.grammes de matière fraîche - soit égal à 10. Les densités optiques des extraits purifiés sont mesurées à 527 nm. La densité optique moyenne obtenue est de 6,8.

H) DOSAGES DES NITRATES

Les nitrates ont été dosés dans le milieu gélosé par une méthode qui repose sur la réduction quantitative des nitrates en nitrites (YOUNG, 1973); ces derniers sont dosables par colorimétrie à 540 nm après développement d'une couleur rouge en présence des réactifs composés de : 0,2 % de sulfanilamide pour 100 ml d'acide chlorhydrique 6 N (réactif I) et 582 mg de N-1 naphtyéthylène-diamine-dihydrochloride pour 100 ml d'eau distillée (réactif II).

Protocole

On établit une courbe étalon. A cet effet on introduit successivement dans une série de tubes :

Tubes	I	II	III	IV	V	VI
ml solution mère à 0,1 $\mu\text{l} \cdot \text{ml}^{-1}$ de nitrate de Na	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
H ₂ O (ml)	2	1,8	1,6	1,4	1,2	1
Réactif I (ml)	1	1	1	1	1	1
Réactif II (ml)	1	1	1	1	1	1
Equivalent NO_3^-	0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1

Après avoir prélevé les colonies tissulaires des boîtes de Pétri, on recueille les milieux gélosés qui sont placés dans des tubes et mis au bain-marie. Après dilution, 1 ml de chaque échantillon est prélevé. A chaque fraction on ajoute 2 ml de NH_4OH 2,2 N et environ 30 mg de poudre de zinc. Les tubes sont vigoureusement agités pendant trois minutes.

Le zinc est éliminé par filtration et des fractions de 1 ml ou 0,5 ml sont prélevées pour déterminer la quantité de nitrites. Les réactifs I et II et de l'eau distillée sont ajoutés pour obtenir un volume final de 4 ml.

Avant tout dosage, il est vérifié initialement s'il y a ou non présence de nitrites dans le milieu de culture.

I) IDENTIFICATION DES ANTHOCYANINES.

1) Extraction totale.

Les colonies tissulaires sont ôtées des boîtes de Pétri et débarrassées du milieu gélosé adhérent à leur surface. Des feuilles de chou rouge constituant le matériel témoin, sont soigneusement lavées avant l'extraction.

Après dilacération de ces deux échantillons, une première extraction est réalisée à l'éther de pétrole, solvant non polaire qui permet d'éliminer les "graisses", les chlorophylles etc Cependant, cette extraction ne doit être trop poussée afin de ne pas entraîner les flavonoïdes (RIBEREAU-GAYON, 1968). L'éther de pétrole est ensuite éliminé et les tissus sont séchés entre deux feuilles de papier filtre. Vingt grammes de colonies tissulaires ou dix grammes de feuille de chou rouge sont broyés dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 0,1 %. Les tissus broyés sont épuisés à plusieurs reprises avec quelques millilitres de solvant de façon à ce que les extractions soient totales.

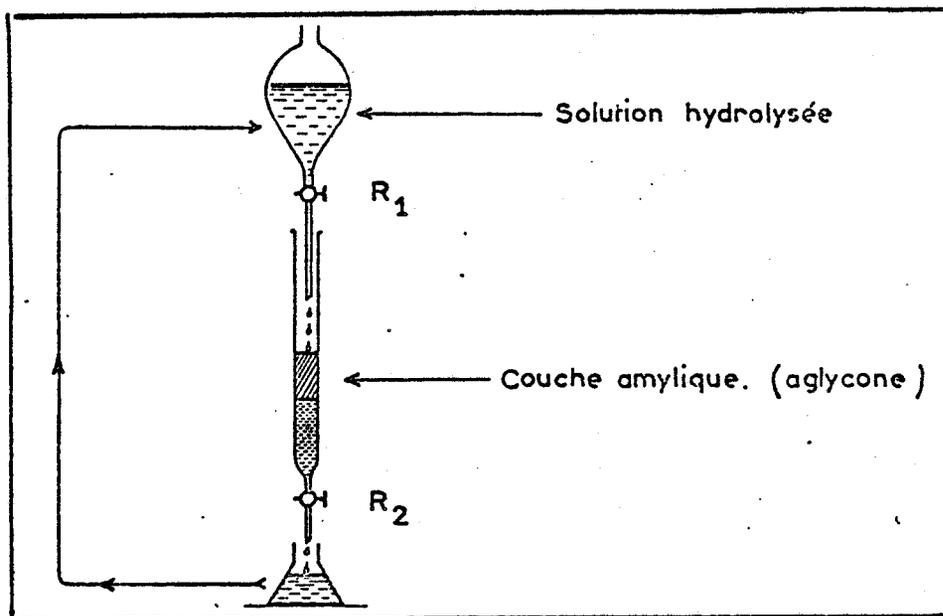


Figure 10 : Dispositif utilisé pour l'extraction de l'aglycone après hydrolyse acide des anthocyanes

2) Purification des extraits.

Les extraits totaux sont filtrés puis centrifugés (10000 tours. mn^{-1} pendant 30 minutes). Les extraits aqueux sont ensuite agités en présence d'un égal volume d'éther éthylique. Après séparation des deux phases, la phase aqueuse contenant les anthocyanines est séparée de la phase organique. Cette opération est renouvelée trois fois. Les volumes finaux des extraits aqueux purifiés sont évaporés sous vide. La densité optique de chaque extrait est ensuite ajustée à 2.

3) Hydrolyse acide.

Pour libérer les aglycones, il faut rompre les liaisons $-\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}-\text{O}-\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}-$ contractées avec les sucres ou les hétérosides. Une hydrolyse acide de la phase aqueuse est conduite en milieu HCl 2N pendant 30 minutes au bain marie à 100° C.

L'extraction des aglycones est effectuée avec un solvant non miscible : l'alcool isoamylique, en utilisant le dispositif de la figure 10 . La phase organique retient les aglycones et se colore en rouge foncé.

4) Oxydation à l'eau oxygénée.

Cette méthode a permis à HARBORNE (1964) d'isoler des glucides acylés et de montrer que ces derniers sont fixés en position 3 de l'aglycone.

Avant de procéder à l'oxydation à l'eau oxygénée, les anthocyanines des feuilles de chou rouge et des colonies tissulaires sont extraites dans de l'eau. Les extraits purifiés sont

ensuite évaporés sous vide. Cinq milligrammes de chaque extrait sont prélevés et dissous dans un millilitre de méthanol. L'oxydation est réalisée en ajoutant 200 μ l d'eau oxygénée à 30 % à chaque solution. Les solutions ainsi obtenues sont maintenues 4 heures à température ambiante. L'excès d'eau oxygénée est éliminé en ajoutant quelques milligrammes de poudre de palladium. On ajoute ensuite 250 μ l de NH_4OH ($d = 0,88$) et 24 heures après, on chauffe les solutions au bain marie pour chasser l'excès d'ammoniaque. Les solutions obtenues sont utilisées directement pour l'identification en chromatographie.

5) Chromatographies

Pour les séparations, nous avons utilisé la technique de chromatographie descendante sur papier Whatman n° 1. Suivant la nature des extraits nous avons employé différents solvants.

La séparation des anthocyanines est obtenue en utilisant le butanol acétique (BAW : butanol - 1 -, acide acétique, eau : 4 : 1 : 5 V/V) ou le butanol HCl 2 N (1 : 1 V/V), comme solvants.

Pour l'identification de l'aglycone, nous avons utilisé le BAW et le Forestal (acide acétique, eau , acide chlorhydrique concentré - 300 / 100 / 30).

Les produits obtenus après oxydation à l'eau oxygénée des anthocyanines, sont chromatographiés avec le BAW ou le phénol saturé d'eau.

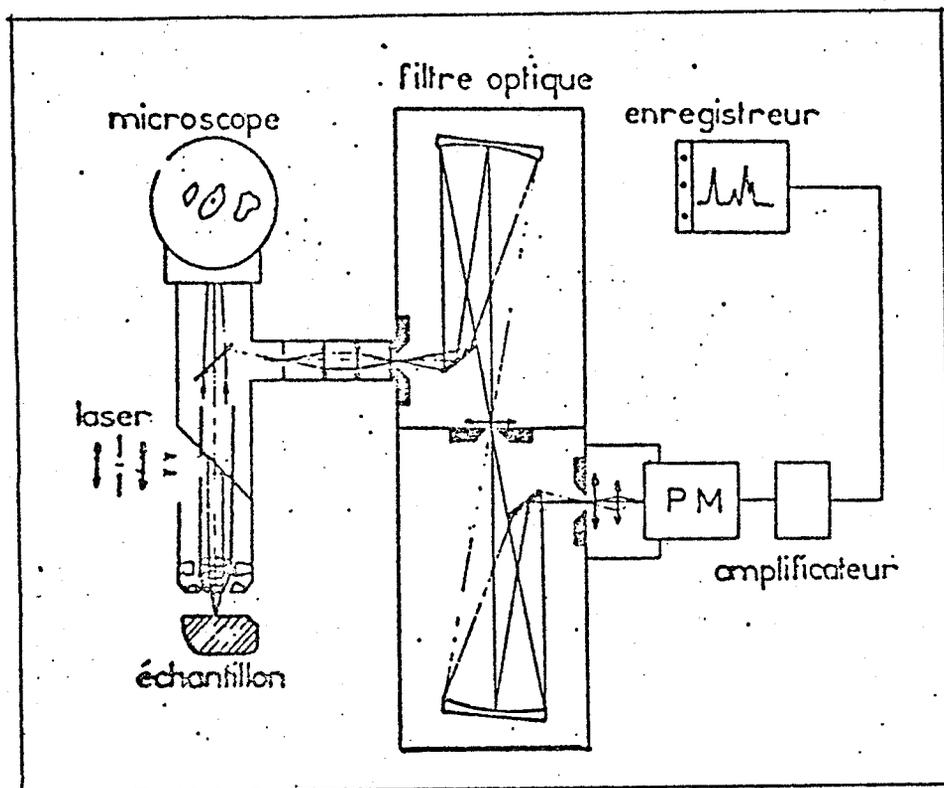


Figure : 11 - Schéma simplifié du mode de fonctionnement de la microsonde MOLE .

J) UTILISATION DE LA MICROSONDE MOLE A EFFET RAMAN

Pour cette étude, nous avons utilisé le spectromètre réalisé par DELHAYE et DHAMELIN COURT et commercialisé par la société I.S.A. JOBIN-YVON.

L'excitation in situ des molécules sans préparation spéciale de l'échantillon est obtenue par focalisation d'un faisceau laser sur une cellule par l'intermédiaire d'un microscope optique classique. L'objectif du microscope sert d'une part à focaliser le faisceau laser en un point précis de l'échantillon et d'autre part à recueillir la lumière rétro-diffusée par effet Raman. Le point d'impact du faisceau laser est de un micron carré environ. Le système de détection est un photomultiplicateur relié à un amplificateur de courant continu (ou à un compteur de photons) couplé à un enregistreur à plume qui donne le spectre du composé présent dans l'échantillon au point d'impact du faisceau laser. Ce mode d'éclairement est dit ponctuel (Figure 11)

La radiation monochromatique émise par un laser (excitatrice) peut être focalisée sur un très petit volume de la cellule. L'analyse de la lumière diffusée par le volume irradié permet l'identification et la localisation des différents édifices polyatomiques présents dans ce volume. Cependant, il est possible de défocaliser le faisceau laser de façon à ce que son point d'impact sur l'échantillon soit plus large (de 10 à 100 microns de diamètre).

L'excitation in situ des anthocyanines et des caroténoïdes et les spectres Raman sont enregistrés sur la microsonde

MOLE à effet Raman, avec une excitatrice de longueur d'onde $\lambda = 488 \text{ nm}$ - d'un laser à argon ionisé "Spectra physic 164.C".

Pour cette étude, les cellules ayant accumulé des anthocyanines, sont prélevées au hasard à la surface des colonies tissulaires âgées de 7 ou 14 jours. Ces colonies tissulaires ont proliféré sur le milieu de base additionné de saccharose (30 g.l^{-1}), d'ANA ($10^{-6} \text{ g.ml}^{-1}$) et de 6 BAP ($5.10^{-6} \text{ g.ml}^{-1}$) et dans les conditions suivantes : température- 23°C , photopériode $18 : 6$, quantité d'énergie lumineuse - $19000 \text{ Erg.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Les essais préliminaires d'excitation in situ ont permis de constater que les anthocyanines fuient le faisceau laser lorsque celui-ci, focalisé en point précis de la cellule, provoque un effet thermique important. Pour effectuer les microanalyses in situ, il a été nécessaire d'élargir le point d'impact du faisceau laser de façon à minimiser l'énergie d'irradiation des anthocyanines sous l'excitatrice. La surface du point d'impact du faisceau laser est de vingt microns carrés.

Nous avons également réalisé des enregistrements de spectres Raman de la rubrobrassicine en solution aqueuse à pH 1. Pour cette analyse, les extractions sont réalisées à partir des cellules anthocyaniques situées à la surface des colonies tissulaires sur lesquelles nous avons au préalable prélevé des cellules pour effectuer les différentes microanalyses in situ avec la microsonde MOLE à effet Raman.

Les spectres témoins qui nous ont été procurés par MERLIN (1983) et STATOUA (1982), sont obtenus à partir de la malvidine

3,5 diglucoside en solution aqueuse à pH 1 et à pH 6 et de cyanine chlorid en solution aqueuse à pH 1.

Les spectres Raman des solutions ont été obtenus à l'aide d'un spectromètre triple monochromateur " DILOR RT 30 " .

RESULTATS et DISCUSSION

PREMIERE PARTIE

LA CULTURE IN VITRO DES TISSUS DE FEUILLES DE CHOU ROUGE

A) INFLUENCE DU LIEU DE PRELEVEMENT DES EXPLANTATS ET ROLE DES REGULATEURS DE CROISSANCE

En cultivant des fragments de feuilles sur milieu solide nous avons constaté que c'est le bord de l'explantat au contact du milieu qui prolifère pour donner une protubérance dure, compacte et généralement chlorophyllienne. Ces observations confirment les résultats obtenus par TOPONI (1963) en cultivant des fragments de feuilles de chou rouge (Brassica oleracea L. var Capitata L.).

En outre, comme TOPONI (1963) et VASSEUR (1978), nous observons que l'âge des feuilles et le lieu de prélèvement des explantats sont deux facteurs qui influent de façon importante sur la prolifération. De même, la nature des tissus joue un rôle prépondérant car ce sont les fragments renfermant des nervures secondaires prélevés dans la région basale des feuilles moyennes qui prolifèrent le mieux.

L'étude de l'action des régulateurs de croissance sur la prolifération des explantats repiqués en présence des éléments nutritifs de la solution de MURASHIGE et SKOOG et de saccharose (30 g.l^{-1}), nous montre que la 6 BAP et la kinétine associées

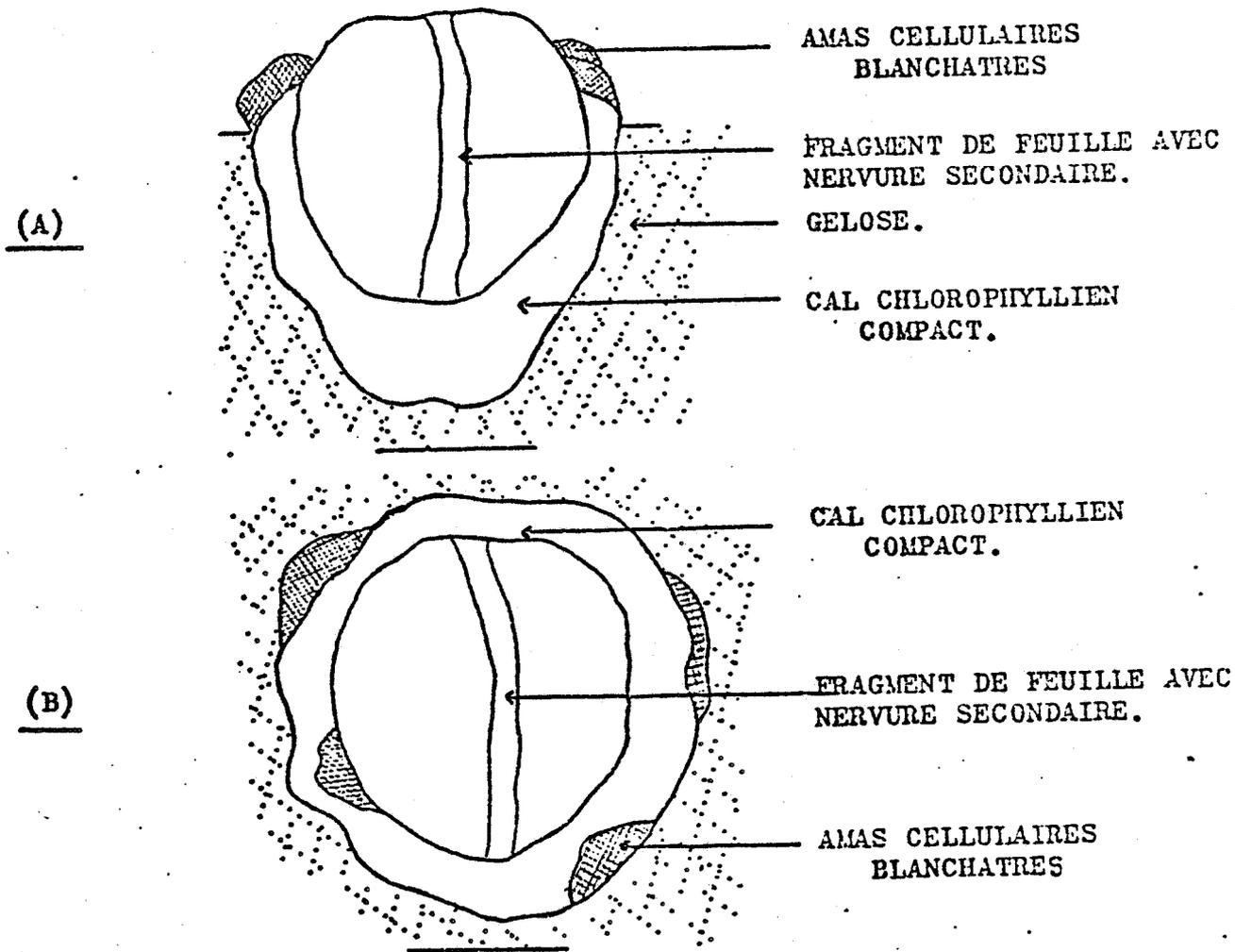


Figure 12 - Origine des amas cellulaires blanchâtres et friables sur des fragments foliaires mis en culture sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG additionné d'ANA ($5 \cdot 10^{-6}$ g.ml⁻¹), de 6 BAP (10^{-5} g.ml⁻¹) et de saccharose (30 g.l⁻¹).

- (A) - Explantatensemencé verticalement, enfoncé de moitié dans le milieu de culture.
- (B) - Explantatensemencé horizontalement sur le milieu de culture.

2,4 D ou à l'ANA favorisent la prolifération du cal. Conjugées à l'AIA ou à l'acide β naphthoxyacétique, les cytokinines diminuent ou inhibent la rhizogenèse, quand elles sont utilisées à fortes doses; la 6 BAP ayant une action inhibitrice plus grande que celle de la kinétine (MORINVILLE, 1979).

Quand les explantats sont repiqués en présence d'ANA ($5 \cdot 10^{-6}$ g.ml⁻¹) et de 6 BAP (10^{-5} g.ml⁻¹), nous constatons que les cals non rhizogènes, chlorophylliens, durs et compacts sont recouverts d'amas cellulaires beaucoup plus friables. Ces amas cellulaires sont toujours situés hors du milieu de culture (Figure 12).

Des résultats similaires sont obtenus en repiquant les fragments de feuilles en présence de macro-éléments de la solution de MARGARA, des oligoéléments et des vitamines de la solution de NITSCH et NITSCH et des mêmes doses de régulateurs de croissance et de sucre. Cependant, après quatre semaines de culture, les cals non rhizogènes durs et compacts sont moins noduleux et moins chlorophylliens. En outre, les amas cellulaires plus friables qui se développent sur les cals sont plus nombreux et sont parfois ponctués d'anthocyanines.

Les amas cellulaires repiqués sur les mêmes milieux, n'ont pu proliférer.

Les essais préliminaires concernant l'étude de l'influence de la concentration en saccharose sur la croissance des fragments de feuilles, nous ont procuré des résultats très variables quand les explantats sont repiqués verticalement de moitié dans le

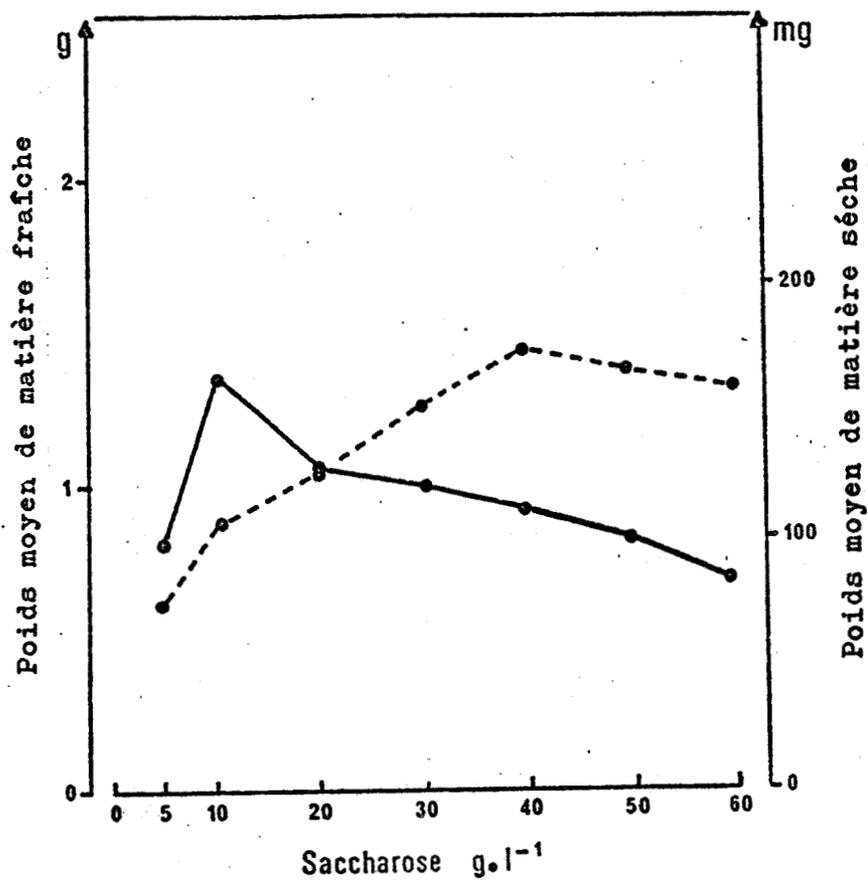


Figure 13 : - Influence de la concentration en saccharose sur la croissance des fragments de feuilles ensemencés horizontalement sur le milieu de culture.

- Poids moyen de matière fraîche.
- - ● Poids moyen de matière sèche.

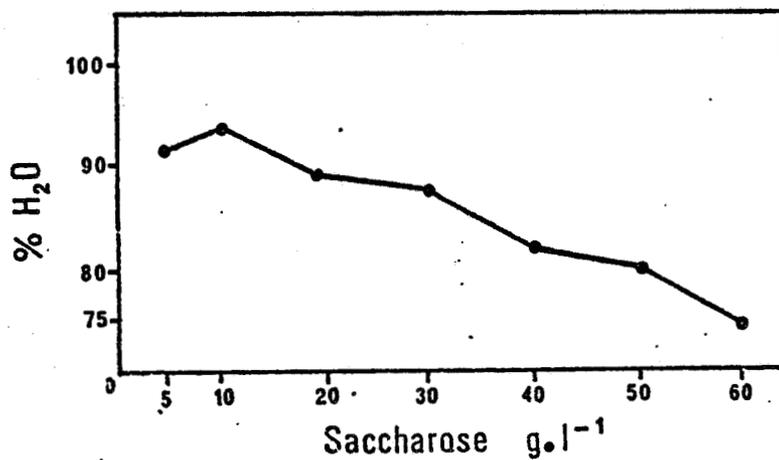


Figure 14 : - Pourcentage en eau par explantat en fonction de la concentration en saccharose.



milieu de culture. Par contre, si les fragments de feuilles sont ensemencés horizontalement à la surface du milieu gélosé, les résultats sont plus homogènes; c'est pourquoi nous avons choisi ce mode d'ensemencement.

B) INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SACCHAROSE SUR LA CROISSANCE DES FRAGMENTS DE FEUILLES.

Les fragments de feuilles sont ensemencés sur milieu gélosé additionné des macro-éléments de la solution de MARGARA, des oligoéléments et des vitamines de la solution de NITSCH et NITSCH, d'ANA ($5 \cdot 10^{-6}$ g.ml⁻¹), de 6 BAP (10^{-5} g.ml⁻¹) et de saccharose (de 0 à 60 g.l⁻¹).

Après quatre semaines de culture, nous avons évalué la croissance des explantats pour chaque condition.

Les explantats ne peuvent proliférer en l'absence de saccharose. Pour des concentrations faibles en sucre (5 et 10 g.l⁻¹), le poids moyen de substance fraîche augmente, alors qu'il diminue pour des concentrations supérieures. Le poids de substance sèche est d'autant plus élevé que la concentration en saccharose est forte (Figure 13).

La prolifération après quatre semaines de culture, est relativement faible. Les différences de poids sont surtout dues à une entrée ou une sortie d'eau (fortes doses de saccharose) des fragments de feuilles. Ce qui se confirme lorsqu'on examine la courbe traduisant le pourcentage d'eau des explantats (Figure 14).

Toutefois, il est intéressant de noter que c'est en présence de 10 grammes par litre de saccharose que nous avons un poids de matière fraîche et un pourcentage en eau optimal et que se développent le plus abondamment les amas cellulaires friables sur les calcs compacts et chlorophylliens.

Pour cette concentration en saccharose, les amas cellulaires sont dépourvus d'anthocyanines.

././././././.

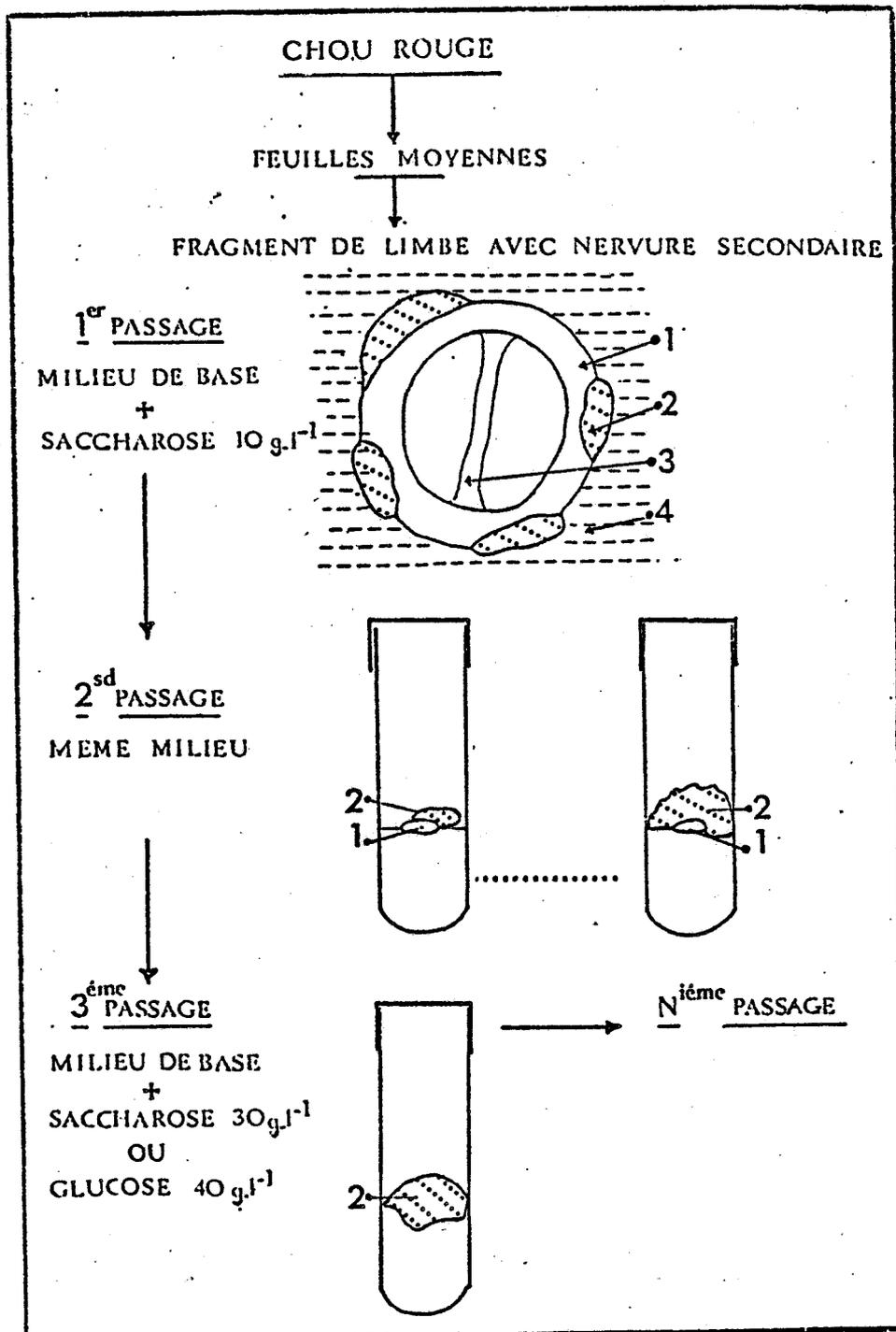


Figure 15: - Isolement d'une colonie tissulaire friable à partir d'un fragment de feuille de chou rouge cultivé in vitro.

- .1 - Cal chlorophyllien dur et compact.
- .2 - Amas cellulaires blanchâtres et friables.
- .3 - Fragment de limbe avec nervure secondaire.
- .4 - Milieu gélosé.



DEUXIEME PARTIE

ISOLEMENT DES COLONIES TISSULAIRES ET ETUDE DE LA CROISSANCE

A) ISOLEMENT DES COLONIES TISSULAIRES

Les calcs chlorophylliens présentant des amas cellulaires friables à leur surface quand les fragments de feuilles sont ensemencés sur le milieu de MARGARA et de NITSCH et NITSCH additionné de 6 BAP (10^{-5} g.ml⁻¹), d'ANA ($5 \cdot 10^{-6}$ g.ml⁻¹) et de saccharose (10 g.l⁻¹), sont découpés puis placés sur le même milieu. Après quelques jours de culture, nous constatons que seuls les amas cellulaires prolifèrent.

Nous avons séparé les amas cellulaires friables de la partie compacte et chlorophyllienne des calcs pour les repiquer sur le même milieu. Ces amas prolifèrent et après quinze jours, atteignent les parois du tube de culture - que le milieu soit additionné de glucose (10 ou 40 g.l⁻¹) ou de saccharose (10 ou 30 g.l⁻¹) (Figure 15).

B) ETUDE DE LA CROISSANCE DE COLONIES NON PRODUCTRICES D'ANTHOCYANES.

1) Action conjuguée de l'ANA et de la 6 BAP

L'étude préliminaire de la croissance des colonies tissulaires, nous permet de constater qu'elles se nécrosent quand il n'y a pas de régulateurs de croissance dans le milieu de culture. Par contre, la croissance est optimale en présence de $5 \cdot 10^{-6}$ g.ml⁻¹ de 6 BAP et 10^{-6} g.ml⁻¹ d'ANA.

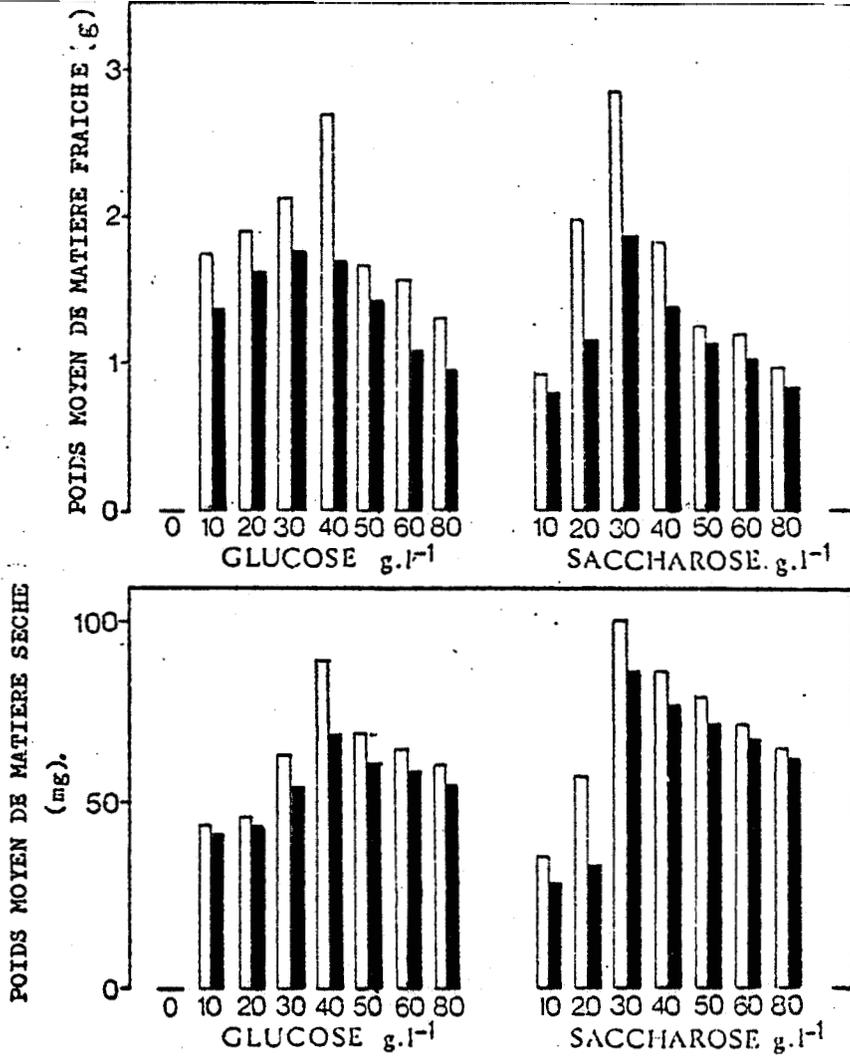


Figure 16 : - Influence de la concentration en glucose et en saccharose sur la croissance des colonies tissulaires mises en culture en tubes "pyrex".
 ☐ Colonies éclairées 18 heures par jour
 ■ Colonies placées à l'obscurité

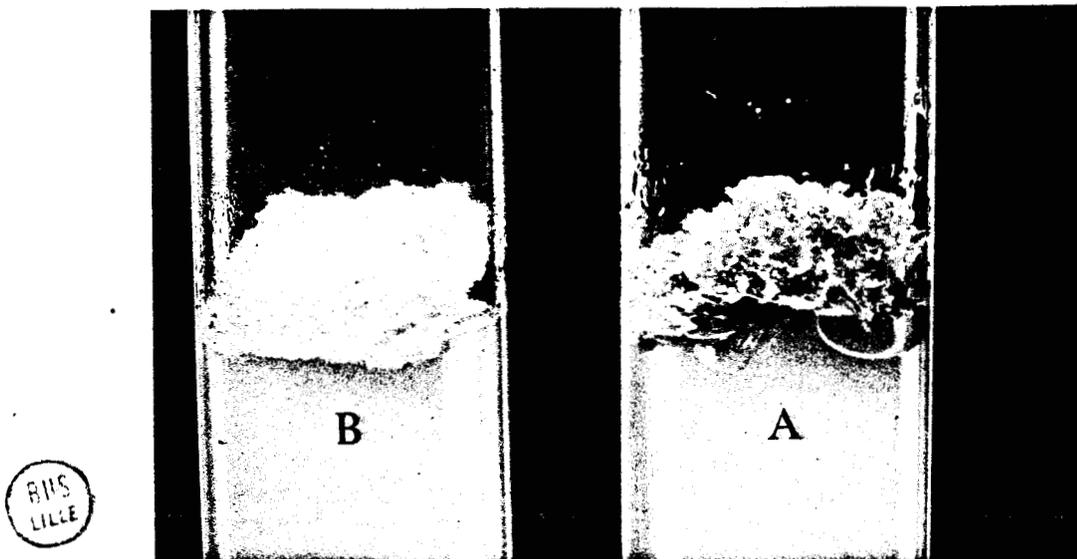


Planche 1 : Colonies tissulaires ayant proliféré sur le milieu de base additionné de saccharose (30 g.l⁻¹).

- A - Colonies tissulaires éclairées 18 heures par jour
- B - Colonies placées à l'obscurité

2) Influence du saccharose et du glucose

Pour étudier l'influence de la teneur en sucre, nous avons utilisé le saccharose ou le glucose à des doses variant de 0 à 80 g.l^{-1} .

Les colonies sont éclairées 18 heures par jour et reçoivent une énergie lumineuse voisine de $8000 \text{ Erg.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, ou sont placées à l'obscurité.

Après quatorze jours de culture, la croissance est optimale pour 30 g.l^{-1} de saccharose et 40 g.l^{-1} de glucose et meilleure pour pour les cultures réalisées à la lumière. Les colonies tissulaires ne peuvent proliférer sur un milieu dépourvu de sucre. De plus, le saccharose est plus favorable à la croissance que le glucose (Figure 16).

Il est intéressant de noter que les colonies tissulaires peuvent se développer en présence de fortes concentrations de saccharose et de glucose. Les conditions d'éclairement de culture influencent la croissance des colonies tissulaires et jouent également un rôle sur la pigmentation. Sous l'action de la lumière, les colonies sont légèrement chlorophylliennes, mais à l'obscurité elles sont totalement dépourvues de pigments (Planche 1).

3) Influence de la L⁺ glutamine.

Au milieu contenant 30 g.l^{-1} de saccharose, de l'ANA ($10^{-6} \text{ g.ml}^{-1}$) et de la 6 BAP ($5.10^{-6} \text{ g.ml}^{-1}$), nous avons ajouté de la L⁺ glutamine à des concentrations variant de 0 à 400 mg.l^{-1}

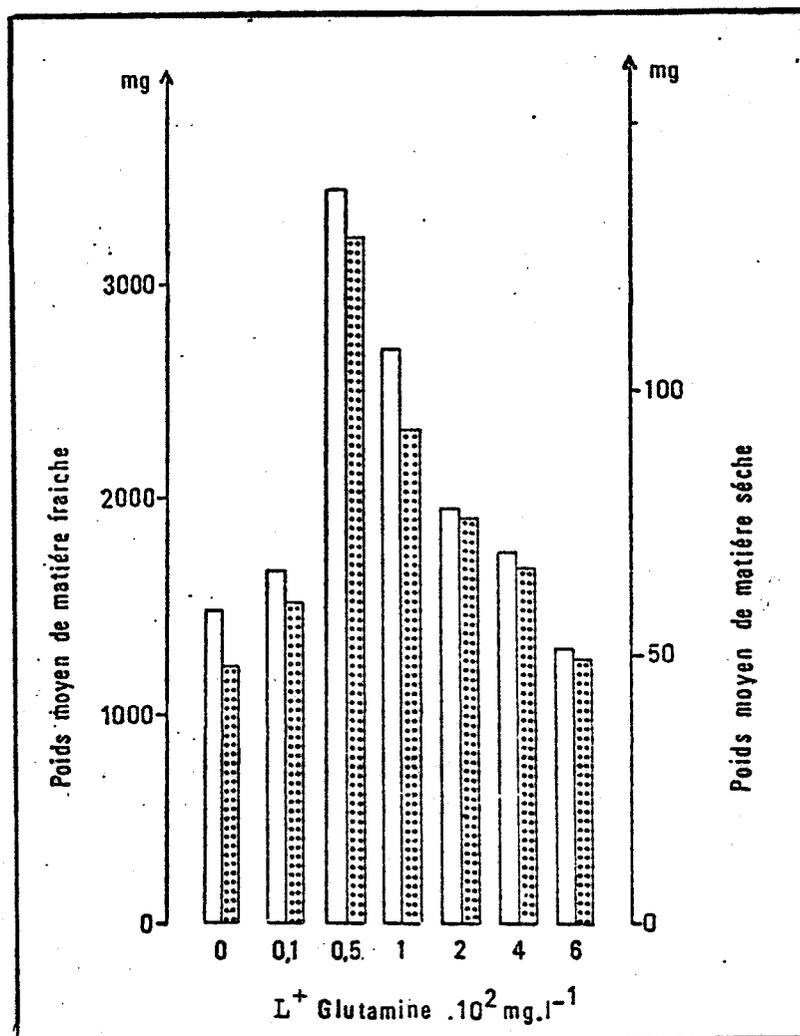


Figure 17 : - Influence de la concentration en L⁺ glutamine sur la croissance des colonies tissulaires repiquées sur le milieu de base additionné de 6 BAP ($5 \cdot 10^{-6}$ g.ml⁻¹), d'ANA (10^{-6} g.ml⁻¹) et de saccharose (30 g.l⁻¹).

▬ Poids moyen de matière fraîche.

▨ Poids moyen de matière sèche.

Les mesures sont effectuées après quatorze jours de culture.



La L⁺ glutamine est stérilisée après mise en solution, par filtration sur membrane d'ester de cellulose (Millipore) retenant les particules d'un diamètre supérieur à 0,45 μ m. Elle est ensuite répartie aseptiquement dans les milieux préalablement stérilisés à l'autoclave.

Après quatorze jours de culture, la croissance est optimale pour 50 mg.l⁻¹ de L⁺ glutamine si nous comparons les résultats à ceux obtenus quand les colonies tissulaires sont repiquées sur le milieu de base additionné de 100 mg.l⁻¹ de L⁺ glutamine (Figure 17).

././././././.

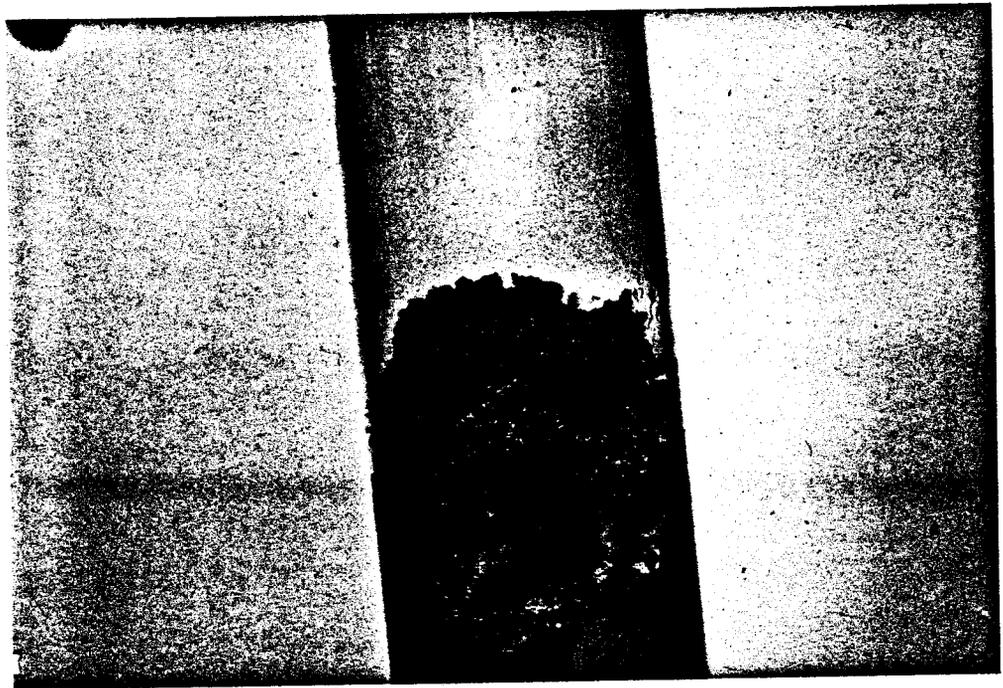


Planche 2 : - Colonie tissulaire âgée de quatorze jours et ayant été repiquée sur le milieu de base additionné de saccharose (30 g.l^{-1}) et éclairée 18 heures par jour ($19000 \text{ Erg.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

On observe une formation d'anthocyanes dans la partie supérieure de la colonie.



TROISIEME PARTIE

ETUDE DE L'ELABORATION D'ANTHOCYANES PAR LES COLONIES TISSULAIRES

A) INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE

Les cellules situées à la surface des colonies tissulaires et les plus éloignées du milieu de culture élaborent des anthocyanes. Cette synthèse s'effectue lorsque les colonies tissulaires repiquées sur le milieu contenant les macro-éléments de la solution de MARGARA, les oligoéléments et les vitamines de la solution de NITSCH et NITSCH, de l'hydrolysate de caséine (150 mg.l^{-1}), de la L⁺ glutamine (50 mg.l^{-1}), de l'ANA ($10^{-6} \text{ g.ml}^{-1}$), de la 6 BAP ($5 \cdot 10^{-6} \text{ g.ml}^{-1}$) et du saccharose ou du glucose (de 30 à 60 g.l^{-1}), reçoivent une importante quantité de lumière ($19000 \text{ Erg.cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) pendant 18 heures par jour (Planche 2); aussi avons-nous conservé ces conditions de culture pour suivre l'évolution de la synthèse d'anthocyanes au cours du temps.

1) Evolution de la teneur en anthocyanes.

Les colonies tissulaires sont repiquées en tubes et placées dans les conditions qui permettent d'obtenir l'optimum de croissance après quatorze jours de culture (photopériode 18 : 6, température de 23°C , glucose - 40 g.l^{-1} ou saccharose - 30 g.l^{-1})

Après 13, 17, 21, 25 et 29 jours de culture, les pigments sont extraits à partir de 10 g de matière fraîche dans 50 ml de méthanol à 0,1 % d'acide chlorhydrique.

Les spectres d'absorption des extraits totaux présentent trois maxima d'absorption pour les longueurs d'onde $\lambda = 397 \text{ nm}$,

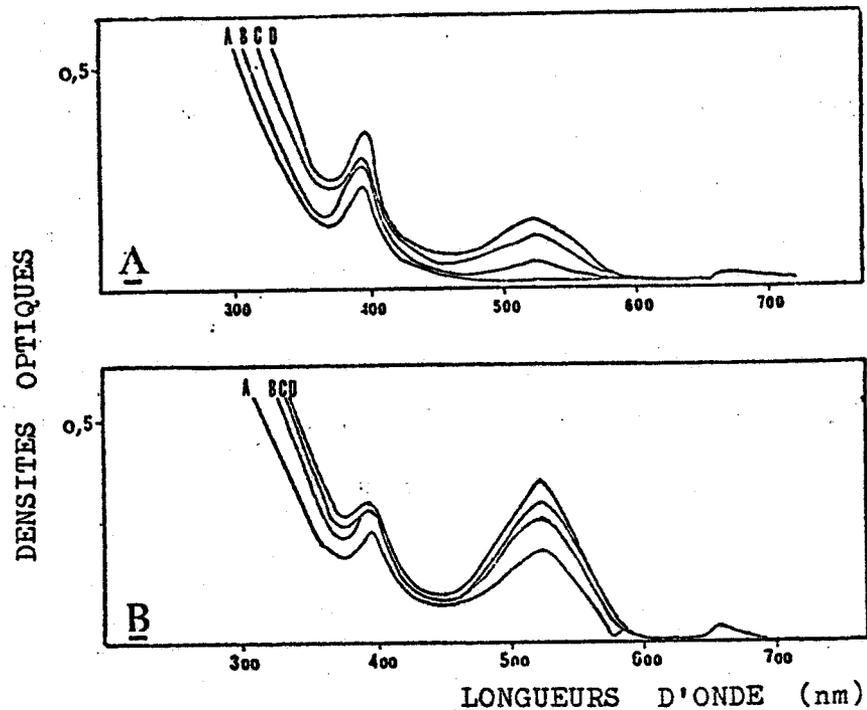


Figure 18 : - Spectres d'absorption dans le méthanol à 0,1 % d'acide chlorhydrique. Les extractions sont réalisées après A - 13, B - 17, C - 25, D - 29 jours de culture à partir de colonies tissulaires repiquées en tubes sur le milieu de base additionné de saccharose (30 g.l^{-1}) - A - ou de glucose (40 g.l^{-1}) - B - et tel que le rapport V . ml de solvant / P . grammes de matière fraîche soit égal à 5.



$\lambda = 527$ nm et $\lambda = 660$ nm, quels que soient la concentration en sucre et le temps de culture (Figure 18).

Le pic à 660 nm est représentatif des chlorophylles, celui à 527 nm des anthocyanines et celui de longueur d'onde comprise entre 360 et 420 nm de composés flavoniques (HARBORNE, 1957; BILLOT, 1969).

L'analyse spectrophotométrique des extraits totaux nous permet de constater que les taux d'anthocyanines et de composés flavoniques sont d'autant plus importants que le temps de culture est plus long (Figure 18).

En outre, il apparait que l'aération joue un rôle très important puisque seules les cellules superficielles qui émergent du milieu gélosé, accumulent le plus d'anthocyanines. Les cellules au contact des parois des tubes sont dépourvues d'anthocyanines. Cependant, dès qu'il se forme un espace entre le verre des tubes et les cellules, celles-ci accumulent des pigments. De plus, nous avons pu constater une certaine hétérogénéité dans la pigmentation des colonies tissulaires après quatorze jours de culture. Dans un même lot de cultures placées dans les mêmes conditions (tous les tubes de culture sont placés face aux sources lumineuses) certaines colonies tissulaires sont plus chlorophylliennes et moins riches en anthocyanines et vice versa; la quantité d'anthocyanines variant souvent très largement d'une colonie à l'autre.

Dans le but d'étudier les conditions physiques et chimiques nécessaires à l'accumulation des anthocyanines nous avons considéré que ce mode de culture présente de nombreux

inconvenients et nous impose d'une part de choisir les colonies tissulaires afin que les dosages ne soient pas trop hétérogènes et d'autre part de prélever d'importantes quantités de cellules pour réaliser les extractions quand les colonies tissulaires ont accumulé très peu d'anthocyanines.

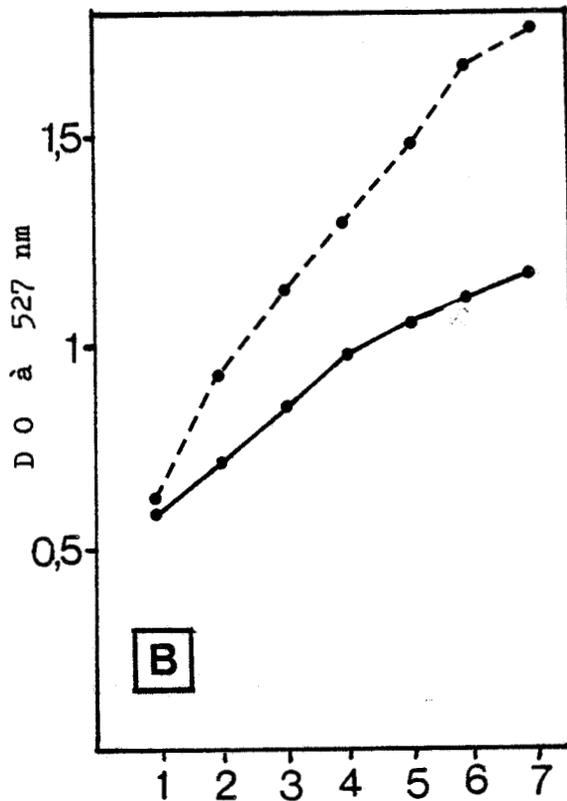
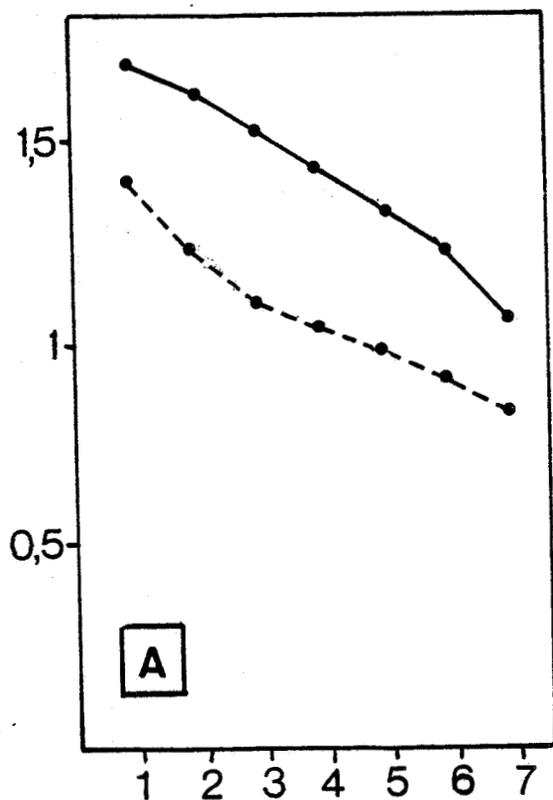
2) Influence du récipient de culture.

L'élaboration des anthocyanines s'effectuant principalement au niveau des parties superficielles non immergées des colonies tissulaires, nous avons cherché à améliorer la production d'anthocyanines en repiquant les colonies tissulaires sur le milieu de base, mais dans des récipients différents de manière à augmenter la surface disponible à l'étalement des colonies qui accumulent des anthocyanines.

Pour cela; nous avons repiqué les colonies tissulaires dans des fioles de Fourneau ou dans des erlenmeyers. Les colonies ont proliféré mais nous n'avons constaté qu'une légère amélioration de la biosynthèse, certainement due à l'augmentation de la surface cellulaire exposée à la lumière.

Les colonies étant très friables, nous les avons dilacérées à l'aide d'une spatule dans un récipient contenant quelques millilitres de milieu nutritif. Après dilacération, la suspension primaire ainsi obtenue, est filtrée stérilement puis les amas cellulaires sont étalés dans des boîtes de Pétri en verre ou en matière plastique, contenant 30 ml de milieu nutritif gélosé. Ce mode de culture a apporté de bons résultats et a permis d'amé-

POIDS MOYEN DE MATIERE FRAICHE (grammes).



NOMBRE DE COLONIES TISSULAIRES REPIQUEES EN BOITES DE PETRI

Figure 19 : - Influence du nombre de colonies tissulaires repiquées en boîtes de Pétri en matière plastique, sur la croissance - **A** et l'accumulation des anthocyanines **B** -

Les colonies tissulaires sont repiquées sur le milieu de base additionné de : ●—● saccharose (30 g.l⁻¹).

●- - -● glucose (40 g.l⁻¹).

Les extractions sont réalisées de façon à ce que le rapport $\frac{V.\text{ml d'extract}}{P.\text{grammes de matière fraîche}}$ soit égal à 10

liorer la production d'anthocyanines par les cellules mais la croissance est irrégulière. Cependant, l'accumulation des anthocyanines est plus importante pour les colonies repiquées en boîtes de Pétri en matière plastique. Dans le cas des cultures en boîtes de Pétri en verre, nous retrouvons dans la pigmentation, la même hétérogénéité que celle obtenue pour les cultures en tubes.

Pour les essais préliminaires, nous avons donc repiqué les colonies tissulaires en boîtes de Pétri en matière plastique. Nous avons également fait varier de un à sept, le nombre de coloniesensemencées. Les conditions de culture, le milieu de base, les concentrations et la nature des sucres et des régulateurs de croissance sont identiques à ceux utilisés pour les cultures en tubes. Les extractions sont réalisées après quatorze jours de culture.

Si nous évaluons le poids de matière fraîche, nous pouvons constater que la croissance des colonies tissulaires diminue en fonction du nombre d'explantats repiqués initialement. et que le saccharose favorise la croissance à une concentration inférieure à celle du glucose (figure 19). Inversement, la teneur en anthocyanines augmente en fonction du nombre de colonies repiquées. A forte concentration, le glucose favorise l'accumulation des anthocyanines (Figure 19).

Quel que soit le nombre de colonies tissulairesensemencées en boîtes de Pétri en matière plastique, il apparait que la bio- l'accumulation des anthocyanines est considérablement augmentée.

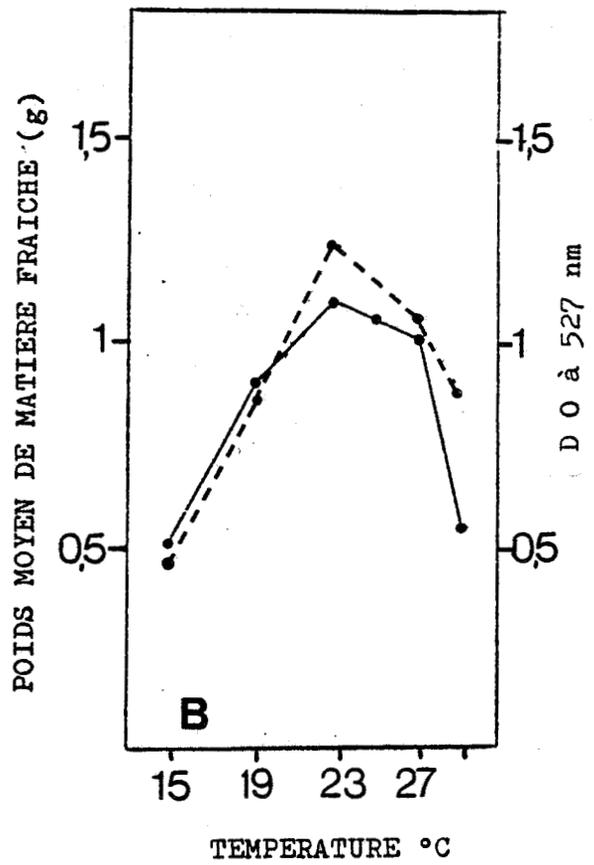
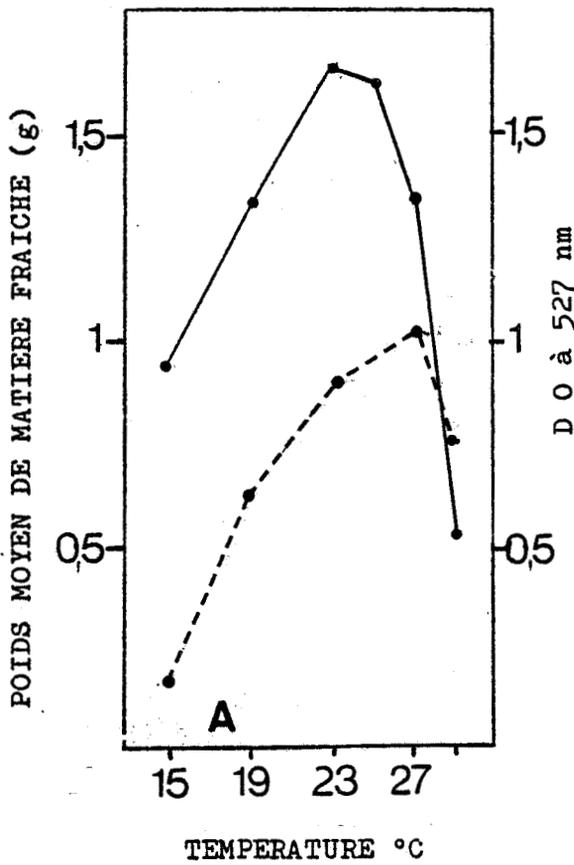


Figure 20 : - Influence de la température sur l'accumulation des anthocyanines et la croissance des colonies tissulaires repiquées sur le milieu de base additionné de glucose (40 g.l^{-1}) - **A** - ou de saccharose (30 g.l^{-1}) - **B** -

- - - - ● Poids moyen de matière fraîche
- — ● Densité optique à 527 nm



De plus, il semble que la diminution de la croissance favorise l'augmentation de la biosynthèse des anthocyanines.

Pour la suite des expériences, nous avons choisi d'ensemencer six colonies tissulaires par boîte de Pétri. Ce choix est défini en fonction de l'accumulation des anthocyanines et de la croissance des colonies qui occupent la surface de la boîte après seize jours de culture.

3) Influence de la température

Six colonies tissulaires sont repiquées par boîte de Pétri sur le milieu de base additionné de glucose (40 g.l^{-1}) ou de saccharose (30 g.l^{-1}). Cette expérience est conduite en photopériode $18 : \bar{6}$. La quantité d'énergie lumineuse reçue par les colonies est de $19000 \text{ Erg.cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Les extractions sont réalisées après quatorze jours de culture.

Nous avons fait varier la température de 15°C à 29°C . Pour chaque condition, la température reste constante pendant tout le temps de culture.

Quel que soit le sucre ajouté aux milieux de culture, nous observons que l'accumulation des anthocyanines est d'autant plus importante que la température est élevée, avec un optimum à 23°C . Cependant, la biosynthèse des anthocyanines apparaît stable pour des températures comprises entre 23°C et 25°C . Les températures supérieures à 25°C ralentissent considérablement la biosynthèse des anthocyanines (Figure 20).

Si nous nous référons aux poids moyens de matière fraîche

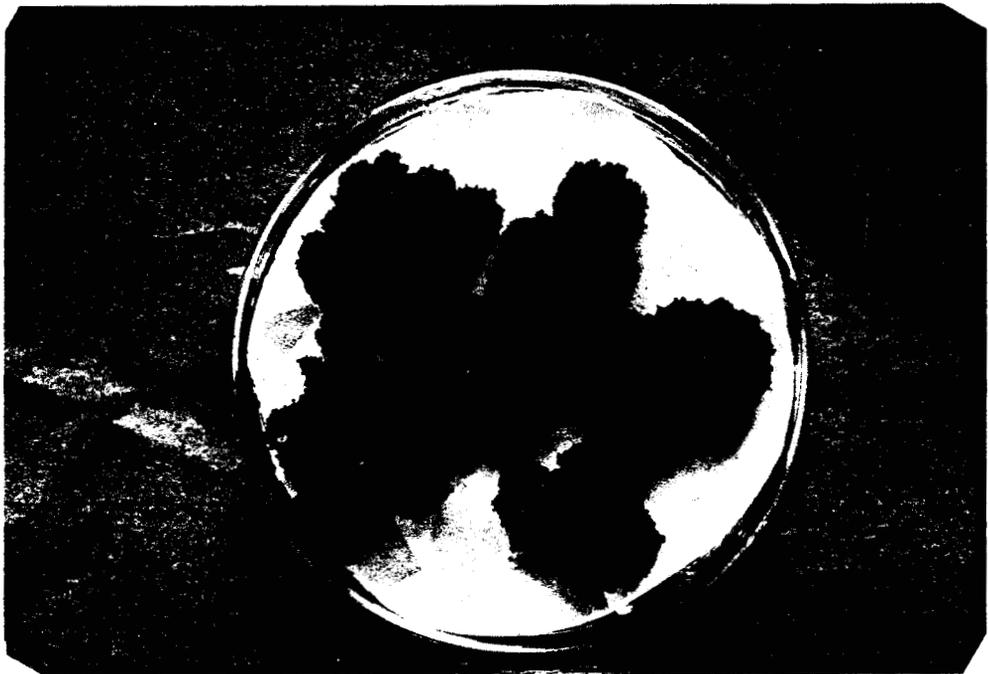


Planche 3 : - Colonies tissulaires âgées de 14 jours, ayant été repiquées en boîte de Pétri en matière plastique. Les colonies tissulaires ont proliféré sur le milieu de base additionné de saccharose (30 g.l^{-1}) et dans les conditions standards (photopériode 18 : $\bar{6}$, énergie lumineuse - $19000 \text{ Erg.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, température - 23°C .



la croissance des colonies est également d'autant plus importante que la température est élevée, avec un optimum à 27°C pour les colonies repiquées en présence de glucose et un optimum à 23°C pour les colonies repiquées en présence de saccharose (Figure 20). Les températures supérieures à 27°C ne favorisent pas la croissance car les colonies tissulaires se nécrosent.

4) Analyse de quelques facteurs favorisant la synthèse des anthocyanines.

Les différences observées au niveau de l'accumulation des anthocyanines par des colonies tissulaires repiquées en tubes ou en boîte de Pétri en matière plastique, peuvent être attribuées à diverses causes. Tout d'abord, il apparaît que le contact des cellules avec le milieu gélosé ou le verre, inhibe la biosynthèse des anthocyanines. Des essais de culture sur papier filtre imbibé de milieu nutritif, ont abouti à des résultats similaires. Le fait de réduire la concentration en éléments nutritifs d'origine minérale tout en conservant les concentrations en sucres et en régulateurs de croissance, ne favorise que très peu la biosynthèse des anthocyanines par les colonies repiquées dans des récipients en verre. Outre l'effet de masse dû au nombre de colonies repiquées par boîte de Pétri en matière en matière plastique, et l'augmentation de la surface cellulaire (n'étant pas au contact du milieu gélosé) qui sont deux facteurs favorisant l'accumulation des anthocyanines (Planche 3), nous pensé que les variations de biosynthèse peuvent être dues à

la lumière et plus spécialement à la réception de la lumière par les colonies tissulaires suivant la nature du récipient de culture employé et la place de ce récipient par rapport à la source lumineuse.

En effet, après analyse spectrophotométrique de la matière plastique des boîtes de Pétri, il apparaît que les pourcentages de transmission de cette matière, sont supérieurs à ceux du verre des tubes. De 380 à 600 nm, le plastique nous donne en moyenne 90 % de transmission alors que les pourcentages de transmission du verre des tubes varient de 75 % à 85 %. Ces variations sont essentiellement dues à la couleur, l'épaisseur et la forme arrondie du verre.

Les colonies tissulaires mises en culture en tubes ou en boîtes de Pétri sont placées à égale distance de la source lumineuse et reçoivent la même quantité d'énergie lumineuse ($19000 \text{ Erg. cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). L'augmentation de la teneur en anthocyanines pour les cultures en boîtes de Pétri, peut être attribuée au fait que les colonies reçoivent l'énergie lumineuse sur toute leur surface puisqu'elles sont placées sous les rampes lumineuses. Les colonies tissulaires repiquées en tubes ne reçoivent la même quantité d'énergie lumineuse qu'au niveau des cellules qui sont face à la source lumineuse.

De plus, sous l'action de la lumière, les cellules accumulent des sucres. Cependant, quelques différences sont observées suivant le mode de culture.

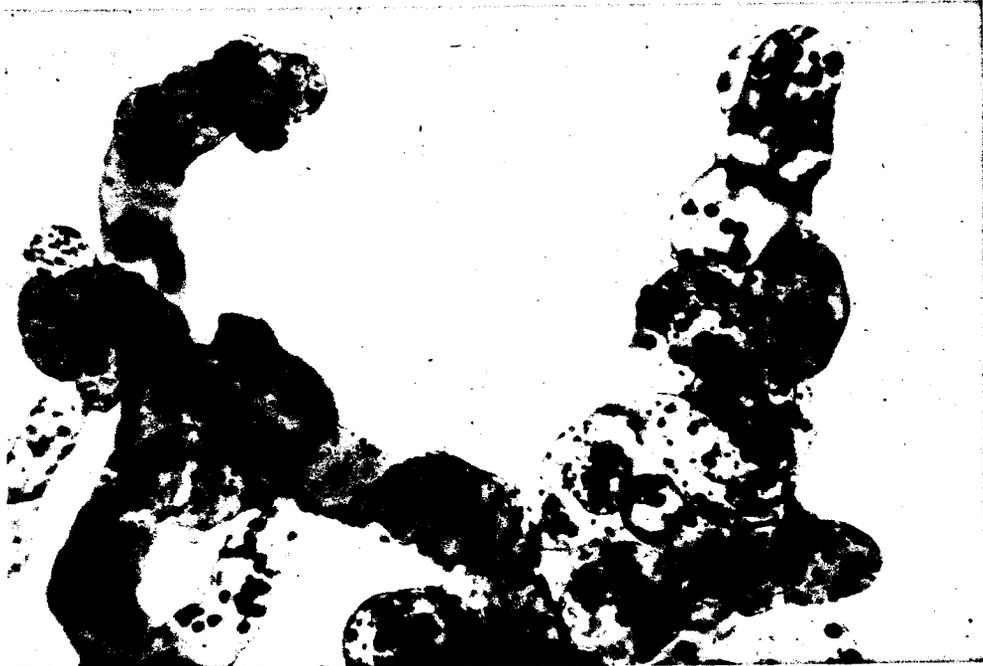


Planche 4 : - Cellules prélevées sur une colonie tissulaire ayant été repiquée en boîte de Pétri en matière plastique. On observe de nombreux grains d'amidon mis en évidence à l'aide de la solution iodo-iodurée de Lugol (Obj. x 10).



Planche 5 : - Cellules prélevées sur une colonie tissulaire ayant été répiquée en tube. Les cellules sont colorées par la solution iodo-iodurée de Lugol (Obj. x 10).

Les colonies tissulaires âgées de 14 jours, ont proliféré sur le milieu de base additionné de saccharose (30 g.l^{-1}) et dans les conditions standards (photopériode 18:6, énergie lumineuse $19000 \text{ Erg.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, température 23°C).

L'observation des cellules au microscope montre que l'accumulation d'amidon et d'anthocyanines est plus importante dans les cellules superficielles des colonies tissulaires repiquées en boîtes de Pétri en matière plastique que dans celles repiquées en tubes (Planches 4,5). Les cellules sous-jacentes des colonies cultivées en tubes ou en boîtes de Pétri, n'accumulent pas de telles quantités d'amidon et ne forment pas d'anthocyanines (Planche 6).

Au cours de nos expériences, nous avons eu beaucoup de difficultés pour doser les sucres totaux des colonies tissulaires. Nous pouvons attribuer ce fait à l'hétérogénéité de la répartition des sucres dans les colonies et à la difficulté qu'il y a à séparer les parties anthocyaniques des parties sous-jacentes des colonies tissulaires.



Planche 6 : - Cellules prélevées dans la zone interne d'une colonie tissulaire repiquée en boîte de Pétri en matière plastique. La coloration des cellules est faite avec la solution iodo-iodurée de Lugol (Obj. x 10).

Pour poursuivre nos expériences, nous avons choisi de repiquer les colonies tissulaires en boîtes de Pétri en matière plastique, de façon à avoir une bonne oxygénation, une augmentation de la surface cellulaire qui accumule les anthocyanines et une bonne réception de l'énergie lumineuse au niveau des cellules.

Toutes nos expériences seront effectuées à 23°C, température à laquelle nous obtenons l'accumulation optimale d'anthocyanines par les colonies tissulaires repiquées sur le milieu de base additionné de 6 BAP ($5 \cdot 10^{-6}$ g.ml⁻¹), d'ANA (10^{-6} g.ml⁻¹) et de glucose ou de saccharose.

Nous avons pu constater que la lumière joue un rôle important dans la biosynthèse des anthocyanines. Avant d'aborder l'étude de l'influence des facteurs chimiques sur l'accumulation des anthocyanines, nous avons soumis les colonies tissulaires à l'action de divers types de lumière.

B) INFLUENCE DES LUMIERES MONOCHROMATIQUES

Les colonies tissulaires sont repiquées sur le milieu de base additionné de glucose (40 g.l⁻¹) ou de saccharose (30 g.l⁻¹).

En éclairant les colonies tissulaires 6, 12, 18 ou 24 heures par jour, avec la lumière bleue (4600 Erg.cm⁻².s⁻¹), la lumière rouge (25900 Erg.cm⁻².s⁻¹) ou la lumière verte (1880 Erg.cm⁻².s⁻¹), il n'y a aucune accumulation d'anthocyanines. D'un passage à l'autre, la croissance des colonies tissulaires est

très variable si nous nous référons aux poids moyens de matière fraîche et de matière sèche.

Nous avons alors soumis les colonies tissulaires à toute une série de traitements pour vérifier si elles accumulent des anthocyanines sous l'action de la lumière rouge.

A cet effet, les colonies tissulaires sont mises en culture dans les conditions standards pendant dix jours (température : 23°C, éclaircissement : 19000 Erg.cm⁻².s⁻¹ (tubes Osram 40 W 15), photopériode 18 : 6), puis placées 48 heures à l'obscurité avant d'effectuer les traitements à la lumière rouge (R) et à la lumière rouge lointain (RL) suivants :

Traitement	R	RL	R / RL	RL / R
Temps (minutes)	15	15	15 / 15	15 / 15

Après les différents traitements, les colonies tissulaires sont replacées à l'obscurité pendant 48 heures avant d'effectuer les dosages des anthocyanines.

Les valeurs témoins sont obtenues en dosant les anthocyanines des colonies tissulaires placées dix jours dans les conditions standards puis 96 heures à l'obscurité.

Nous n'avons constaté aucune amélioration de l'accumulation des anthocyanines en utilisant uniquement la lumière rouge lointain (RL) ou consécutivement la lumière rouge et la lumière rouge lointain (R / RL). Par contre, les traitements à la

lumière rouge (R) ou à la lumière rouge lointain puis à la lumière rouge (RL / R), permettent d'obtenir une petite amélioration de la biosynthèse des anthocyanines par les colonies tissulaires replacées 48 heures à l'obscurité après les traitements suivants: (Tableau 2).

	Traitement						
	A	B	10 jours + Obscurité (96 heures)	R 15	RL 15	R / RL 15 / 15	RL / R 15 / 15
	(minutes)						
Densité optique à 527 nm ★	S 1,1	0,87	0,7	0,91	0,69	0,74	0,96
	G 1,7	1,3	1,1	1,25	0,97	1,04	1,3

Tableau 2 : - Influence de la lumière rouge sur l'accumulation des anthocyanines par des colonies tissulaires repiquées sur le milieu de base additionné de saccharose (30 g.l⁻¹) - **S** - ou de glucose (40 g.l⁻¹)- **G** - . Après les divers traitements à la lumière rouge, les colonies tissulaires sont placées 48 heures à l'obscurité avant d'effectuer les dosages des anthocyanines

A - Colonies tissulaires ayant proliféré 14 jours dans les conditions standards.

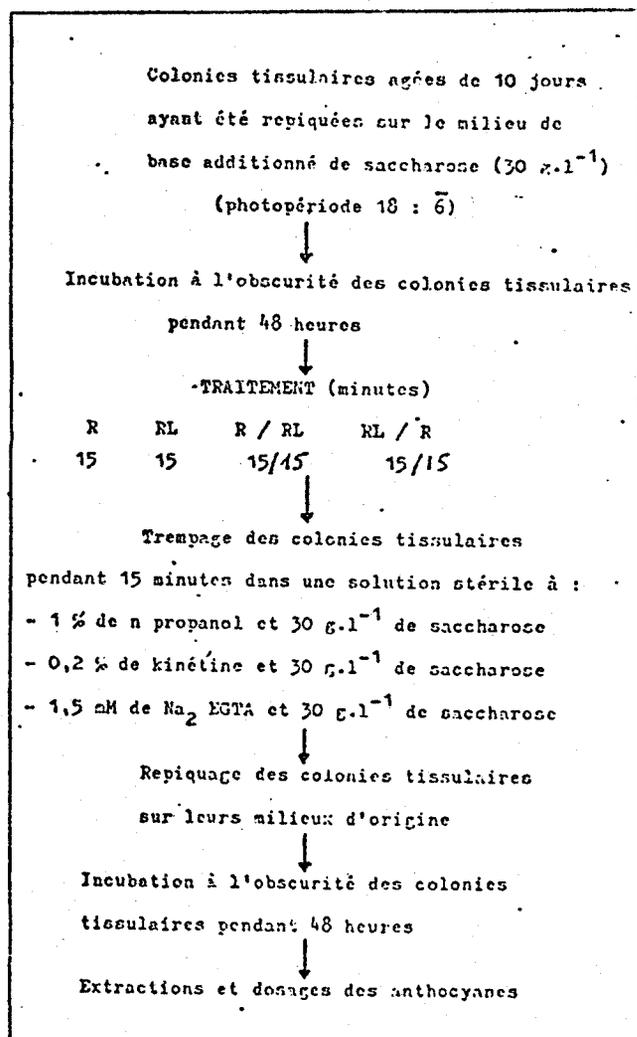
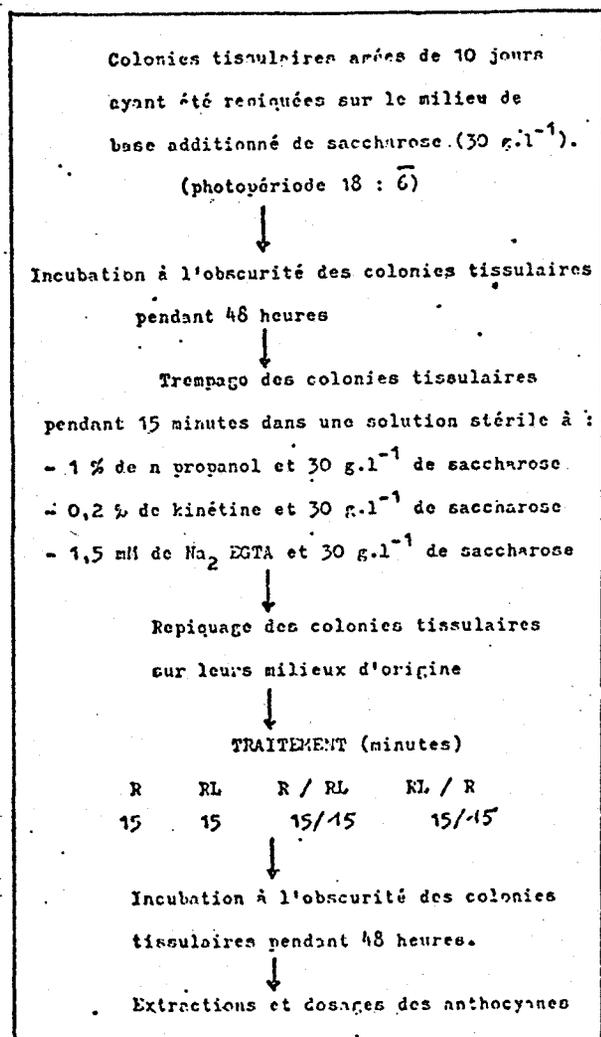
B - Colonies tissulaires ayant proliféré 10 jours dans les conditions standards.

★ - Moyenne des résultats obtenus après trois expériences.

- Les extractions sont réalisées de telle sorte que le rapport -V.ml de solvant / P.grammes de matière fraîche- soit égal à 10.

PECKET et HATHOUT BASSIM (1974) ont montré que le n propanol et la kinétine favorisent l'accumulation des anthocyanines chez des plantules de chou rouge placées à l'obscurité ou préalablement soumises à l'action de la lumière rouge et replacées ensuite à l'obscurité. Ces auteurs montrent également que l'EDTA active la biosynthèse des anthocyanines.

Nous avons répété l'expérience précédente, mais en soumettant les colonies tissulaires à ces diverses substances avant ou après les traitements à la lumière rouge. Pour cette expérience, les colonies tissulaires sont repiquées sur le milieu de base additionné de saccharose (30 g.l^{-1}). Les manipulations effectuées sont les suivantes :



Les essais préliminaires nous ont permis de constater que le Na_2EDTA est toxique pour les colonies tissulaires. Nous avons utilisé l'acide éthylène-glycol-bis (β amino éthyl éther) N,N' tetra-acétique (EGTA) qui chélate le calcium. A la solution d'EGTA (1,5 mM) on ajoute de la soude pour obtenir une solution de Na_2EGTA à pH = 7. A cette solution est ajouté du glucose ou du saccharose. Les solutions obtenues sont stérilisées par filtration sur membrane d'ester de cellulose (Millipore) retenant les particules d'un diamètre inférieur à 0,45 μm , et réparties aseptiquement dans des fioles de Fourneau préalablement stérilisées à l'autoclave. Les solutions sucrées de n propanol et de kinétine sont stérilisées suivant la même technique.

Les valeurs témoins sont obtenues en dosant les anthocyanes des colonies tissulaires traitées au n propanol, à la kinétine ou au Na_2EGTA et replacées ensuite à l'obscurité pendant 48 heures

Les colonies tissulaires sont également mises en culture en photopériode 18 : $\overline{6}$ pendant quatorze jours après avoir subi un traitement initial au n propanol , à la kinétine ou au Na_2EGTA .

Contrairement aux résultats obtenus par PECKET et HATHOUT BASSIM, cette expérience nous permet de constater d'une part que le n propanol et la kinétine ne favorisent pas la biosynthèse des anthocyanines par les colonies tissulaires replacées à l'obscurité sans traitement à la lumière rouge et d'autre part qu'un traitement à la kinétine ou au n propanol avant ou après avoir soumis les colonies tissulaires à l'action de la lumière rouge lointain (RL) ou de la lumière rouge et de la lumière rouge lointain (R / RL),

	Traitements							
	A	B	C	D	R 15	RL 15	R/RL 15/15	RL/R 15/15
—	1,1	0,87	0,7		0,91	0,7	0,74	0,96
n propanol	1,5	1,1	0,9	0,9	1,2	0,85	0,95	1,15
kinétine	1,3	0,9	0,7	0,7	0,98	0,72	0,7	0,9
Na ₂ EGTA	0,7	0,55	0,46	0,44	0,46	0,4	0,43	0,4

Tableau 3 : - Influence de la lumière rouge sur l'accumulation des anthocyanines par des colonies tissulaires repiquées sur le milieu de base additionné de saccharose (30 g.l^{-1}). Les colonies tissulaires sont traitées au n propanol, à la kinétine ou au Na₂EGTA avant d'être soumises à l'action de la lumière rouge.

Les densités optiques à 527 nm sont mesurées après avoir extrait les anthocyanes des :

A - colonies tissulaires ayant proliféré 14 jours dans les conditions standards avec ou sans traitement initial au n propanol, à la kinétine ou au Na₂EGTA.

B - colonies tissulaires ayant proliféré 10 jours dans les conditions standards avec ou sans traitement initial au n propanol, à la kinétine ou au Na₂EGTA.

C - colonies tissulaires ayant proliféré 10 jours dans les conditions standards avec ou sans traitement initial au n propanol, à la kinétine ou au Na₂EGTA et replacées ensuite pendant 96 heures à l'obscurité.

D - colonies tissulaires ayant proliféré 10 jours dans les conditions standards et ayant subi les traitements au n propanol, à la kinétine ou au Na₂EGTA pendant la période d'incubation à l'obscurité .

Les extractions sont réalisées de telle sorte que le rapport
- V. ml de solvant / P. grammes de matière fraîche - soit égal à 10.

Moyenne des résultats obtenus après trois expériences.

ne permet pas d'inhiber l'action de ces lumières (Tableau 3).

Des substances telles que le n propanol et la kinétine qui peuvent accroître la perméabilité membranaire (PECKET et HATHOUT BASSIM, 1974), favorisent également la biosynthèse des anthocyanines si les colonies tissulaires sont soumises à l'action de la lumière rouge (R et RL / R). L'accumulation des anthocyanines est cependant beaucoup plus importante quand les colonies tissulaires sont traitées initialement à la kinétine ou au n propanol et placées ensuite quatorze jours dans les conditions standards (photopériode 18 : 6 et lumière blanche). Dans tous les cas, le Na_2 EGTA ralentit considérablement la biosynthèse des anthocyanines

Le fait de soumettre les colonies tissulaires à l'action de la lumière rouge avant d'effectuer les traitements à la kinétine, au n propanol ou au Na_2 EGTA , ne permet pas d'obtenir une amélioration des résultats.

PECKET et HATHOUT BASSIM avaient constaté que la biosynthèse des anthocyanines par des plantules de chou rouge, est sensible à l'action de la lumière rouge et rouge lointain. Des résultats similaires sont obtenus avec les colonies tissulaires mais les augmentations de l'accumulation des anthocyanines, restent faibles. En outre, l'action de la lumière rouge ou de la lumière blanche peut être renforcée par celle de composés qui augmentent la perméabilité membranaire. La sensibilité des colonies tissulaires à la lumière rouge, laisse supposer que le phytochrome est actif dans le contrôle de la biosynthèse des anthocyanines. Ce contrôle ne dépend pas d'un temps d'éclairement très long en lumière rouge mais d'une durée d'incubation des colonies tissulaires à l'obscurité.

avant et après le traitement à la lumière rouge. En outre, il nous est difficile de définir avec exactitude le rôle du Na_2EGTA .

C) INFLUENCE DE LA LUMIERE FOURNIE PAR LES TUBES "GRO LUX".

Par rapport aux tubes "Osram 40 W 15" (lumière blanche), les tubes "Gro lux 40 W" dont la répartition spectrale aux plus forts pourcentages d'émission, se situe dans le bleu et le rouge ne permettent pas d'améliorer l'accumulation des anthocyanines quelle que soit la photopériode utilisée.

Au cours de ces expériences, nous avons pu constater que les sucres jouent un rôle essentiel dans la biosynthèse des anthocyanines et que la lumière est indispensable pour que cette biosynthèse s'effectue. Pour la suite de nos expériences, nous avons étudié simultanément l'influence de la lumière blanche (photopériode et intensité de l'éclairement et l'influence de la nutrition carbonée sur la croissance des colonies tissulaires et l'élaboration des anthocyanines.

D) INFLUENCE DU TEMPS DE CULTURE ET DE LA PHOTOPERIODE.

Les cultures en tubes ne nous ayant pas permis de suivre simultanément l'évolution de l'accumulation des anthocyanines et la croissance des colonies tissulaires au cours du temps, nous avons donc étudié ce phénomène lorsque les colonies sont repiquées en boîtes de Pétri.

Par ailleurs, la relation synthèse d'anthocyanines - lumière étant extrêmement nette, il nous a paru intéressant de voir comment

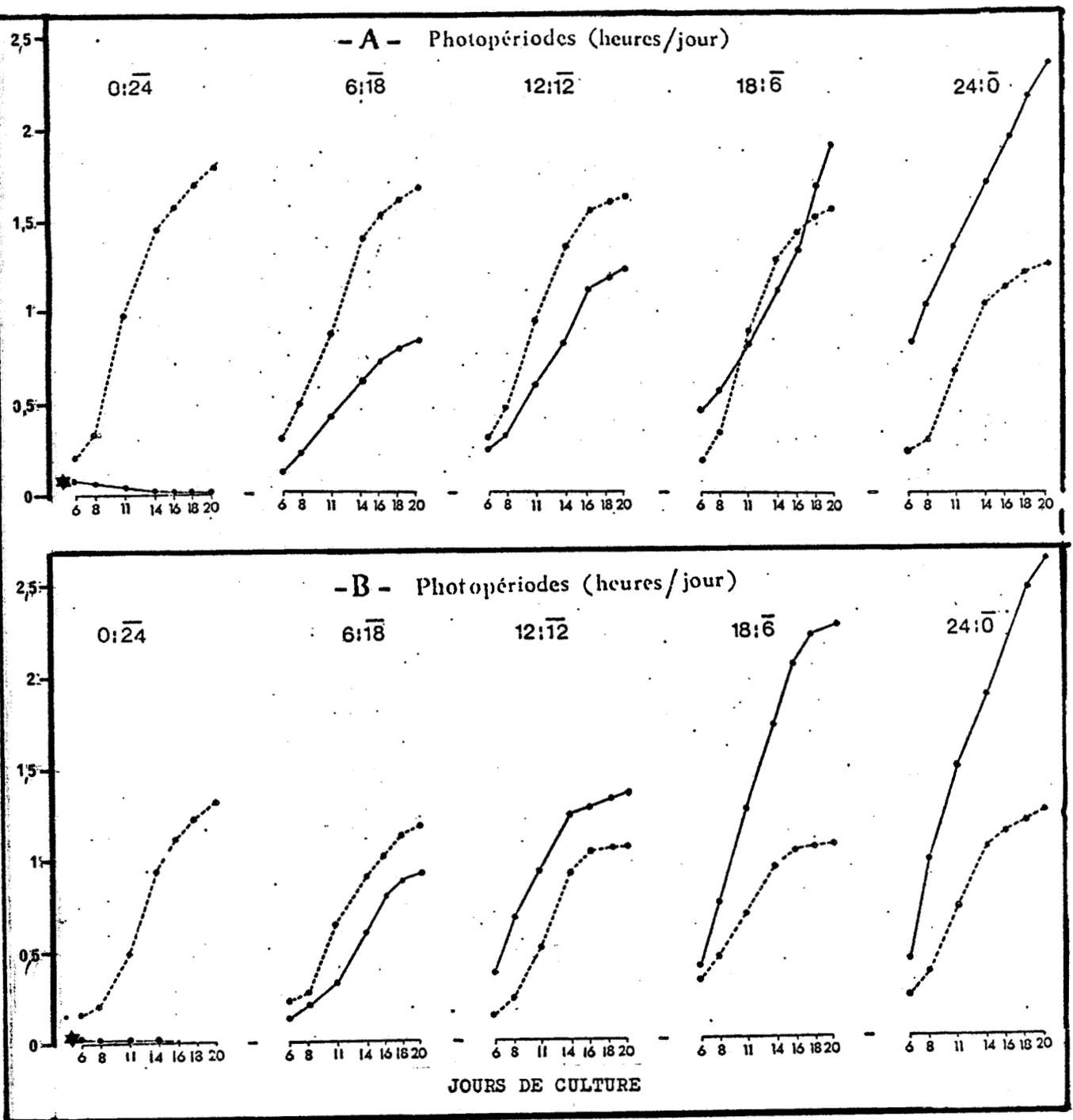


Figure 21 : - Influence du temps de culture et de la photopériode sur l'accumulation des anthocyanines et la croissance des colonies tissulaires repiquées sur le milieu de base additionné de saccharose (30 g.l^{-1}) - A - ou de glucose (40 g.l^{-1}) - B - . Les colonies tissulaires sont éclairées à la lumière blanche ($19000 \text{ Erg.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

BIS LILLE

- - - - - ● Poids moyen de matière fraîche (grammes).
- - - - - ● Densité optique à 527 nm.
- ★ Mesures effectuées au premier passage

évoluent la croissance et l'accumulation des anthocyanines quand les colonies sont soumises à différentes photopériodes.

A cet effet, les colonies tissulaires repiquées sur le milieu de base additionné de glucose (40 g.l^{-1}) ou de saccharose (30 g.l^{-1}), sont éclairées 6, 12, 18 ou 24 heures par jour ($19000 \text{ Erg.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ou placées à l'obscurité. Les mesures de poids de matière fraîche et les extractions sont effectuées quand les colonies tissulaires sont âgées de 6, 8, 11, 14, 18 et 20 jours.

Pour chaque photopériode, nous pouvons observer les trois phases de la croissance: la phase de latence, la phase exponentielle et la phase stationnaire.

phase de latence

Cette phase s'opère généralement du premier au quatrième jour. Cependant, suivant la photopériode, la phase de latence peut durer six jours.

phase exponentielle

La phase exponentielle de croissance semble liée à la nature des sucres et à la photopériode. Nous pouvons considérer que cette phase s'achève au quatorzième jour de culture.

Si la synthèse des anthocyanines est très liée à la phase exponentielle de croissance, il apparait également que la photopériode exerce une influence sur l'accumulation de ces pigments car leur biosynthèse est d'autant plus importante que le nombre d'heures d'éclairement est grand (Figure 21).

phase stationnaire

La phase stationnaire est donc fonction de la photopériode

		Photopériodes (h/j)					
		0:24	6:18	12:12	18:6	24:0	
Saccharose 30 g.l ⁻¹	14j	A	1,45	1,36	1,32	1,25	1
		B	24	25	27	28	29
		C	98,34	98,16	97,95	97,76	97,1
	20j		1,77	1,64	1,61	1,53	1,24
			28	29	29	31	34
			98,41	98,23	98,19	97,97	97,25
Glucose 40 g.l ⁻¹	14j		0,93	0,88	0,9	0,92	1
			18	19	23	28	31,5
			98,06	97,84	97,44	96,95	96,85
	20j		1,3	1,2	1,15	1,05	1,3
			23	25	27	30	34
			98,23	97,94	97,65	97,14	97,38

Tableau 4 : - Influence de la photopériode sur la croissance des colonies tissulaires repiquées sur le milieu de base additionné de saccharose (30 g.l⁻¹) ou de glucose (40 g.l⁻¹). Les mesures sont effectuées après quatorze et vingt jours de culture.

A - Poids moyen de matière fraîche (grammes)

B - Poids moyen de matière sèche (milligrammes)

C - Pourcentage en eau des colonies tissulaires.

./././././././.



Cette phase s'amorce moins vite lorsque les colonies sont placées à l'obscurité. Du quatorzième au vingtième jour de culture, la photopériode exerce également une influence sur la biosynthèse des anthocyanines puisque cette dernière est d'une part très ralentie en photopériodes 6:18 et 12:12 et d'autre part très intense en photopériodes 18:6 et 24:0 quelle que soit la nature du sucre utilisé (Figure 21). Après un premier passage à l'obscurité, les colonies tissulaires n'accumulent plus d'anthocyanines, si elles sont replacées dans les mêmes conditions.

Après quatorze jours de culture, les poids moyens de matière sèche sont d'autant plus élevés que le temps d'éclairement est long. Corrélativement, le pourcentage en eau des colonies diminue. En utilisant le glucose à une concentration supérieure à celle du saccharose, les colonies tissulaires sont moins riches en eau mais elles accumulent plus d'anthocyanines. Au vingtième jour de culture, nous pouvons observer que les poids moyens de matière sèche sont plus importants. Cependant, si nous nous référons aux pourcentages en eau, de nombreuses variations apparaissent en fonction de la photopériode (Tableau 4).

Le délai de quatorze jours de culture correspond en général à la limite de la phase exponentielle de croissance . Pour la suite de nos expériences, c'est après ce temps de culture que nous comparerons les résultats.

La nature, la teneur en sucres et la photopériode influencent la croissance des colonies tissulaires et la biosynthèse des anthocyanines. En fonction des diverses photopériodes, nous avons comparé les effets du saccharose à ceux du glucose lorsque ces

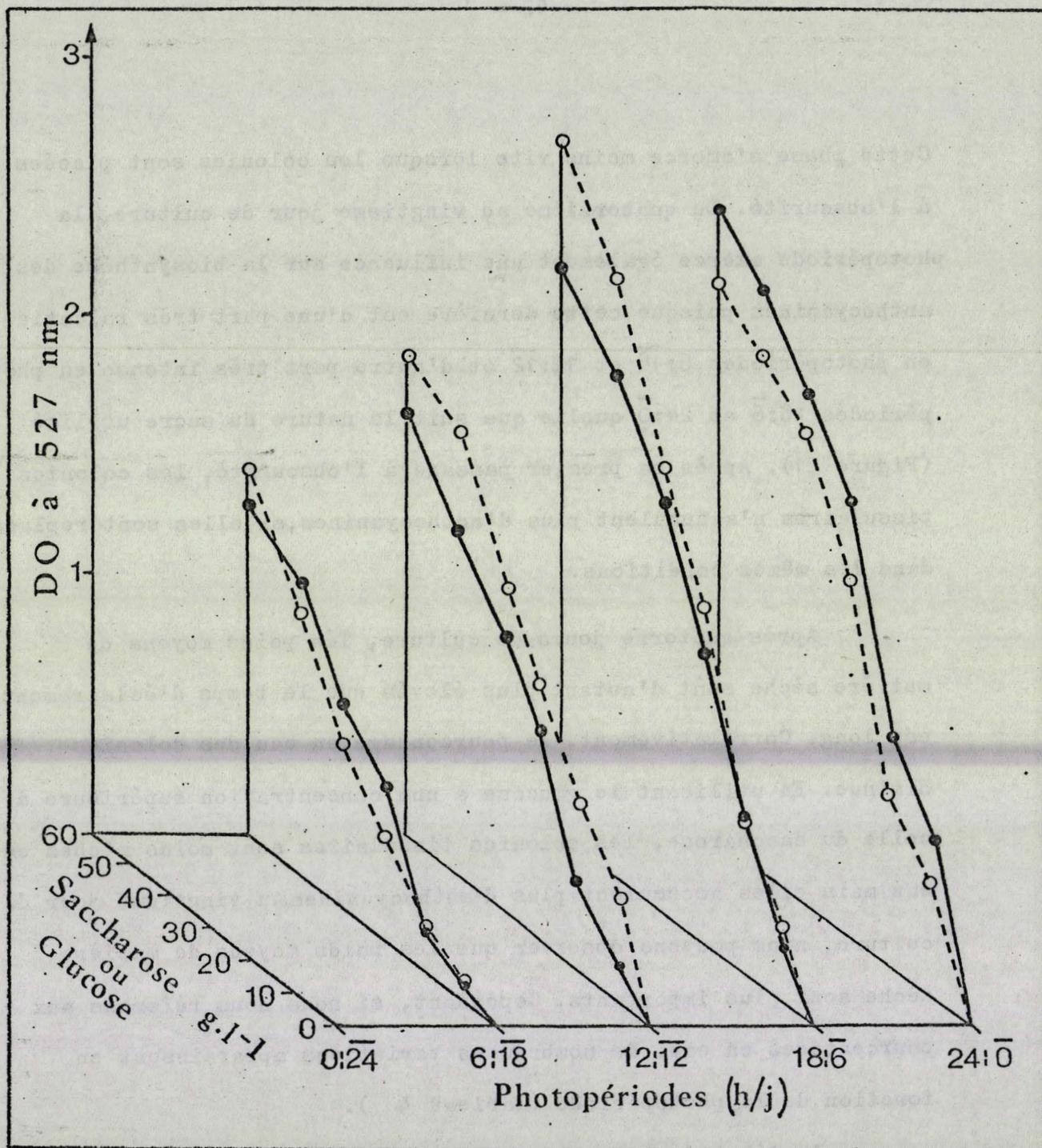


Figure 22 : Influence de la concentration en saccharose et en glucose et de la photopériode sur l'accumulation des anthocyanines par des colonies tissulaires âgées de quatorze jours.



- — ● contenu anthocyanique des colonies repiquées sur le milieu de base additionné de saccharose.
- - - - ○ contenu anthocyanique des colonies repiquées sur le milieu de base additionné de glucose.

sucres sont utilisés aux mêmes concentrations.

E) INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SACCHAROSE ET EN GLUCOSE

1) En photopériodes 0:24, 6:18, 12:12, 18:6 et 24:0

Nous avons fait varier les doses de saccharose et de glucose de 0 à 60 g.l⁻¹ et les colonies tissulaires sont éclairées 6, 12, 18 et 24 heures par jour ou maintenues à l'obscurité. Les extractions sont réalisées après quatorze jours de culture.

L'accumulation des anthocyanines augmente avec le nombre d'heures d'éclairement et la concentration en saccharose. Avec le glucose (de 30 à 60 g.l⁻¹) les optimums de biosynthèse sont obtenus en photopériode 18 : 6. Pour des doses plus faibles de ce sucre (10 et 20 g.l⁻¹), les résultats sont variables en fonction de la photopériode.

Les colonies constamment éclairées, supportent mieux le saccharose car elles ne se nécrosent pas en présence de fortes doses de ce sucre.

En outre, à concentration égale en sucre, les différences de teneur en anthocyanines restent faibles quel que soit le temps d'éclairement journalier. A l'obscurité, les colonies tissulaires sont totalement dépourvues d'anthocyanines quelles que soient la nature et la concentration des sucres (Figure 22).

Si le critère de croissance est le poids moyen de matière fraîche, la croissance est d'une part optimale quand les colonies sont repiquées en présence de 30 g de saccharose ou 40 g de glucose

		Saccharose g.l ⁻¹							
		10	20	30	40	50	60		
P h o t o p é r i o d e s	24:0	A	0,42	0,76	1	0,87	0,8	0,71	
		B	8	16	29	27	28	29	
		C	98,09	97,89	97,1	96,9	96,5	95,91	
	18:6		0,65	0,8	1,25	1,05	0,91	0,81	
			10	16	28	27	27,4	28	
			98,46	98	97,76	97,42	96,99	96,54	
	12:12		0,62	1	1,32	1,13	1	0,95	
			10	17	24	28	28	27	
			98,38	98,3	98,18	97,52	97,2	97,15	
	6:18		0,65	0,9	1,35	1,13	1	0,9	
			12	16	23	27	27	25	
			98,15	98,22	98,29	97,61	97,3	97,22	
	0:24		0,65	1,04	1,42	1,3	1,4	1,34	
			10	18	24	25	28,4	28	
			98,46	98,27	98,31	98,07	97,97	97,91	
			Glucose g.l ⁻¹						
			10	20	30	40	50	60	
	P h o t o p é r i o d e s	24:0	A	0,3	0,49	0,79	1	0,59	0,48
			B	6	13	23	31	21	18
			C	98	97,34	97,08	96,9	96,44	96,25
18:6			0,32	0,54	0,72	0,92	0,62	0,53	
			7	13	20	28	23	21	
			97,81	97,6	97,22	96,95	96,29	96,03	
12:12			0,3	0,5	0,67	0,9	0,6	0,46	
			6	11	15	23	19	16	
			98	97,8	97,76	97,44	96,83	96,52	
6:18			0,4	0,65	0,72	0,88	0,68	0,48	
			6	11	15	20	18	15	
			98,5	98,3	97,91	97,72	97,35	96,87	
0:24			0,68	0,75	0,83	0,93	0,6	0,41	
			10	15	17	19	15	10	
			98,53	98	97,9	97,95	97,50	97,56	

Tableau 5 :- Influence de la photopériode et de la concentration en saccharose ou en glucose sur la croissance des colonies tissulaires.

A . Poids moyen de matière fraîche (grammes)

B . Poids moyen de matière sèche (milligrammes)

C . Pourcentage en eau

Les mesures sont effectuées après quatorze jours de culture.



par litre et d'autre part favorisée quand le sucre est le saccharose.

Les poids moyens de matière fraîche varient très peu lorsque les colonies tissulaires sont éclairées. Les variations de croissance sont beaucoup plus sensibles si nous nous référons aux poids moyens de matière sèche et aux pourcentages en eau des colonies. En effet, il apparaît d'une part que les colonies sont moins riches en eau quand les temps d'éclairement sont plus longs et d'autre part que les pourcentages en eau des colonies repiquées en présence de saccharose, sont généralement plus élevés que ceux des colonies repiquées en présence de glucose (Tableau 5).

Il faut noter également que les colonies sont de moins en moins friables quand la concentration en sucres et la durée d'éclairement augmentent. Cependant, les colonies repiquées en présence de saccharose sont plus friables.

././././././.

	SACCHAROSE $g.l^{-1}$					
	10	20	30	40	50	60
PHOTOPERIODE	A 0,62	1	1,32	1,13	1	0,95
12 : $\bar{12}$	B 10	17	24	28	28	27
(Témoins)	C 98,38	98,3	98,18	97,52	97,2	97,15
RYTHME	0,2	0,3	0,65	0,61	0,57	0,53
PHOTOPERIODIQUE	3,4	6,4	17	18	17,4	19
1 : $\bar{1}$	98,3	97,86	97,38	97,05	96,94	96,41
RYTHME	0,32	0,41	0,75	0,57	0,5	0,47
PHOTOPERIODIQUE	4,8	7,2	18	17	15	15,2
2 : $\bar{2}$	98,5	98,24	97,6	97	97	96,76

	GLUCOSE $g.l^{-1}$					
	10	20	30	40	50	60
PHOTOPERIODE	0,3	0,5	0,67	0,9	0,6	0,46
12 : $\bar{12}$	6	11	15	23	19	16
(Témoins)	98	97,8	97,76	97,44	96,83	96,52
RYTHME	0,26	0,4	0,71	0,98	0,6	0,47
PHOTOPERIODIQUE	5,4	10	20	31	21	17
1 : $\bar{1}$	97,92	97,5	97,18	96,83	96,5	96,38
RYTHME	0,2	0,43	0,53	0,86	0,6	0,49
PHOTOPERIODIQUE	4,2	10,4	15	27	20	18
2 : $\bar{2}$	97,9	97,58	97,16	96,86	96,66	96,32

Tableau 6 : - Influence de la concentration en saccharose ou en glucose et des rythmes photopériodiques 1 : $\bar{1}$ et 2 : $\bar{2}$ sur la croissance des colonies tissulaires âgées de quatorze jours.



A - poids moyen de matière fraîche (grammes)

B - poids moyen de matière sèche (milligrammes)

C - pourcentage en eau des colonies tissulaires

Les valeurs témoins sont obtenues en photopériode 12 : $\bar{12}$.

2) Influence des rythmes photopériodiques 1 : $\bar{1}$, 2 : $\bar{2}$ et 3 : $\bar{1}$

Nous avons également étudié l'influence de rythmes photopériodiques plus courts. Pour cette expérience, nous avons soumis les colonies tissulaires à 12 ou 18 heures d'éclairement journalier en utilisant les rythmes 2 : $\bar{2}$, 1 : $\bar{1}$ et 3 : $\bar{1}$. Les extractions sont réalisées après quatorze jours de culture.

Les résultats seront donc comparés à ceux obtenus quand les colonies tissulaires sont éclairées sans discontinuité pendant 12 ou 18 heures par jour.

Avec le saccharose et les rythmes photopériodiques 1 : $\bar{1}$ et 2 : $\bar{2}$, nous pouvons observer une nette diminution de la croissance . Les colonies sont cependant moins riches en eau quand elles sont repiquées sur le milieu de base additionné de 30 à 60 grammes de saccharose par litre. Pour les doses de saccharose inférieures à 30 g.l⁻¹ , les résultats sont variables en ce qui concerne les pourcentages en eau (Tableau 6).

Avec le glucose et les mêmes rythmes photopériodiques, il n'y a pas de grandes variations de croissance si nous nous référons aux poids moyens de matière fraîche. Cependant, en nous référant aux poids moyens de matière sèche et aux pourcentages en eau, il apparait que les colonies tissulaires sont plus riches en matière sèche quelle que soit la concentration en sucre (Tableau 6).

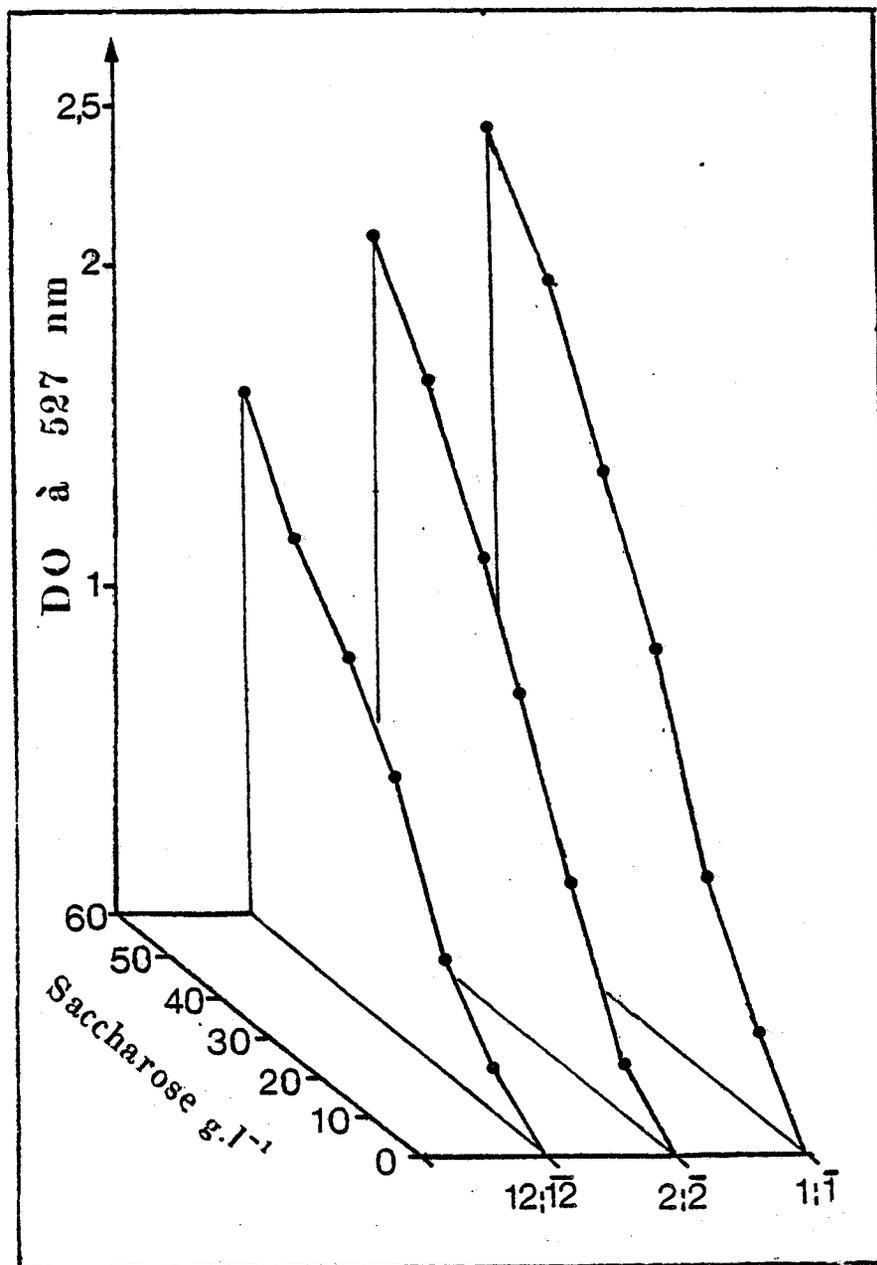


Figure 23 : - Influence de la concentration en saccharose et des rythmes photopériodiques $2 : \bar{2}$ et $1 : \bar{1}$ sur l'accumulation des anthocyanines par des colonies tissulaires âgées de quatorze jours. Les valeurs témoins sont obtenues en photopériode $12 : \bar{12}$.



Lorsque les colonies tissulaires sont repiquées sur le milieu de base additionné de saccharose, l'accumulation des anthocyanines est d'autant plus importante que la concentration en sucre est élevée et que le rythme photopériodique est court (Figure 23)

Avec le glucose, l'accumulation des anthocyanines n'est pas favorisée quand les colonies sont soumises aux rythmes photopériodiques $2 : \bar{2}$ et $1 : \bar{1}$ (Figure 24).

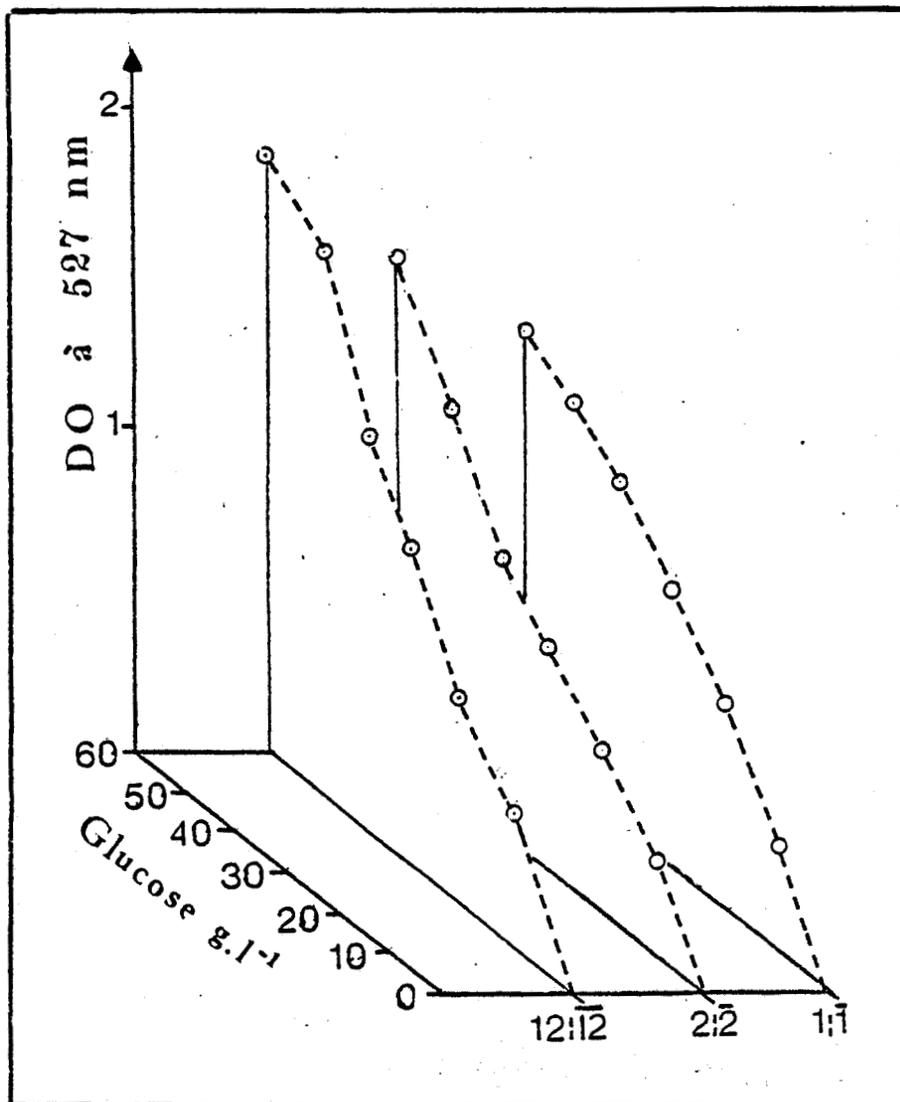


Figure 24 : - Influence de la concentration en glucose et des rythmes photopériodiques $2 : \bar{2}$ et $1 : \bar{1}$ sur l'accumulation des anthocyanines par des colonies tissulaires âgées de quatorze jours. Les valeurs témoins sont obtenues en photopériode $12 : \bar{12}$

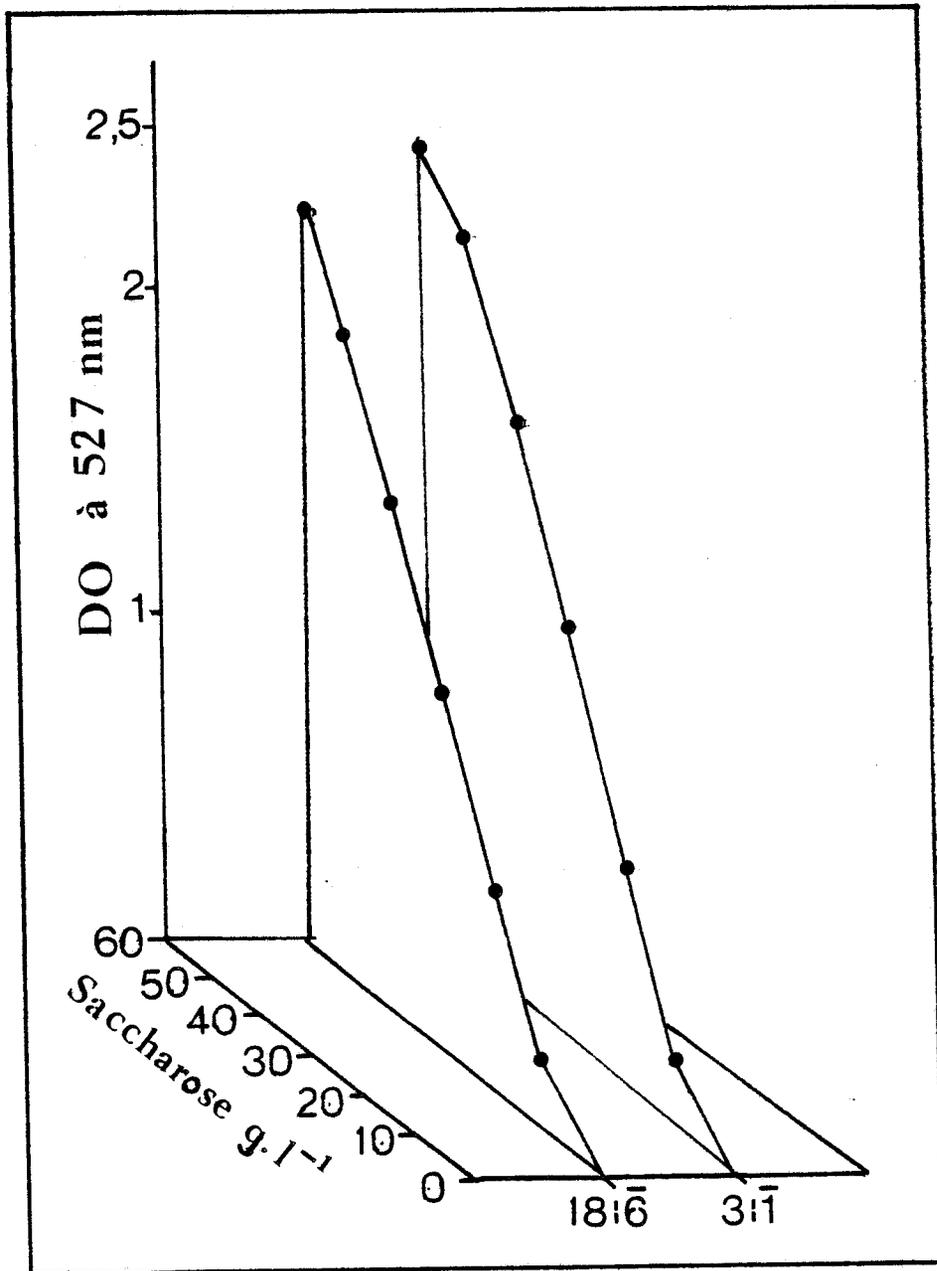


Figure 25 : - Influence de la concentration en saccharose et du rythme photopériodique 3 : 1̄ sur l'accumulation des anthocyanines par des colonies tissulaires âgées de quatorze jours. Les valeurs témoins sont obtenues en photopériode 18 : 6̄



Les expériences réalisées en utilisant le rythme photopériodique 3 : 1̄ et le glucose, n'ont pas permis de mettre en évidence de grandes variations de croissance et de biosynthèse par rapport aux résultats obtenus en photopériode 18 : 6̄. Les différences sont beaucoup plus nettes lorsque nous soumettons les colonies tissulaires repiquées sur le milieu de base additionné de saccharose, au rythme photopériodique 3 : 1̄. Dans ce cas, nous observons à la fois une augmentation de l'accumulation des anthocyanes (Figure 25) et une amélioration de la croissance des colonies tissulaires quand la concentration en saccharose est supérieure à 20 g.l⁻¹ (Tableau 7).

	SACCHAROSE g.l ⁻¹					
	10	20	30	40	50	60
PHOTOPERIODE	A 0,65	0,8	1,25	1,05	0,91	0,81
18 : 6̄	B 10	16	28	27	27,4	28
(Temoins)	C 98,46	98	97,76	97,42	96,99	96,54
RYTHME	0,71	0,84	1,55	1,25	1,15	0,9
PHOTOPERIODIQUE	12	15	37	35	37	32
3 : 1̄	98,31	98,21	97,61	97,2	96,78	96,44

Tableau 7 : - Influence de la concentration en saccharose et du rythme photopériodique 3 : 1̄ sur la croissance des colonies tissulaires âgées de 14 jours.

- A - poids moyen de matière fraîche (grammes)
- B - poids moyen de matière sèche (milligrammes)
- C - pourcentage en eau des colonies tissulaires

Les valeurs témoins sont obtenues en photopériode 18 : 6̄

Photoperiodes (h/j)	Saccharose gl ⁻¹	Energie lumineuse (Erg . cm ⁻² . s ⁻¹ x 10 ³)				
		2,3	4,2	12	19	32
24:0	30	0,52 ← A → 0,6	0,8	1	1,1	
		0,27 ← B → 0,45	0,68	1,66	1,65	
	40	0,7	0,8	0,9	0,87	1
		0,37	0,73	0,91	1,97	1,85
		0,62	0,74	0,88	0,8	1
50	0,6	1,05	1,45	2,24	2,12	
	60	0,52	0,6	0,65	0,71	1,27
			0,54	0,9	1,7	2,39
18:6	30	0,57	0,67	0,92	1,24	1,3
		0,29	0,41	0,7	1,1	1,29
	40	0,45	0,62	0,71	1,045	1,15
		0,36	0,62	1,24	1,54	1,69
	50	0,39	0,6	0,66	0,91	1,1
0,66		0,7	1,6	1,95	2,39	
60	0,56	0,59	0,62	0,8	0,96	
	0,65	0,81	1,78	2,21	2,83	
12:12	30	0,61	0,76	0,93	1,32	0,7
		0,3	0,48	0,66	0,79	1,39
	40	0,59	0,68	0,88	1,13	0,7
		0,3	0,52	0,75	1,07	1,55
	50	0,48	0,62	0,75	1,02	0,86
0,28		0,61	0,91	1,38	1,85	
60	0,41	0,56	0,61	0,95	0,84	
	0,25	0,63	1	1,63	1,9	

Tableau 81 : - Influence de la quantité d'énergie lumineuse, de la photo-période et de la concentration en saccharose sur la croissance des colonies tissulaires et la biosynthèse des anthocyanines

A - Poids moyen de matière fraîche (grammes).

B - Densité optique à 527 nm.

Les mesures sont effectuées après quatorze jours de culture.



F) INFLUENCE DE LA QUANTITE D'ENERGIE LUMINEUSE ET DE LA CONCENTRATION EN SUCRE

Nous avons voulu vérifier s'il existe une quantité optimale d'énergie lumineuse nécessaire à l'accumulation des anthocyanines.

Les cultures sont placées sur des tablettes suspendues à différents niveaux sous une source lumineuse composée de trois tubes "Osram 40 w 15 - lumière du jour". Suivant les niveaux, les quantités d'énergie lumineuse reçues par les colonies sont de: 2300, 4200, 12000, 19000 et 32000 Erg.cm⁻².s⁻¹.

La température est de 23°C au niveau des quatre premières tablettes et de 26°C au niveau de la tablette placée juste sous les rampes lumineuses.

Pour chaque niveau d'énergie, nous avons fait varier le temps d'éclairement journalier en utilisant les photopériodes 12 : $\overline{12}$, 18 : $\overline{6}$ et 24 : $\overline{0}$ qui permettent une bonne accumulation des anthocyanines par les colonies repiquées sur le milieu de base additionné de 30 à 60 grammes de saccharose ou de glucose par litre. Les extractions sont réalisées après quatorze jours de culture.

L'accumulation des anthocyanines est optimale pour une quantité d'énergie lumineuse de 19000 Erg.cm⁻².s⁻¹ lorsque les colonies tissulaires sont repiquées en présence de glucose et éclairées 18 et 24 heures par jour (Tableau 8).

Des résultats analogues sont obtenus avec le saccharose et un temps d'éclairement journalier de 24 heures. Cependant, en présence de 60 g.l⁻¹ de ce sucre, les colonies tissulaires supportent mieux une forte quantité d'énergie lumineuse et accumulent plus d'anthocyanines (Tableau 9).

Photoperiodes (h/j)	Glucose g.l ⁻¹	Energie lumineuse (Erg . cm ⁻² . s ⁻¹ x 10 ³)				
		2,3	4,2	12	19	32
24:0	30	0,425 ← A → 0,57	0,62	0,79	0,75	
		0,35 ← B → 0,47	0,69	1,36	0,88	
	40	0,27	0,42	0,62	1	0,67
		0,44	0,59	0,87	1,84	1,59
	50	0,25	0,27	0,33	0,58	0,57
		0,51	0,71	1	2	2
60	0,241	0,26	0,35	0,48	0,54	
	60	0,49	0,81	1,2	2,15	1,82
18:6	30	0,31	0,36	0,49	0,725	0,7
		0,52	0,51	0,7	1,25	1,22
	40	0,36	0,4	0,57	0,91	0,62
		0,5	0,58	0,77	1,68	1,19
	50	0,26	0,29	0,36	0,61	0,57
		0,56	0,8	0,97	2,3	1,36
60	0,2	0,17	0,33	0,53	0,61	
	60	0,7	1	1,35	2,7	1,96
12:12	30	0,39	0,445	0,52	0,57	0,64
		0,45	0,52	0,71	0,9	1,5
	40	0,45	0,62	0,79	0,9	0,89
		0,5	0,64	0,92	1,2	1,79
	50	0,31	0,52	0,7	0,6	0,61
		0,56	0,81	1,3	1,69	1,93
60	0,31	0,42	0,44	0,46	0,68	
	60	0,2	0,5	0,95	1,84	2

Tableau 9 : - Influence de la quantité d'énergie lumineuse, de la photoperiode et de la concentration en glucose sur la croissance des colonies tissulaires et la biosynthèse des anthocyanines

A - Poids moyen de matière fraîche (grammes).

B - Densité optique à 527 nm.

Les mesures sont effectuées après quatorze jours de culture.



Quand les colonies tissulaires sont éclairées 12 et 18 heures par jour et mises en culture en présence de saccharose, l'accumulation des anthocyanines est d'autant plus importante que la quantité d'énergie lumineuse est élevée. Le même phénomène est observé lorsque les colonies sont éclairées 12 heures par jour et mises en culture sur le milieu de base additionné de glucose (Tableau 8 et 9).

D'un passage à l'autre, les poids de matière sèche sont très variables. En outre, les colonies tissulaires éclairées 24 heures par jour se nécrosent dans 50 % des cas quand le sucre est le glucose à forte concentration et quand la quantité d'énergie lumineuse est de $32000 \text{ Erg.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Ces nécroses sont certainement dues à la température élevée (26°C).

En ne considérant que les poids de matière fraîche, la croissance est favorisée avec le saccharose. De plus, en photopériode $18 : \bar{6}$ ou $24 : \bar{0}$ et quelle que soit la concentration en saccharose, la croissance des colonies tissulaires n'est pas ralentie lorsque la quantité d'énergie lumineuse et la température sont augmentées (Tableau 8). Les résultats sont plus hétérogènes quand les colonies tissulaires sont repiquées sur le milieu de base additionné de glucose (Tableau 9).

G) INFLUENCE DE LA NUTRITION AZOTEE

L'azote est, avec le sucre et les régulateurs de croissance l'un des facteurs qui contrôle la synthèse des anthocyanines et la croissance pour de nombreuses espèces et en particulier pour des plantules de chou rouge (SZWEYKOWSKA, 1959).

Les principales sources d'azote du milieu de base sont de nature organique (L^+ glutamine et hydrolysate de caséine) et minérale (KNO_3 ; $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ et NH_4NO_3). Etant donnée la complexité du milieu nutritif, nous avons étudié l'aspect qualitatif et quantitatif de la nutrition azotée sur l'accumulation des anthocyanines et la croissance des colonies tissulaires.

Pour toutes les expériences concernant l'influence de l'azote minéral, les essais préliminaires ont montré qu'il est indispensable d'ajouter aux milieux de culture, de la L^+ glutamine (50 mg.l^{-1}) et de l'hydrolysate de caséine (150 mg.l^{-1}) afin d'éviter d'importantes variations au niveau de la croissance et de la biosynthèse des anthocyanines.

Les régulateurs de croissance sont la 6 BAP ($5 \cdot 10^{-6} \text{ g.ml}^{-1}$) et l'ANA ($10^{-6} \text{ g.ml}^{-1}$). Le sucre ajouté aux différents milieux de culture, est le saccharose.

Les cultures sont éclairées 18 heures par jour et la quantité d'énergie lumineuse reçue par les colonies tissulaires, est de $19000 \text{ Erg.cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Toutes les expériences sont réalisées à la température de 23°C .

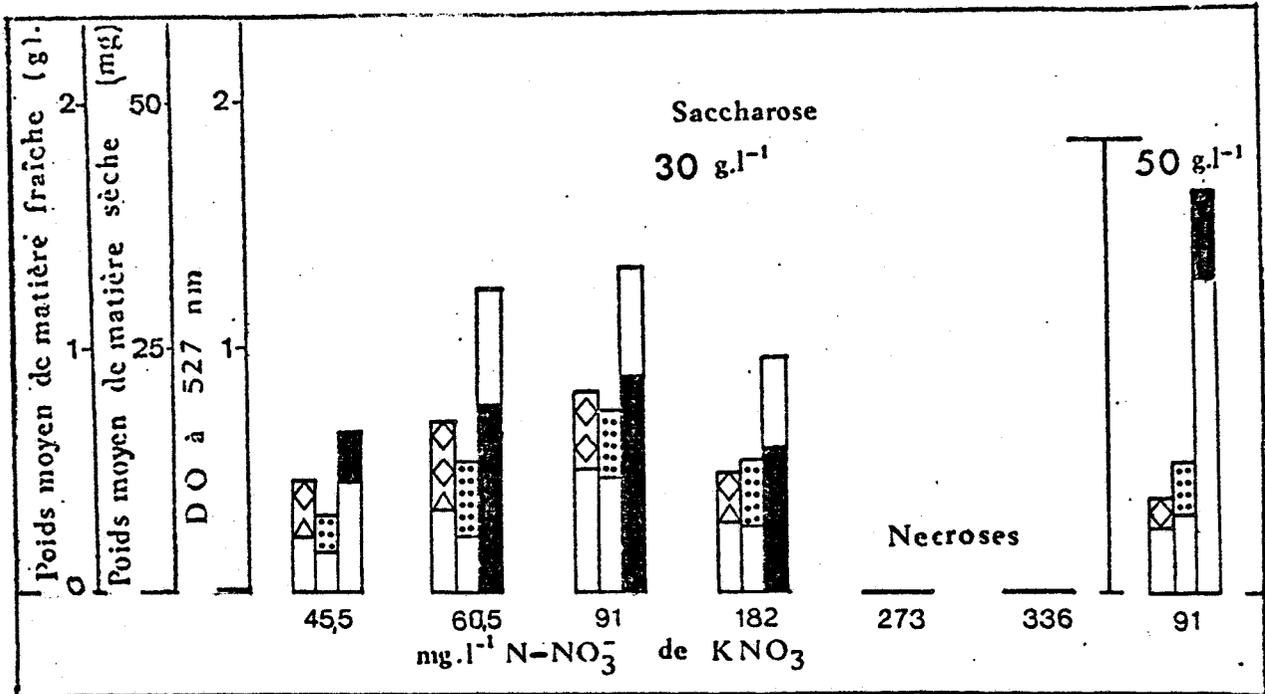


Fig : A

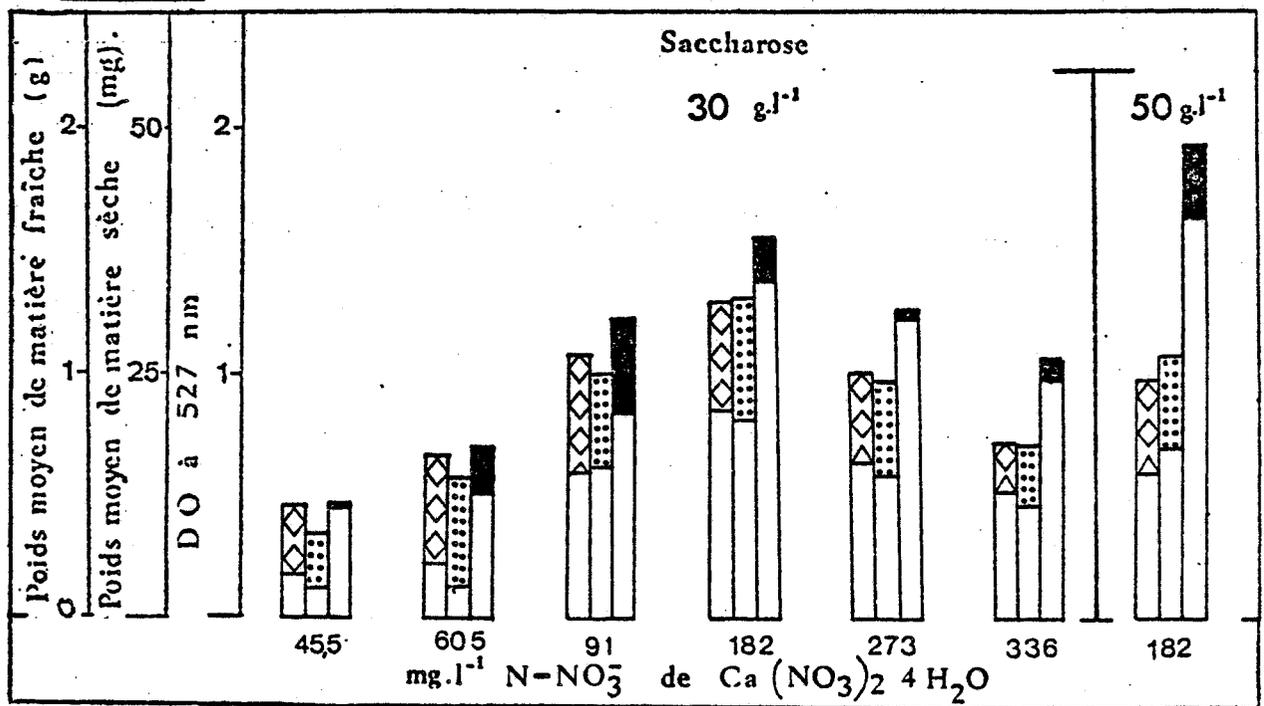
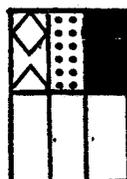


Fig : B

Figure 26 : - Influence de la concentration en azote nitrique apporté sous forme de nitrate de potassium (Fig:A) ou sous forme de nitrate de calcium (Fig:B) et de la concentration en saccharose sur l'accumulation des anthocyanines et la croissance des colonies tissulaires. Les mesures et les extractions sont réalisées après :



20 jours de culture.

14 jours de culture.

Au quatorzième jour de culture, quelle que soit la concentration en saccharose, les optimums de croissance et de biosynthèse sont obtenus pour 91 mg.l^{-1} d'azote nitrique apporté sous forme de KNO_3 et pour 182 mg.l^{-1} apporté sous forme de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$. En outre, le nitrate de calcium permet d'obtenir une meilleure croissance et une accumulation plus importante des anthocyanines pour des concentrations en azote nitrique supérieures à $60,5 \text{ mg.l}^{-1}$. Des fortes doses de nitrate de potassium sont toxiques. En prolongeant le temps de culture, la croissance augmente mais il y a dégradation du contenu anthocyanique quand les colonies sont repiquées en présence de KNO_3 et de 30 grammes de saccharose par litre. (Figure 26).

Une diminution de la concentration en azote permet d'obtenir une légère augmentation de l'accumulation des anthocyanes si l'azote est ajouté aux milieux sous forme de nitrate de calcium. Cependant il n'y a aucune amélioration de la croissance des colonies tissulaires.

Cette expérience apporte quelques renseignements sur la nature des composés azotés qui peuvent favoriser la biosynthèse des anthocyanines. Cependant, les résultats sont peu comparables car les milieux contenant 182 mg par litre d'azote nitrique, n'ont pas la même concentration en calcium. Le fait d'équilibrer en calcium les milieux contenant 1313 mg de KNO_3 par litre ($\text{N-NO}_3^- = 182 \text{ mg.l}^{-1}$), ne permet pas d'améliorer la biosynthèse des anthocyanines et la croissance des colonies tissulaires.

Pour pouvoir étudier l'action de la nutrition azotée, nous avons choisi de faire varier la concentration totale d'azote du milieu de base afin de pouvoir équilibrer plus facilement les milieux de culture

2) Variation de la concentration totale d'azote minéral du milieu de base.

La quantité totale d'azote minéral (420 mg.l^{-1}) du milieu de base est fournie par KNO_3 ($\text{N-NO}_3^- = 182 \text{ mg.l}^{-1}$), $\text{Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($\text{N-NO}_3^- = 70 \text{ mg.l}^{-1}$) et NH_4NO_3 ($\text{N-NO}_3^- = 84 \text{ mg.l}^{-1}$ et $\text{N-NH}_4^+ = 84 \text{ mg.l}^{-1}$). Pour cette étude, nous avons fait varier la concentration totale en azote minéral du milieu de base de 0 à 840 mg.l^{-1} .

Les essais préliminaires ont permis de constater que le fait d'équilibrer les milieux de culture en KCl et en $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à partir des concentrations en K^+ et Ca^{++} de KNO_3 et $\text{Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ utilisées pour obtenir 840 mg d'azote par litre, occasionne de grandes variations au niveau de la croissance des colonies tissulaires et de la biosynthèse des anthocyanines.

Nous avons équilibré les milieux de culture en ajoutant du KCl et du $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ aux milieux dont la concentration en azote est inférieure à 420 mg.l^{-1} . Ceci a été réalisé de la manière suivante:

Azote minéral mg.l^{-1}		0	105	210	315	420	840
KNO_3	mg.l^{-1}	0	328,25	656,5	984,75	1313	2626
$\text{Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	mg.l^{-1}	0	147,5	295	442,5	590	1180
NH_4NO_3	mg.l^{-1}	0	120	240	360	480	960
KCl	mg.l^{-1}	1048	801	559	317	74,5	0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	mg.l^{-1}	367,5	276	184	92	0	0

		SACCHAROSE g.l ⁻¹						
		10	20	30	40	50	60	
T ₁ AZOTE MINERAL mg.l ⁻¹	840	A	0,41	0,66	1,33	1,16	1,2	0,85
		B	7	12	32	34	39	32
		C	98,29	98,18	97,59	97,06	96,75	96,23
	420		0,65	0,8	1,25	1,05	0,91	0,81
			10	16	28	27	27,4	28
			98,46	98	97,76	97,42	96,99	96,54
	315		0,49	0,83	1,13	0,95	0,8	0,74
			6	15	26	24	23	24
			98,77	98,19	97,69	97,47	97,12	96,75
	210		0,4	0,8	0,86	0,75	0,46	0,38
			3,2	11	18	17,4	12	10
			99,2	98,62	97,9	97,68	97,39	97,36
105		0,31	0,72	0,69	0,58	0,43	0,23	
		3	9	12	11,4	10	6	
		99,03	98,75	98,26	98,03	97,67	97,39	
T ₂ AZOTE MINERAL mg.l ⁻¹	840	A	0,69	1,1	1,7	1,5	1,35	1,1
		B	12	23	45	46	46	44
		C	98,26	97,91	97,35	96,93	96,59	96
	420		0,85	1,2	1,53	1,4	1,35	1,26
			14	21	29,2	34	36	38
			98,35	98,25	98,09	97,57	97,33	96,98
	315		0,62	1,1	1,42	1,26	1,07	0,9
			9	19	26	28	26	25
			98,54	98,27	98,17	97,77	97,57	97,22
	210		0,6	0,86	1,2	1,1	0,97	0,84
			6	14	22	24	22	20
			99	98,37	98,16	97,81	97,73	97,62
105		0,68	0,72	0,9	0,86	0,6	0,43	
		6	10	13	15	12	10	
		99,11	98,61	98,55	98,25	98	97,67	

Tableau 10 : - Influence de la concentration en azote minéral et de la concentration en saccharose sur la croissance des colonies tissulaires.



A - Poids moyen de matière fraîche (grammes).

B - Poids moyen de matière sèche (milligrammes).

C - Pourcentage en eau des colonies tissulaires.

Les mesures sont effectuées après quatorze jours (T₁) et vingt jours de culture (T₂).

Pour chaque dose d'azote minéral, nous avons fait varier la concentration en saccharose de 0 à 60 g.l⁻¹.

Les extractions sont réalisées après quatorze et vingt jours de culture.

Les colonies tissulaires repiquées sur les milieux de culture exempts de sucre ou d'azote minéral ou de ces deux composés réunis, survivent quelques jours puis se nécrosent.

Les valeurs des poids moyens de matière fraîche des colonies âgées de quatorze et vingt jours, nous montrent qu'une diminution ou une augmentation de la teneur en azote, ne déplace pas l'optimum de croissance. Pour chaque condition, l'optimum de croissance est obtenu lorsque les colonies tissulaires sont mises en culture sur les milieux additionnés de 30 grammes par litre de saccharose (Tableau 10).

De plus, si nous considérons les poids moyens de matière sèche et les pourcentages en eau des colonies tissulaires repiquées en présence de 30 à 60 grammes de saccharose par litre, nous pouvons observer que la croissance est d'autant plus importante que la concentration en azote minéral est élevée (Tableau 10). Les résultats sont plus variables quand les colonies sont mises en culture sur les milieux additionnés de 10 et 20 grammes par litre de saccharose.

Avec 840 mg d'azote minéral par litre, les colonies tissulaires continuent de croître après vingt jours de culture. Cependant les résultats obtenus sont hétérogènes car les tissus s'écrasent

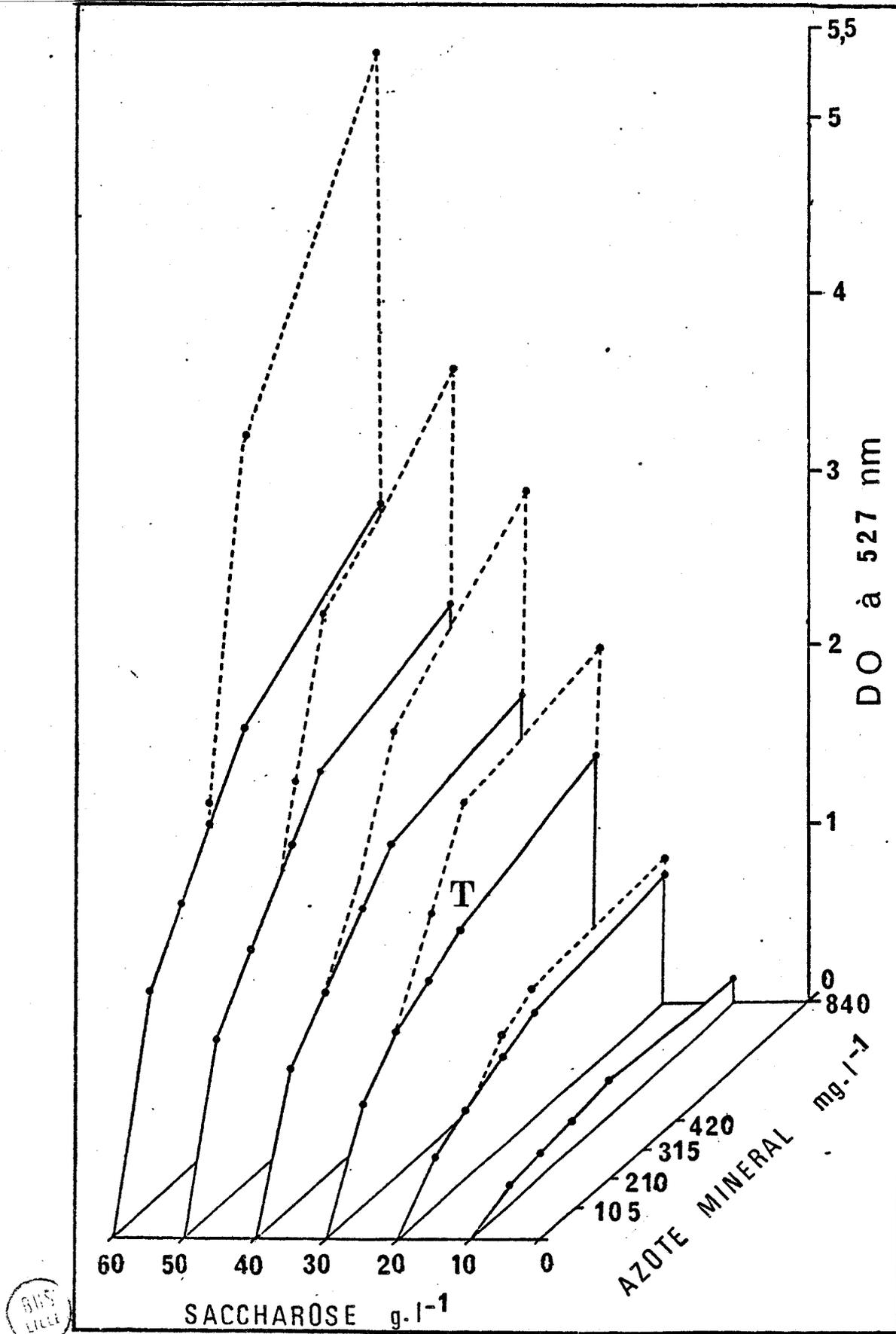


Figure 27 : - Influence de la concentration en azote minéral du milieu de base et de la concentration en saccharose sur l'accumulation des anthocyanines. Les extractions sont réalisées après 14 jours ●—● et 20 jours de culture ●-----●

La densité optique obtenue en dosant les anthocyanines contenues dans 10 g de feuilles de chou rouge est de 6,8.

sur les couvercles des boîtes de Pétri et des nécroses apparaissent au niveau des zones de contact.

Après quatorze jours de culture, l'accumulation des anthocyanines est d'autant plus importante que les concentrations en saccharose et en azote minéral sont élevées (Figure 27).

En prolongeant le temps de culture, il apparait que l'augmentation de la teneur en anthocyanines n'est importante que pour les colonies tissulaires repiquées sur les milieux dont les rapports saccharose / azote minéral sont compris entre 30/315 à 50/315 et 30/840 à 60/840 (Figure 27). Pour les autres rapports, l'accumulation des anthocyanes est très peu stimulée et semble constante.

Au-delà de vingt jours de culture, la synthèse d'anthocyanines s'effectue seulement quand les colonies tissulaires sont repiquées en présence de fortes doses de saccharose (40 à 60 g.l⁻¹) et d'azote minéral (420 et 840 mg.l⁻¹). Cependant, nous n'avons pas pris en considération ces résultats qui sont très hétérogènes du fait de l'écrasement des tissus anthocyaniques sur les couvercles des boîtes de Pétri.

Lors des essais de culture effectués sans équilibrer les milieux en CaCl₂, 2 H₂O, nous avons pu observer un très net ralentissement de la biosynthèse des anthocyanines. De plus, des agents chélateurs du calcium (Na₂ EGTA ou Na₂ EDTA) ralentissent ou inhibent la biosynthèse des anthocyanines. L'expérience a montré également que l'action du nitrate de calcium à l'égard de la biosynthèse des anthocyanines est plus favorable que celle du nitrate

de potassium.

Nous avons poursuivi nos expériences en étudiant l'influence du calcium et l'influence du rapport - Ca^{++} / quantité d'azote minéral - sur la croissance des colonies tissulaires et la biosynthèse des anthocyanines.

3) Influence du calcium et de la quantité d'azote minéral

En faisant varier la concentration totale d'azote minéral de 0 à 840 mg.l^{-1} , les quantités de Ca^{++} apportées sous forme de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$ et $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$, pour chaque dose d'azote minéral, sont les suivantes :

Azote minéral ... mg.l^{-1}	105	210	315	420	840
apporté sous forme de					
KNO_3 mg.l^{-1}	328,25	656,5	984,75	1313	2626
NH_4NO_3 mg.l^{-1}	120	240	360	480	960
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$... mg.l^{-1}	147,5	295	442,5	590	1190
Milieux équilibrés avec:					
KCl mg.l^{-1}	801	559	317	74,5	0
$\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ mg.l^{-1}	276	184	92	0	0
mg.l^{-1} de Ca^{++} apportés					
sous forme de:					
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$	25	50	75	100	200
$\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	75	50	25	0	0
Rapport Ca^{++} / N	$\frac{100}{105}$	$\frac{100}{210}$	$\frac{100}{315}$	$\frac{100}{420}$	$\frac{200}{840}$

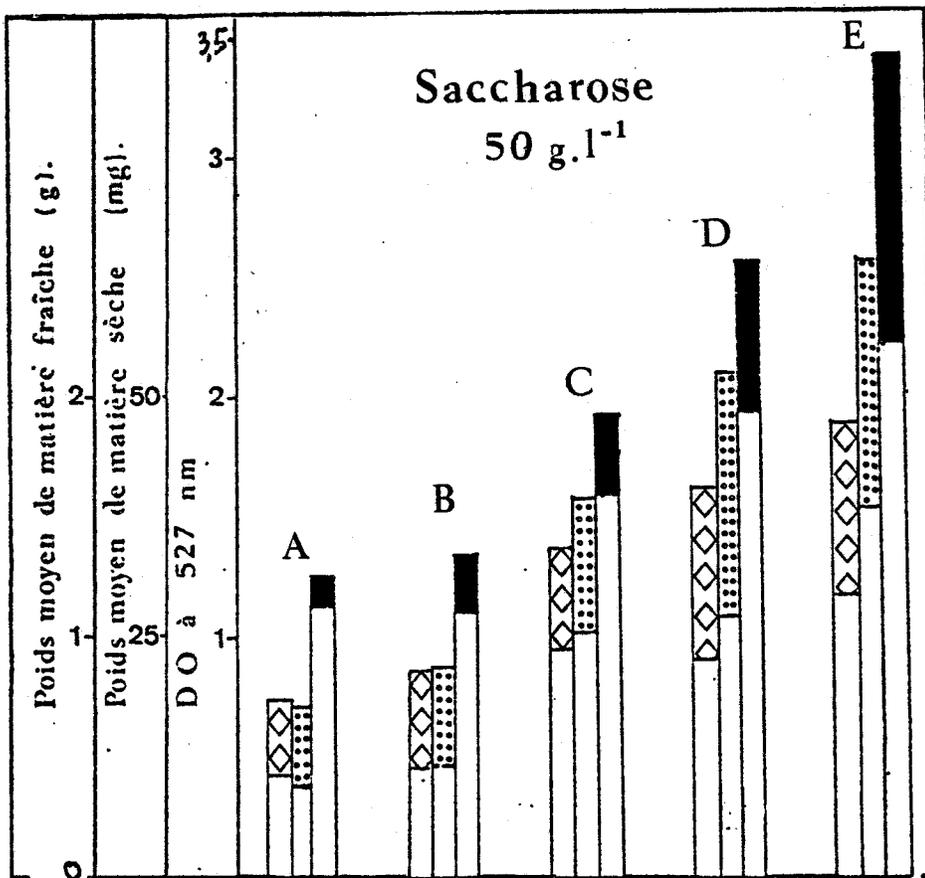
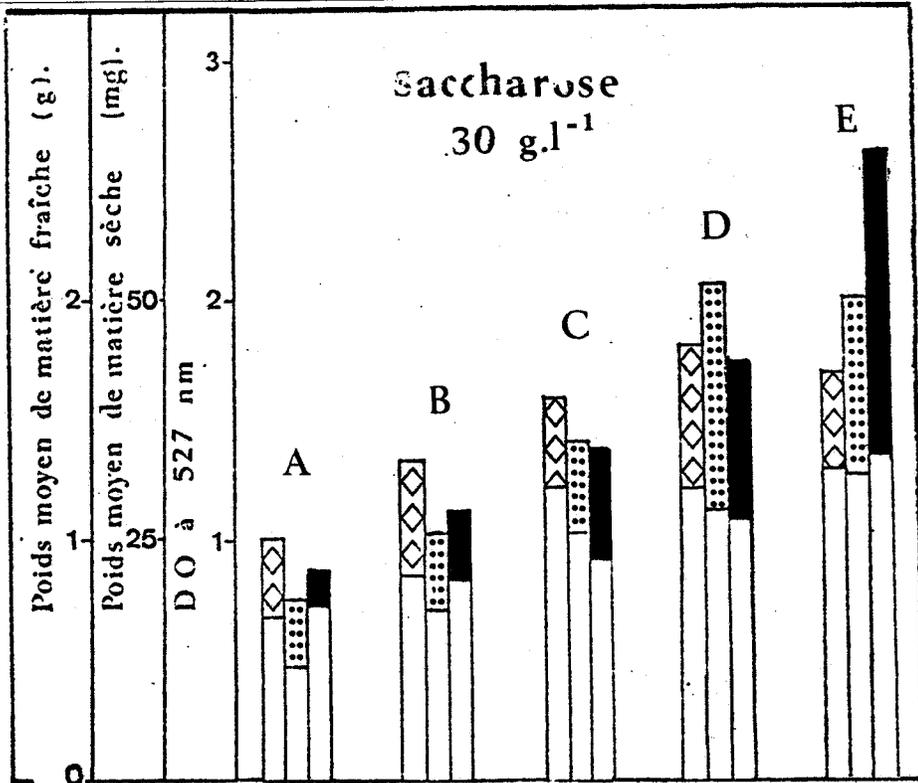


Figure 28 : - Evolution de la teneur en anthocyanines et de la croissance des colonies tissulaires en fonction de la concentration en saccharose et du rapport Ca⁺⁺/ N

BUS
LILLE

	Rapports Ca ⁺⁺ / N				
	A	B	C	D	E
	80	120	140	180	280
	105	210	315	420	840
	100	100	100	100	200
	105	210	315	420	840

Les extractions sont réalisées après 14 jours de culture.

Nous avons cherché si la variation de quantité de Ca^{++} exerce une influence sur la croissance des colonies tissulaires et l'accumulation des anthocyanines.

A cet effet, nous avons fait varier la teneur en Ca^{++} apporté sous forme de $\text{CaCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$, de 25 à 300 mg.l^{-1} pour chaque concentration en azote minéral (105, 210, 315, 420 et 840 mg.l^{-1}). Les essais préliminaires nous ont permis de constater que la variation de la quantité de Ca^{++} n'occasionne aucune amélioration de la biosynthèse des anthocyanines par les colonies tissulaires repiquées sur les divers milieux additionnés de 10 grammes de saccharose par litre. Pour cette étude, nous avons utilisé le saccharose aux doses de 30 et 50 g.l^{-1} .

Si nous nous référons à la quantité totale de Ca^{++} (apportée sous forme de $\text{CaCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$ et $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4 \text{H}_2\text{O}$), les optimums de croissance et de biosynthèse sont obtenus pour les rapports de $\text{Ca}^{++} / \text{N}$ suivants :

- Azote minéral mg.l^{-1}	105	210	315	420	840
- mg.l^{-1} de Ca^{++} apportés					
sous forme de: $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	55	60	65	80	80
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$	25	50	75	100	200
- Rapports $\text{Ca}^{++} / \text{N}$	$\frac{80}{105}$	$\frac{110}{210}$	$\frac{140}{315}$	$\frac{180}{420}$	$\frac{280}{840}$

Dans tous les cas, la synthèse des anthocyanines est considérablement augmentée si nous comparons les résultats à ceux obtenus quand les colonies tissulaires sont repiquées sur les milieux de référence (Figure 28). La croissance est également favorisée si nous nous référons d'une part aux poids moyens de matière fraîche et de matière sèche (Figure 28) et d'autre part aux pourcentages

Rapport Ca^{++}/N	100/105	100/210	100/315	100/420	200/840
Saccharose 30 g.l ⁻¹	98.26	97.91	97.89	97.74	97.59
Saccharose 50 g.l ⁻¹	97.69	97.41	97.29	96.99	96.72
Rapport Ca^{++}/N	80/105	120/210	140/315	180/420	280/840
Saccharose 30 g.l ⁻¹	98.13	98.09	97.84	97.15	97.08
Saccharose 50 g.l ⁻¹	97.56	97.45	97.08	96.74	96.6

Tableau 11 : - Influence de la concentration en saccharose et du rapport Ca^{++}/N sur la teneur en eau des colonies tissulaires âgées de quatorze jours.

././././././././.

saccharose g.l ⁻¹	Azote minéral mg.l ⁻¹				
	105	210	315	420	840
30	A. 47,18	58,4	31,23	46,82	29,12
	B. 58,33	44,44	34,61	85,71	56,25
	C. 12,09	34,88	51,02	60,12	91,58
50	70,9	86,02	42,91	78,9	60,9
	80	83,33	53,84	93,43	66,66
	10,04	20,21	21,32	32,44	54,73

Tableau 12 : - Pourcentages d'augmentation des poids moyens de matière fraîche (A), de matière sèche (B) et de la teneur en anthocyanes (C) en fonction de la concentration en azote minéral et de la concentration en saccharose.



en eau des colonies (Tableau 11).

L'accroissement de matière fraîche et de matière sèche est variable suivant la concentration en azote minéral et le rapport Ca^{++}/N . Par contre, l'augmentation de la teneur en anthocyanines est d'autant plus élevée que la dose d'azote minéral est plus forte.

Cependant, après quatorze jours de culture, nous pouvons constater d'une part que la croissance est nettement plus favorisée lorsque les colonies tissulaires sont repiquées sur les milieux additionnés de 50 grammes par litre de saccharose et d'autre part que les pourcentages d'augmentation de la teneur en anthocyanines sont plus élevés quand il y a 30 grammes par litre de saccharose (Tableau 12).

Pour suivre l'évolution de la croissance et de l'accumulation des anthocyanines, nous n'avons pas pu prolonger le temps de culture car les tissus superficiels des colonies se nécrosent en s'écrasant sur les couvercles des boîtes de Pétri.

Nous avons mesuré les quantités restantes de nitrate dans les milieux de culture de façon à voir si le calcium ajouté aux milieux exerce une influence sur l'absorption des nitrates par les colonies tissulaires.

Les dosages des nitrates sont effectués après 4, 6, 8, 11 et 14 jours de culture à partir des milieux gélosés dont les concentrations initiales en azote minéral sont de 420 et 840 $mg.l^{-1}$ (soit 24 et 48 micromoles de nitrate par millilitre de

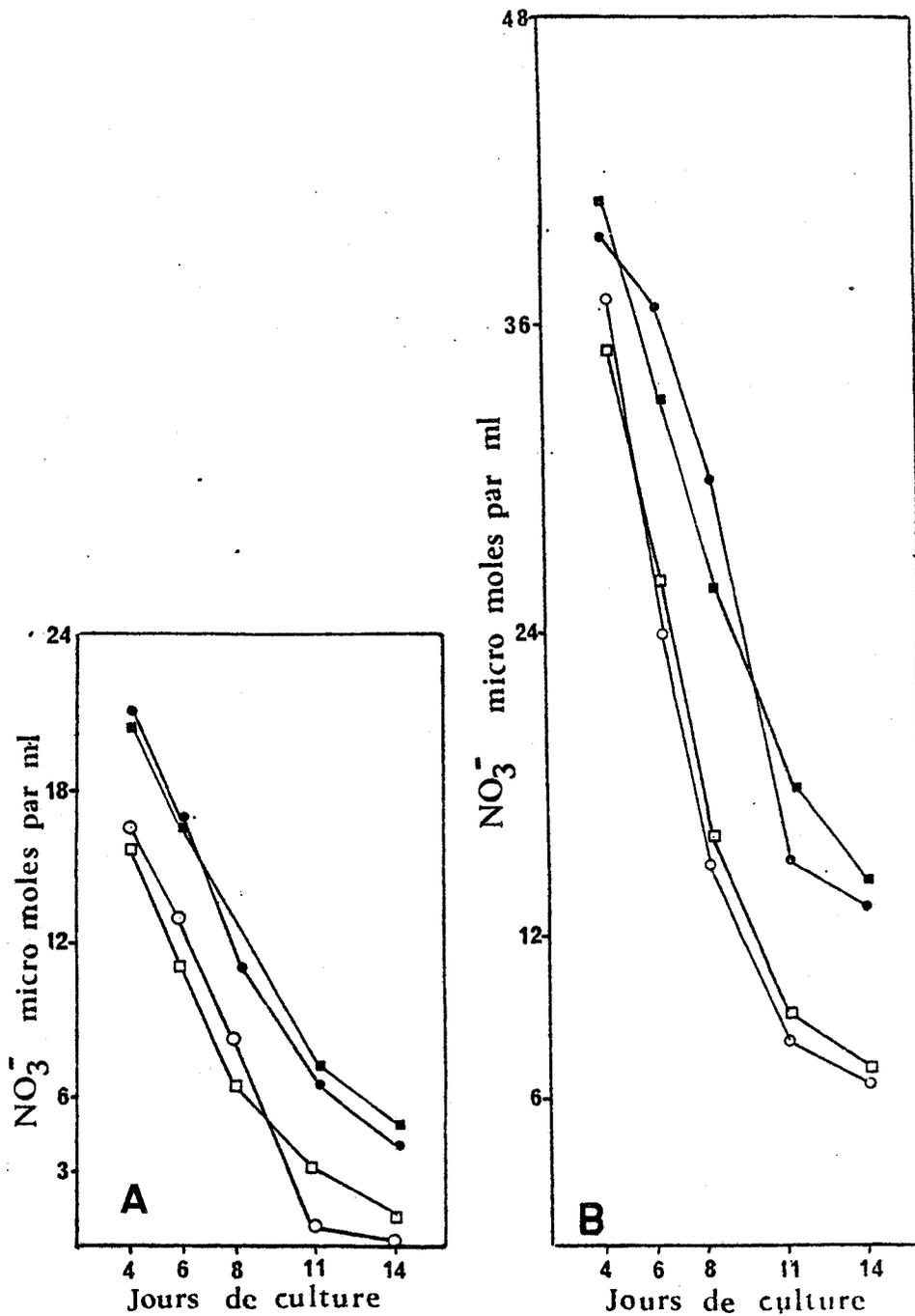


Figure 29 : - Evolution de la quantité de nitrates dans les milieux de culture contenant initialement :

Fig:	Symbol	NO ₃ ⁻ micro moles par ml	(Rapport Ca ⁺⁺ / N)	saccharose
A	■	24	(100/420)	30 g.ml ⁻¹
	●	24	(100/420)	50 "
	□	24	(180/420)	30 "
	○	24	(180/420)	50 "
B	■	48	(200/840)	30 "
	●	48	(200/840)	50 "
	□	48	(280/840)	30 "
	○	48	(280/840)	50 "



milieu) et dont les rapports en Ca^{++}/N sont de 100/420, 180/420, 200/840 et 280/840.

D'après ces dosages, nous pouvons penser que la consommation des nitrates par les colonies tissulaires, est d'autant plus importante que le temps de culture est long et que la concentration en azote nitrique est élevée (Figure 29).

L'addition de calcium aux milieux favorise certainement la consommation des nitrates. Au quatorzième jour de culture, il n'y a presque plus de nitrates dans les milieux qui en contiennent initialement 24 micromoles par millilitre. Pour 48 micromoles par millilitre, les quantités restantes sont consommées au cours du temps. Cependant, à partir du seizième jour de culture, les résultats du dosage des nitrates se sont révélés très hétérogènes du fait de la diminution de la quantité de milieu gélosé dans les boîtes de Pétri. De plus, nous pouvons constater qu'il y a peu d'écart entre les quantités restantes de nitrate dans les milieux suivant que ces derniers soient additionnés de 30 ou 50 grammes par litre de saccharose (Figure 29).

De ces expériences, nous pouvons conclure d'une part que la dose de saccharose exerce une influence sur la biosynthèse des anthocyanes et d'autre part qu'une augmentation de la concentration des nitrates ainsi qu'une meilleure absorption de ces composés ne ralentissent pas la biosynthèse des anthocyanes. Cependant, il nous est très difficile de mettre en évidence une relation entre la nutrition azotée et la nutrition carbonée car les résultats du dosage des sucres, se sont révélés très hétérogènes.

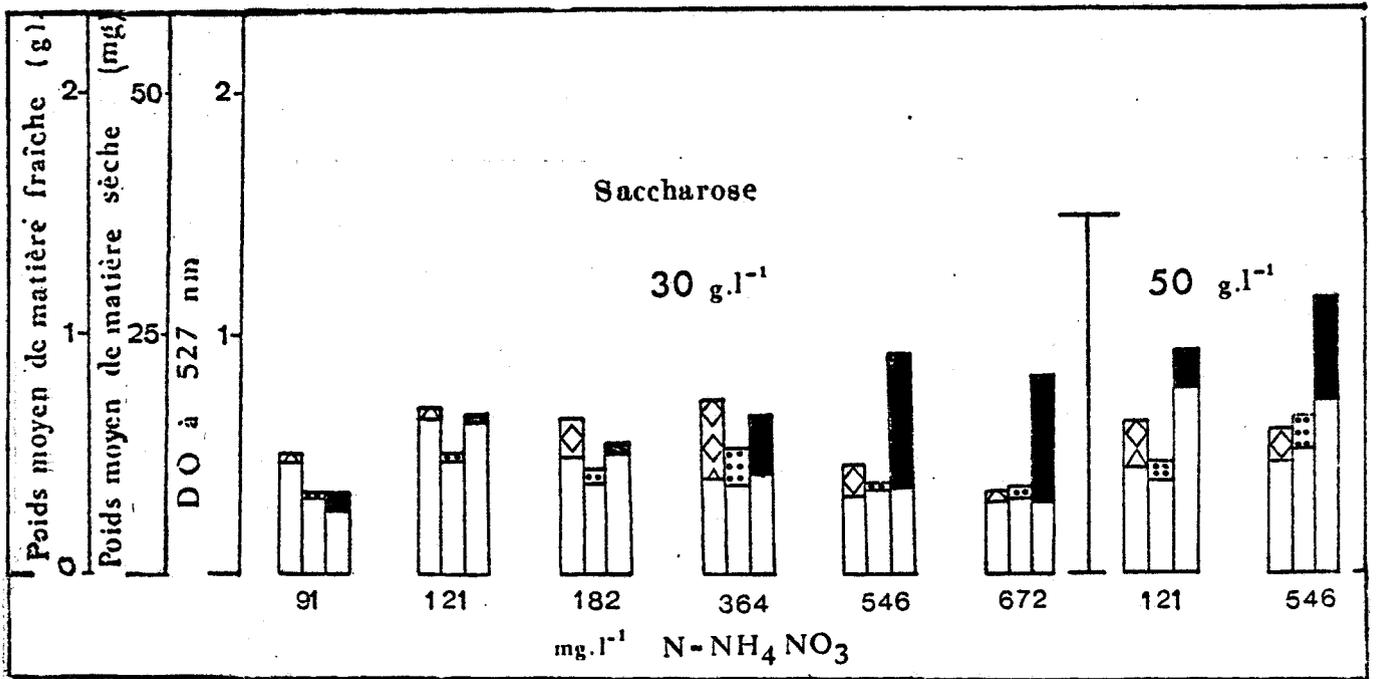
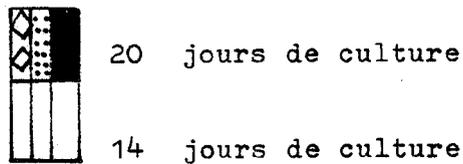


Figure 30 : - Influence du nitrate d'ammonium et du saccharose sur la croissance des colonies tissulaires et l'accumulation des anthocyanines. Les mesures et les extractions sont réalisées après :



3) Action combinée du nitrate de calcium et du nitrate d'ammonium

De nombreuses recherches ont permis d'établir qu'une diminution de la concentration en nitrate et une augmentation de la quantité de sucre favorisent la biosynthèse des composés phénoliques et plus particulièrement la biosynthèse des anthocyanes par les plantules de chou rouge.

Dans nos expériences, il est tout d'abord apparu que la stimulation de la biosynthèse des anthocyanes peut être obtenue d'une part avec un taux élevé d'azote minéral et de sucre dans le milieu de culture et augmentée d'autre part lorsque nous ajoutons du chlorure de calcium.

L'analyse qualitative de la nutrition azotée nous a permis de constater qu'une dose de 182 mg.l^{-1} d'azote minéral apporté sous forme de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, permet une bonne accumulation des anthocyanines, cependant la quantité d'anthocyanes est supérieure à celle obtenue lorsque les colonies tissulaires sont repiquées sur le milieu de base ($336 \text{ mg.l}^{-1} \text{ N-NO}_3^-$ ou 420 mg.l^{-1} d'azote total).

En outre, l'étude de l'influence du nitrate d'ammonium montre que les colonies tissulaires supportent de fortes doses de composé. Cependant, la croissance des colonies tissulaires et l'accumulation des anthocyanines restent très faibles (Figure 30)

En conservant la quantité d'azote minéral (182 mg.l^{-1})

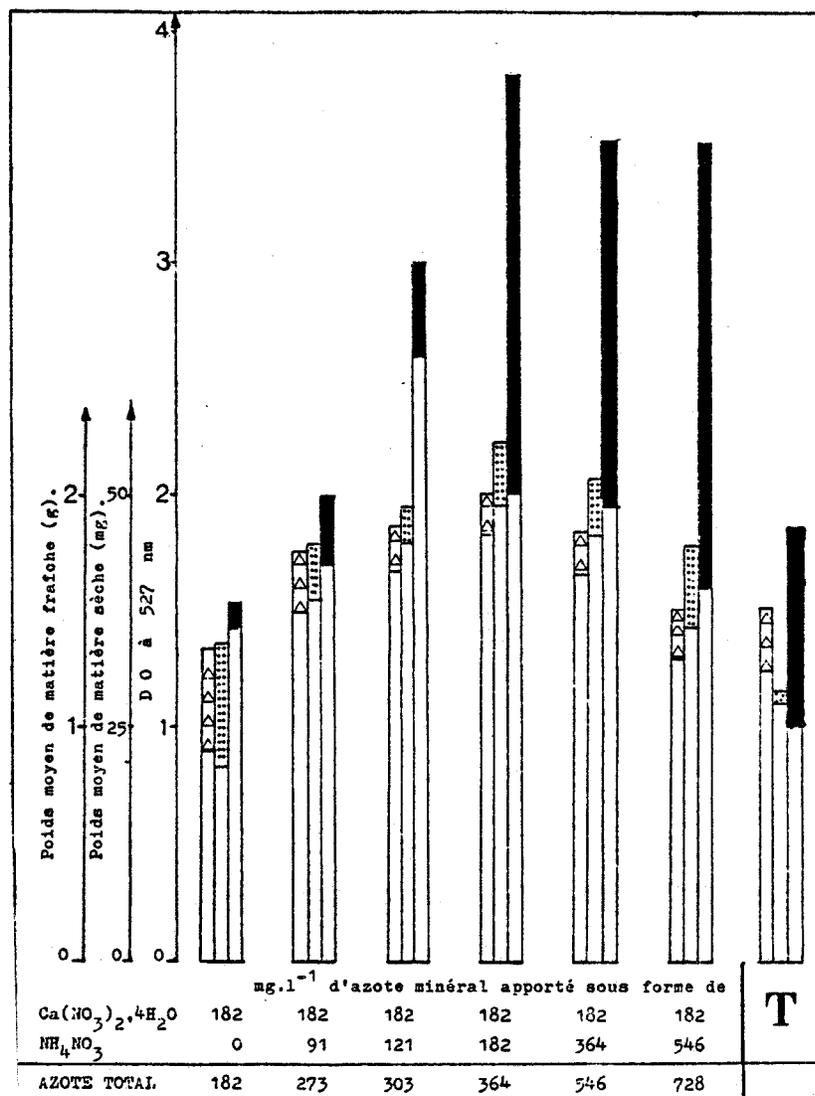
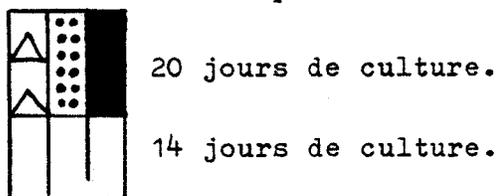


Figure 31 - Influence de la concentration en azote minéral apporté sous forme de nitrate de calcium et de nitrate d'ammonium sur l'accumulation des anthocyanines et la croissance des colonies tissulaires repiquées sur les milieux de culture additionnés de 30 grammes par litre de saccharose. Les mesures sont effectuées après :



T- Valeurs obtenues quand les colonies tissulaires sont repiquées sur le milieu de base (420 mg.l⁻¹ d'azote minéral, 30 g.l⁻¹ de saccharose.

— Densité optique obtenue en dosant les anthocyanines contenues dans 10 g de feuilles de chou rouge : DO = 6,8.

apporté sous forme de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$, nous avons fait varier la concentration en nitrate d'ammonium de façon à voir s'il existe une concentration en azote total, inférieure à celle du milieu de base (420 mg.l^{-1}), qui favorise l'accumulation des anthocyanines.

Les milieux de culture sont composés de la manière suivante :

mg.l^{-1} d'azote minéral apportés sous forme de :

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2, 4\text{H}_2\text{O}$ -	182	182	182	182	182	182
NH_4NO_3 -	0	91	121	182	364	546
Azote total -	182	273	303	364	546	728

Les milieux de culture sont additionnés de KCl ($968,5\text{ mg.l}^{-1}$).

Afin d'éviter de grandes variations au niveau de la croissance et de la biosynthèse des anthocyanines, nous avons ajouté de la L^+ glutamine (50 mg.l^{-1}) et de l'hydrolysate de caséine (150 mg.l^{-1}) aux milieux de culture.

Les cultures sont placées dans les conditions standards (photopériode 18 : 6, quantité d'énergie lumineuse = $19000\text{ Erg.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$, température = 23°C).

Au quatorzième jour de culture, l'optimum de biosynthèse est obtenu pour 303 mg.l^{-1} d'azote minéral et celui de croissance pour 364 mg.l^{-1} d'azote minéral (Figures 31,32). Au vingtième jour, les optimums de croissance et de biosynthèse sont obtenus pour la même concentration en azote minéral (364 mg.l^{-1}).

Suivant le temps de culture, quatorze ou vingt jours, l'accumulation des anthocyanines est stabilisée pour des concentrations en azote minéral supérieures à 303 ou 364 mg.l^{-1} (Figures 31, 32).

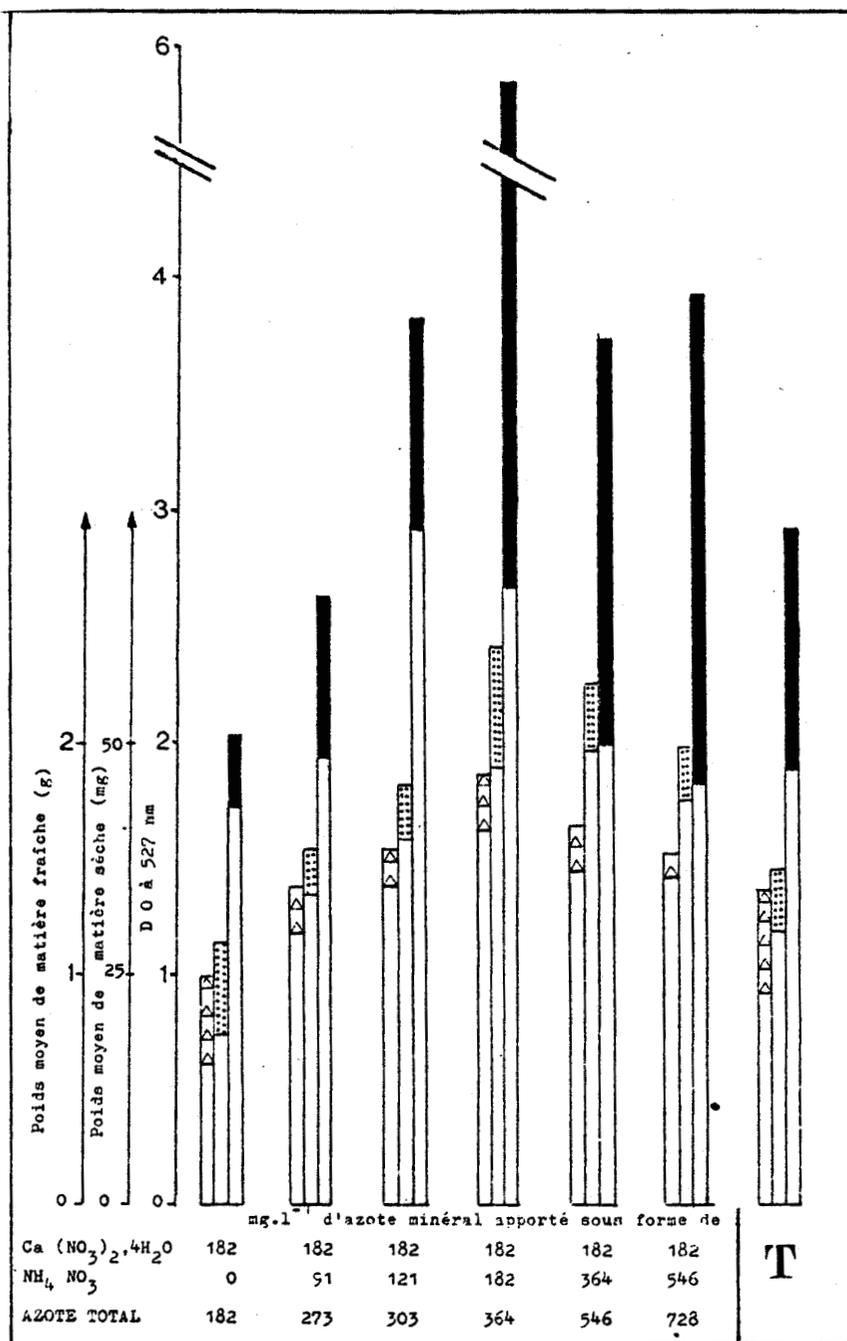


Figure 32 - Influence de la concentration en azote minéral apporté sous forme de nitrate de calcium et de nitrate d'ammonium sur l'accumulation des anthocyanines et la croissance des colonies tissulaires repiquées sur les milieux additionnés de 50 grammes par litre de saccharose. Les mesures sont effectuées après :



20 jours de culture.

14 jours de culture.

T - Valeurs obtenues quand les colonies tissulaires sont repiquées sur le milieu de base (420 mg.l⁻¹ d'azote minéral, 50 g.l⁻¹ de saccharose.

- Densité optique obtenue en dosant les anthocyanines contenues dans 10 g de feuilles de chou rouge : DO = 6,8.

BUS
LILLE

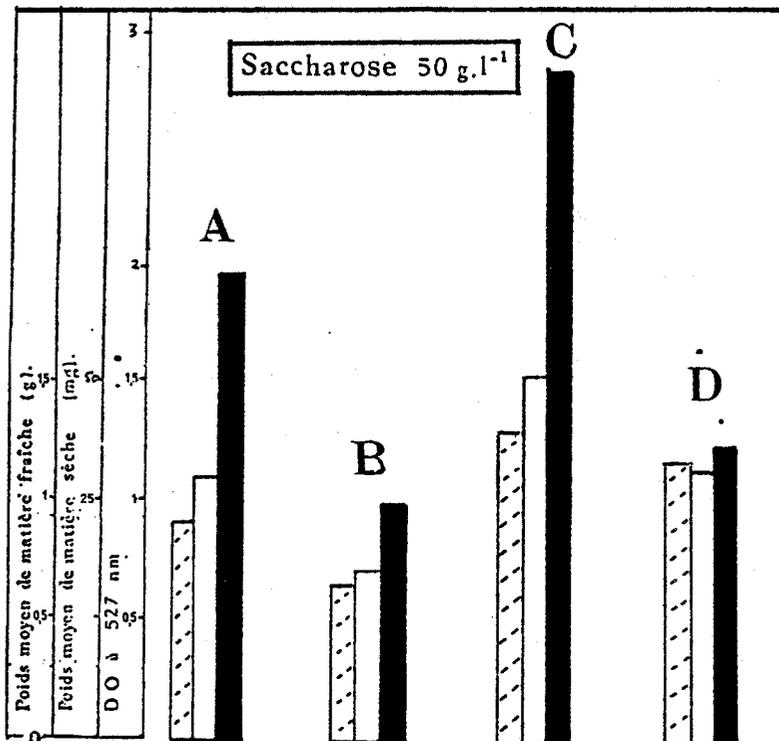
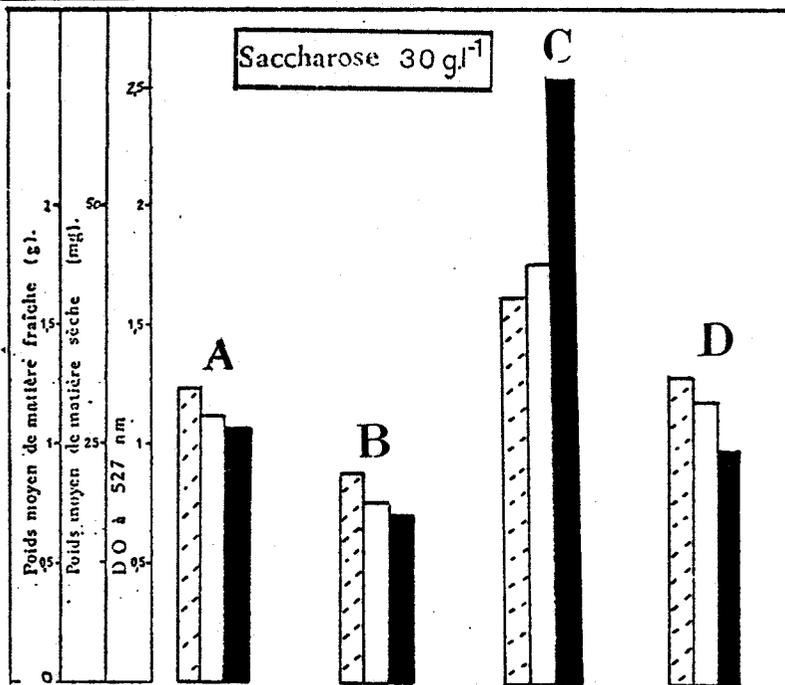


Figure 33 : - Influence de l'hydrolysate de caséine (150 mg.l^{-1}) et de la L^+ glutamine (50 mg.l^{-1}) sur l'accumulation des anthocyanines et la croissance des colonies tissulaires âgées de 14 jours.

A - milieu de base (420 mg.l^{-1} d'azote minéral) additionné de L^+ glutamine et d'hydrolysate de caséine

B - milieu de base exempt de L^+ glutamine et d'hydrolysate de caséine.

C - milieu de culture additionné de 303 mg.l^{-1} d'azote minéral (apporté sous forme de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ et NH_4NO_3), de L^+ glutamine et d'hydrolysate de caséine.

D - milieu de culture additionné de 303 mg.l^{-1} d'azote minéral et exempt de L^+ glutamine et d'hydrolysate de caséine.

En prolongeant le temps de culture au delà de vingt jours, nous avons pu observer que l'accumulation des anthocyanines augmente quand les colonies tissulaires sont repiquées en présence de fortes doses d'azote (de 363 à 728 mg.l⁻¹ d'azote total). Les résultats obtenus sont cependant très hétérogènes car les colonies tissulaires se nécrosent en s'écrasant sur les couvercles des boîtes de Pétri.

Une diminution de la concentration en azote minéral peut favoriser l'accumulation des anthocyanines. Tel que l'ont constaté SHAH et MEHTA (1978), il apparait que cette augmentation soit fonction de l'équilibre entre les quantités de nitrate et d'ammonium additionnées aux milieux de culture. Cependant, les résultats sont obtenus lorsque les milieux de culture contiennent de l'hydrolysate de caséine et de la L⁺ glutamine. L'influence de ces deux composés est prépondérante puisque leur suppression occasionne une importante diminution de l'accumulation des anthocyanines quel que soit le milieu de culture sur lequel sont repiquées les colonies tissulaires (Figure 33).

Pour étudier l'influence des précurseurs, nous avons utilisé les milieux de culture qui sont dépourvus d'hydrolysate de caséine et de L⁺ glutamine

H) INFLUENCE DES PRECURSEURS

Nous avons étudié l'influence des précurseurs issus du métabolisme des glucides. Au milieu de base, nous avons ajouté 10 milligrammes par litre de phénylalanine, d'acide shikimique, d'acide cinnamique.

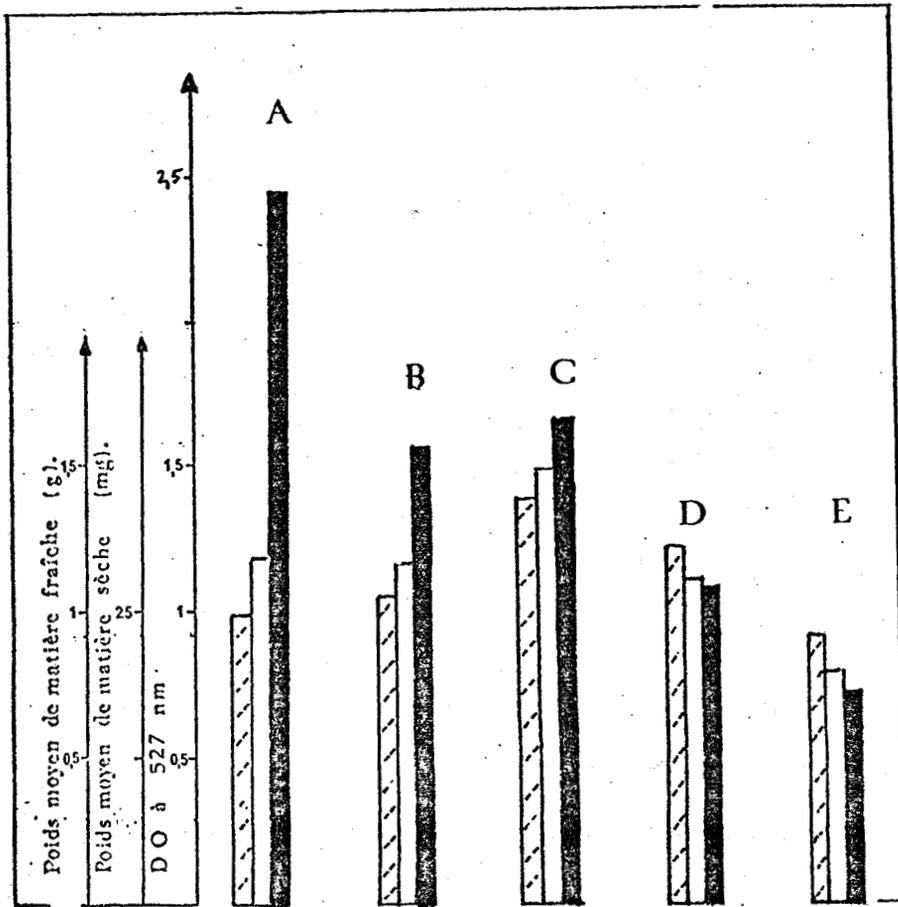


Figure 34 : - Influence des précurseurs de la synthèse des anthocyanines - **A** - phénylalanine (10 mg.l^{-1}), - **B** - acide shikimique (10 mg.l^{-1}) et - **C** - acide cinnamique (10 mg.l^{-1}), sur la croissance des colonies tissulaires et l'accumulation des anthocyanines. Les colonies sont repiquées sur le milieu de base additionné de saccharose (30 g.l^{-1}), mais exempt de L^+ glutamine et d'hydrolysate de caséine.

D - milieu de base sans précurseurs spécifiques mais additionné de L^+ glutamine et d'hydrolysate de caséine.

E - milieu de base exempt de précurseurs spécifiques de L^+ glutamine et d'hydrolysate de caséine.

Les extractions sont réalisées après quatorze jours de culture.



Les colonies tissulaires repiquées sur les milieux additionnés de 30 grammes par litre de saccharose, sont éclairées dix huit heures par jour ($19000 \text{ Erg.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Les extractions sont réalisées après quatorze jours de culture.

Par rapport aux colonies témoins, l'accumulation des anthocyanines est améliorée lorsque nous ajoutons des précurseurs spécifiques aux milieux de culture. La croissance des colonies tissulaires varie en fonction de la nature des précurseurs (Figure 34). En ne considérant que les quantités optimales d'anthocyanines élaborées, il apparaît que les effets de la phénylalanine sont meilleurs que ceux de l'acide shikimique et l'acide cinnamique.

Étant donné l'influence de la nutrition azotée et de la nutrition carbonée ainsi que le rôle des glucides dans la formation des précurseurs spécifiques de la biosynthèse des anthocyanines, nous avons également étudié l'influence de ces précurseurs en utilisant un milieu de culture moins riche en azote minéral. A cet effet, nous avons repiqué les colonies tissulaires sur le milieu contenant du $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($182 \text{ mg.l}^{-1} \text{ N} - \text{NO}_3^-$) et du NH_4NO_3 ($121 \text{ mg.l}^{-1} \text{ n} - \text{NH}_4^+ \text{NO}_3^-$) (soit au total 303 mg.l^{-1} d'azote minéral). Les essais préliminaires nous ont permis de constater qu'une dose de dix milligrammes par litre de chaque précurseurs, est suffisante pour obtenir les optimums d'accumulation des anthocyanines après quatorze jours de culture.

Les précurseurs n'entraînent qu'une faible augmentation de l'accumulation des anthocyanines si nous comparons les résultats à ceux obtenus quand les colonies tissulaires sont repiquées sur le milieu additionné de saccharose mais exempt de L^+ glutamine et d'hydrolysat de caséine. Par contre, la croissance des colonies tissulaires est favorisée.

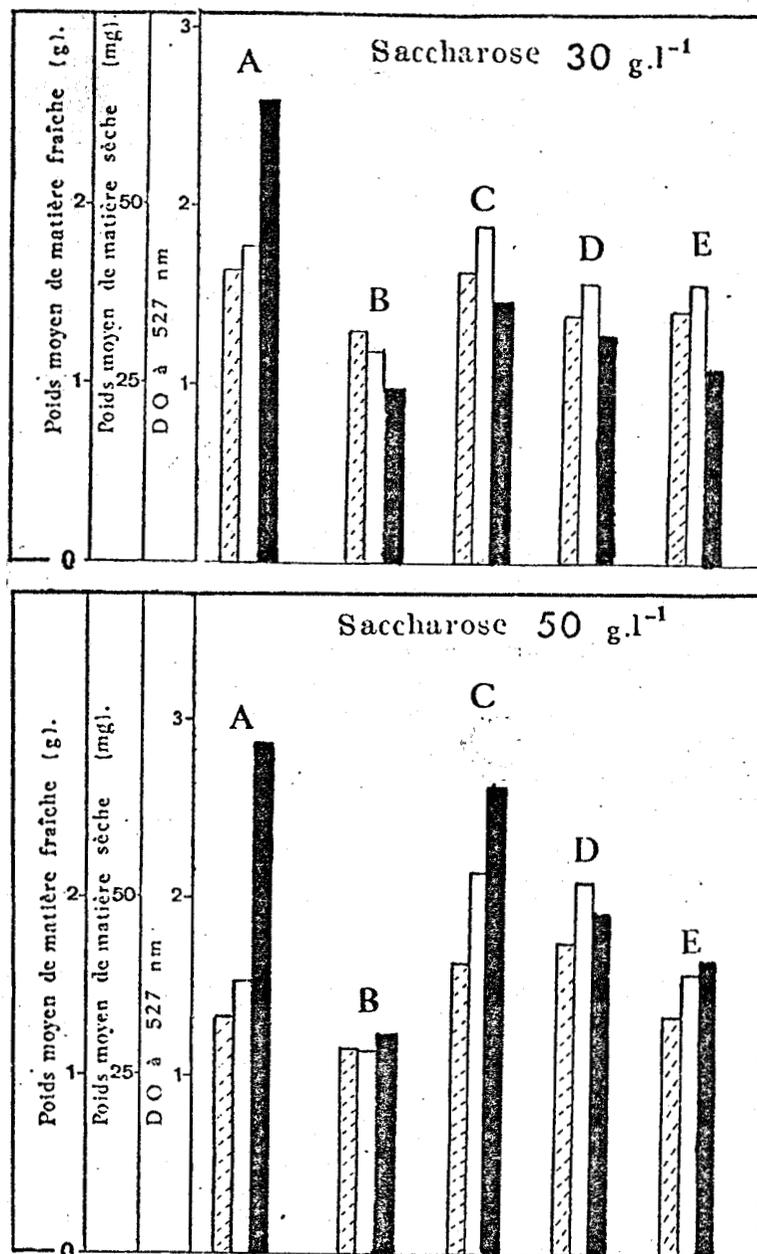


Figure 35: - Influence des précurseurs de la synthèse des anthocyanes sur la croissance et l'accumulation des anthocyanines par des colonies tissulaires repiquées sur les milieux contenant 303 mg.l⁻¹ d'azote minéral apporté sous forme de Ca(NO₃)₂.4H₂O (N-NO₃⁻ = 182 mg.l⁻¹) et NH₄NO₃ (N-NH₄⁺ NO₃⁻ = 121 mg.l⁻¹).

- A** - milieu sans précurseurs spécifiques mais additionné de L⁺ glutamine (50 mg.l⁻¹) et d'hydrolysat de caséine (150 mg.l⁻¹).
- B** - milieu exempt de précurseurs, de L⁺ glutamine et d'hydrolysat de caséine.
- milieu sans L⁺ glutamine et hydrolysat de caséine mais additionné d'acide cinnamique **C**, de phénylalanine **D**, d'acide shikimique **E**.

La concentration des précurseurs est de 10 mg.l⁻¹.

Les mesures sont effectuées après 14 jours de culture.

Les augmentations de croissance et de teneur en anthocyanines sont beaucoup plus importantes quand les colonies tissulaires sont repiquées sur les milieux additionnés de 50 grammes par litre de saccharose (Figure 35).

Dans tous les cas, nous pouvons observer que les quantités d'anthocyanines sont inférieures à celles obtenues quand les colonies tissulaires sont mises en culture sur les milieux additionnés de L⁺ glutamine et d'hydrolysate de caséine.

Avec 50 grammes par litre de saccharose et les divers précurseurs, la croissance des colonies tissulaires est nettement supérieure à celle des colonies témoins, si nous nous référons aux poids moyens de matière fraîche et de matière sèche (Figure 35). Les résultats sont plus variables quand les milieux de culture sont additionnés de 30 grammes par litre de saccharose.

Quand un milieu de culture est moins riche en azote minéral et additionné d'une faible dose de sucre, les précurseurs ont peu d'effets sur la synthèse des anthocyanines. L'action des précurseurs semble améliorée quand les colonies tissulaires sont repiquées en présence d'une forte concentration en saccharose. Cependant, les augmentations de croissance laissent supposer que le sucre fourni n'est pas en partie utilisé au niveau des chaînes de biosynthèse des anthocyanines.

I) INFLUENCE DES REGULATEURS DE CROISSANCE

1) Influence des composés auxiniques

Nous ne mentionnerons dans les résultats que les concentrations des divers composés auxiniques (AIA, NOA, ANA, 2,4 D) qui permettent d'obtenir les optimums de croissance et d'accumulation des anthocyanines par les colonies tissulaires repiquées sur le milieu de base additionné de saccharose (30 ou 50 g.l⁻¹).

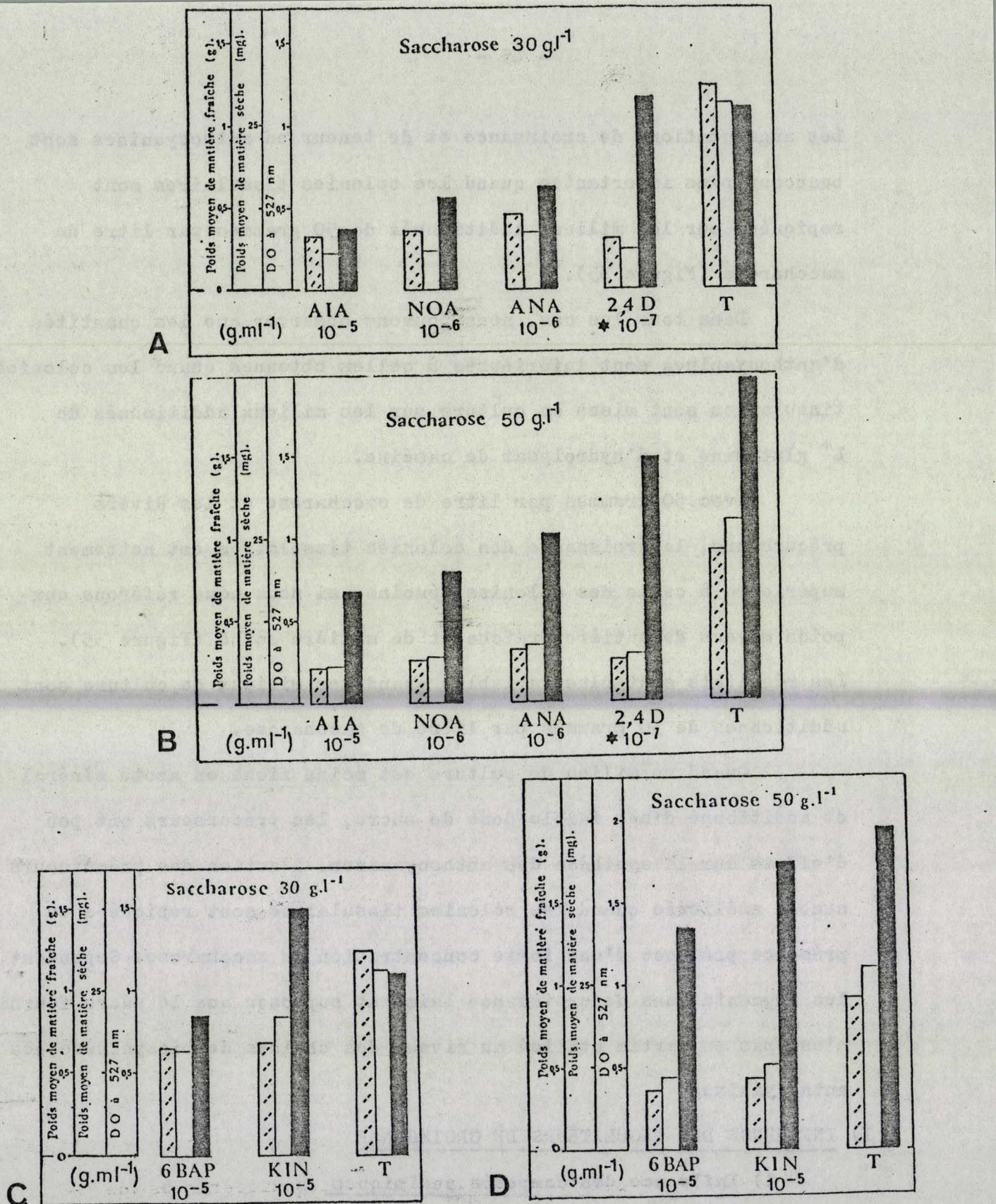


Figure 36 : - Influence des composés auxiniques (A et B) et des cytokinines (C et D) sur la croissance des colonies tissulaires et l'accumulation des anthocyanines. T = valeurs témoin obtenues pour des colonies repiquées sur le milieu de base additionné de 6 BAP ($5 \cdot 10^{-6}$ g.ml⁻¹) et d'ANA (10^{-6} g.ml⁻¹). Les extractions sont réalisées après 14 jours de culture.

- * : Valeurs obtenues au second passage

Les extractions sont réalisées après quatorze jours de culture.

Les optimums de croissance et de biosynthèse sont obtenus lorsque nous ajoutons au milieu de base, 10^{-5} g.ml⁻¹ d'AIA, 10^{-6} g.ml⁻¹ de NOA, 10^{-6} g.ml⁻¹ d'ANA ou 10^{-7} g.ml⁻¹ de 2,4 D. Avec le 2,4 D, les valeurs mentionnées dans la figure 36, sont celles obtenues au second passage. Au cours des passages ultérieurs, nous avons constaté que l'accumulation des anthocyanines est d'une part plus faible et d'autre part inférieure à celle obtenue avec les autres composés auxiniques. En outre, le 2,4 D augmente la friabilité des colonies tissulaires.

2) Action des cytokinines

Les colonies tissulaires sont sensibles à l'action de la kinétine et de la 6 benzyl aminopurine. Cette action, par rapport à celle des composés auxiniques, se traduit par une augmentation de l'accumulation des anthocyanines et de la croissance des colonies tissulaires.

Les optimums de croissance et de biosynthèse sont obtenus pour une concentration de 10^{-5} g.ml⁻¹ de 6 benzyl aminopurine ou de kinétine. Cependant, les effets de la kinétine à l'égard de la biosynthèse des anthocyanes, sont plus importants que ceux de la 6 benzyl aminopurine (Figure 36). Les différences de croissance sont faibles suivant la nature des cytokinines.

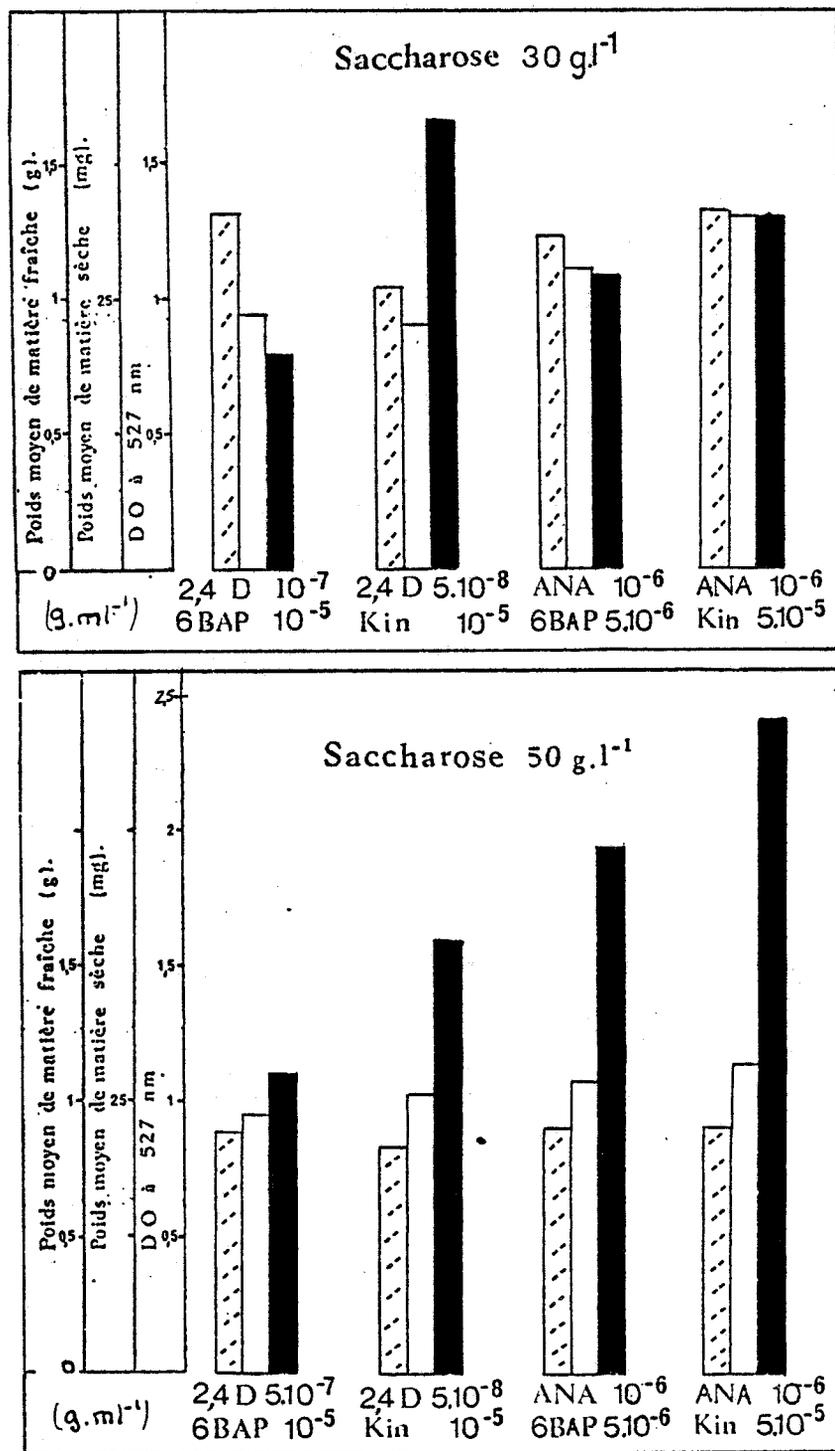


Figure 37 : - Action conjuguée des composés auxiniques et des cytokinines sur la croissance des colonies tissulaires et l'accumulation des anthocyanines. Les mesures sont effectuées après quatorze jours de culture.



3) Intéactions entre les cytokinines et les composés auxiniques.

Pour cette étude, nous avons associé les régulateurs de croissance suivants: 2,4 D - 6 BAP ; 2,4 D - Kin ; ANA - 6 BAP et ANA - Kin.

Les optimums de croissance et de biosynthèse sont obtenus lorsque les associations en régulateurs de croissance sont réalisées aux concentrations suivantes:

2,4 D	10^{-7}	g.ml ⁻¹	2,4 D	$5 \cdot 10^{-8}$	g.ml ⁻¹
6 BAP	10^{-5}	g.ml ⁻¹	Kin	10^{-5}	g.ml ⁻¹
ANA	10^{-6}	g.ml ⁻¹	ANA	10^{-6}	g.ml ⁻¹
6 BAP	$5 \cdot 10^{-6}$	g.ml ⁻¹	Kin	$5 \cdot 10^{-5}$	g.ml ⁻¹

Dans tous les cas, l'association d'une cytokinine au 2,4 D ou à l'ANA, favorise la croissance des colonies tissulaires et l'accumulation des anthocyanines si nous comparons les résultats à ceux obtenus lorsque nous ajoutons séparément les régulateurs de croissance dans les milieux de culture. Cependant, les résultats sont plus homogènes quand les colonies sont repiquées sur le milieu de base additionné de 50 grammes de saccharose par litre (Figure 37). Si le 2,4 D est conjugué à une cytokinine, nous pouvons effectuer plusieurs passages sans qu'il y ait inhibition de la biosynthèse, comme nous avons pu le constater lorsque nous ajoutons uniquement du 2,4 D au milieu de culture.

En associant l'AIA ou le NOA à la 6 BAP ou la kinétine les résultats sont très variables en ce qui concerne l'accumulation des anthocyanines.

QUATRIEME PARTIE

A) IDENTIFICATION DES ANTHOCYANINES PAR CHROMATOGRAPHIE

Le butanol acétique (BAW) et le butanol 1 HCl 2 N permettent la migration de trois composés de couleur rouge. Deux de ces composés ont des Rf très voisins suivant la nature du solvant utilisé (Tableau 13). En outre, ces substances sont présentes dans les extraits totaux et purifiés.

Si nous nous référons aux travaux de HARBORNE (1964), les Rf obtenus correspondent aux rubrobrassicines A, B et C (Tableau). Cependant, cette seule expérience ne permet pas de définir avec exactitude la nature de ces molécules.

	SOLVANT : BAW		
	RUBROBRASSICINE		
	A	B	C
Rf des anthocyanines des colonies tissulaires de chou rouge.	0,34	0,33	0,23
Rf des anthocyanines de feuille de chou rouge (d'après HARBORNE, 1964).	0,34	0,33	0,21

	SOLVANT: butanol 1 HCl 2 N		
	RUBROBRASSICINE		
	A	B	C
Rf des anthocyanines des colonies tissulaires de chou rouge.	0,22	0,15	0,13
Rf des anthocyanines de feuille de chou rouge (d'après HARBORNE, 1964).	0,21	0,15	0,13

Tableau 13 : - Valeurs des Rf des anthocyanines des colonies tissulaires de chou rouge et des anthocyanines de feuille de chou rouge, après chromatographie descendante sur papier whatman n°1.

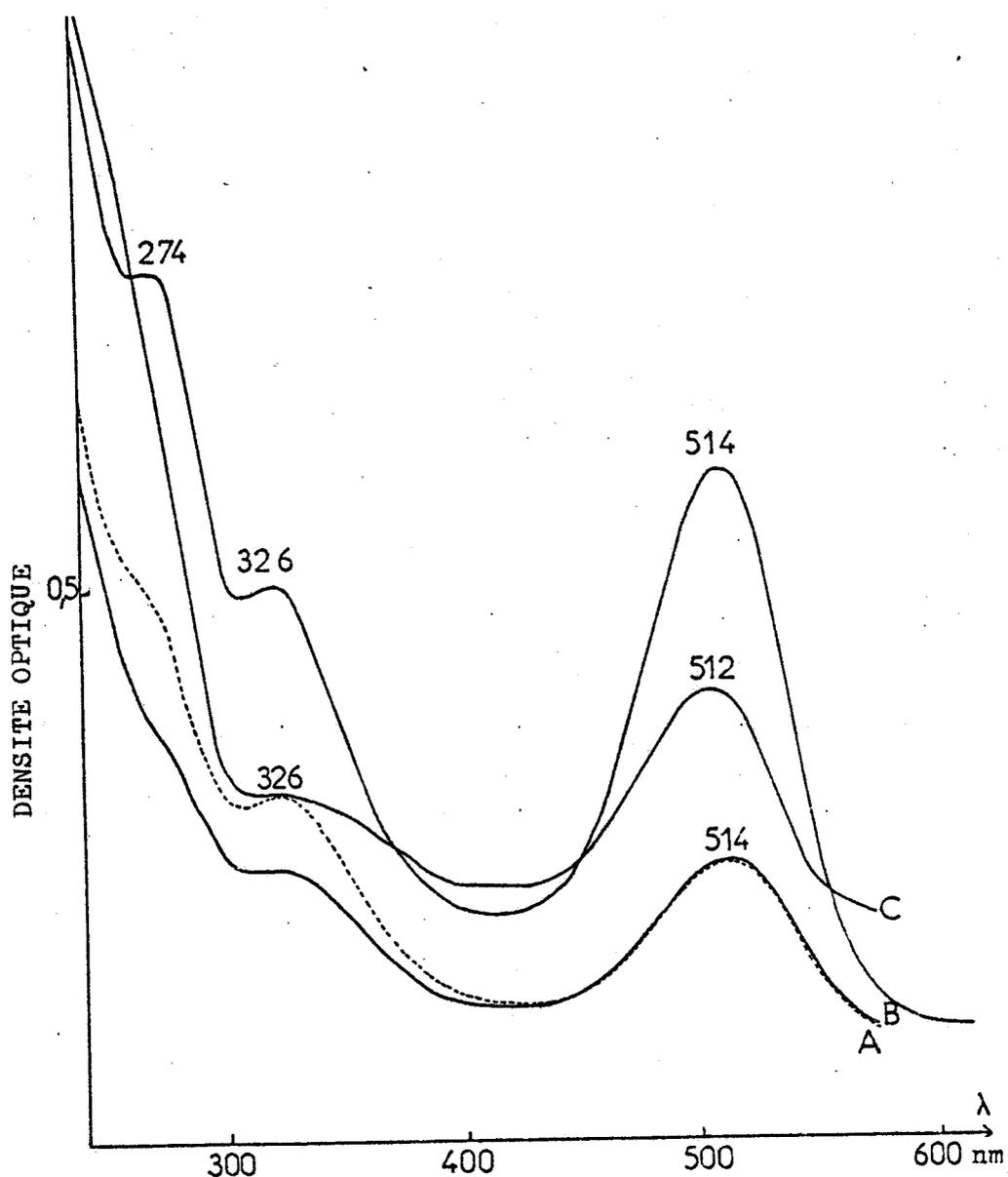


Figure 38 : - Spectres d'absorption des anthocyanines des colonies tissulaires de chou rouge. Les anthocyanines ont été préalablement séparées par chromatographie descendante sur papier Whatman n°1 (solvant : BAW).

- A : anthocyanine ayant un Rf de 0,34
- B : anthocyanine ayant un Rf de 0,33
- C : anthocyanine ayant un Rf de 0,21
- - - - - : extrait brut.

1) Résultats de l'hydrolyse acide

La chromatographie des extraits obtenus après hydrolyse acide, procure un seul spot de couleur rouge dont le Rf est de 0,68 dans le BAW et de 0,51 dans le Forestal. Cette substance est la cyanidine si nous nous référons d'une part aux travaux de HARBORNE (1959) et d'autre part aux Rf de la cyanidine isolée à partir de feuilles de chou rouge.

2) Spectres d'absorption des rubrobrassicine A, B et C.

Avant d'effectuer l'oxydation des anthocyanines à l'eau oxygénée, nous avons fait une chromatographie préparative (solvant : BAW) d'un extrait purifié obtenu à partir de colonies tissulaires de chou rouge. Les trois bandes obtenues correspondant aux rubrobrassicines A, B et C, sont soigneusement découpées puis éluées dans du méthanol à 0,1 % d'HCl.

Le spectre d'absorption de chaque anthocyanine présente un épaulement dans le domaine spectral compris entre 300 et 330 nm. Selon HARBORNE (1964), ces épaulements sont caractéristiques des anthocyanines acylées; la bande d'absorption à 326 nm est due à la présence probable d'acide férulique et celle à 310 nm à la présence probable d'acide para-coumarique (Figure 38).

3) Résultats de l'oxydation à l'eau oxygénée

L'oxydation des anthocyanines à l'eau oxygénée permet d'isoler les glucides acylés fixés en position 3 de l'aglycone.

Les témoins sont obtenus à partir d'un extrait oxydé de feuilles de chou rouge. En outre, nous avons comparé nos résultats

SOLVANTS	Colonies tissulaires de chou rouge		Feuilles de chou rouge (d'après HARBORNE, 1964)	
	BAW	PhOH	BAW	PhOH
para-coumaroyl sophorose	0,43	0,5	0,43	0,52
mono-feruoyl sophorose	0,39	0,65	0,37	0,62
di-feruoyl sophorose	0,1	0,18	0,12	0,21

Tableau 14 : - Rf des sucres acylés obtenus après oxydation à l'eau oxygénée des anthocyanines des colonies tissulaires de chou rouge et des anthocyanines de feuille de chou rouge.
- BAW : butanol 1, acide acétique, eau (4 : 1 : 5 V/V).
- PhOH : phénol saturé d'eau.

SOLVANTS	Rf	ANTHOCYANINES
BAW	0,34	Cyanidine 5 glucose, 3 mono-coumaroyl sophorose (Rubrobrassicine A)
Butanol1 HCl 2N	0,22	
BAW	0,33	Cyanidine 5 glucose, 3 mono-féruoyl sophorose (Rubrobrassicine B)
Butanol1 HCl 2N	0,15	
BAW	0,23	Cyanidine 5 glucose, 3 di-féruoyl sophorose (Rubrobrassicine C)
Butanol1 HCl 2N	0,13	

Tableau 15 : - Nature des anthocyanines contenues dans les colonies tissulaires de chou rouge.



avec ceux de HARBORNE (1964) pour identifier les composés résultants de l'oxydation par l'eau oxygénée.

Les solvants utilisés pour réaliser les chromatographies sont le BAW et le phénol saturé d'eau.

Chacun des extraits oxydés présente trois spots. En fonction des Rf donnés par HARBORNE, ces spots correspondraient aux :

- glucose β 1-2 glucose , 1 acide para-coumarique (para-coumroyl sophorose).
- glucose β 1-2 glucose , 1 acide férulique (mono-feruoyl sophorose).
- glucose β 1-2 glucose , 2 acides férulique (Tableau 14) (di-feruoyl sophorose).

Quand la chromatographie est réalisée avec le BAW, nous pouvons observer une quatrième tache dont le Rf est inférieur à celui de la cyanidine. Cette substance devient rouge lorsque nous trempions le chromatogramme dans une solution diluée d'HCl. Ce composé correspond à la cyanidine 5 glucoside puisque nous le retrouvons quand est chromatographié après oxydation, un extrait obtenu à partir de feuilles de chou rouge.

Ces diverses analyses nous permettent de définir la composition des trois anthocyanines séparées par chromatographie avec le BAW ou le butanol 1 HCl 2N (Tableau 15).

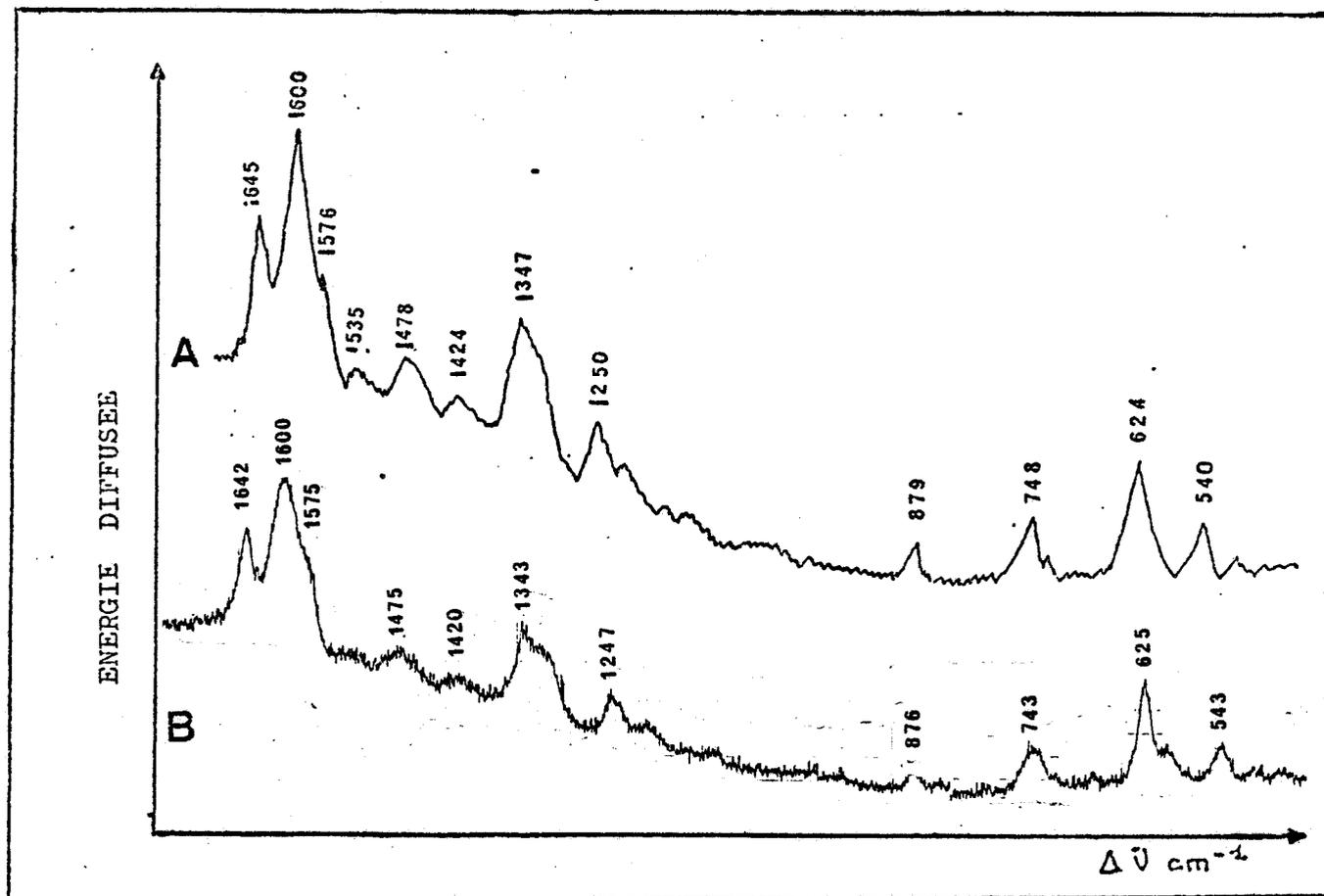


Figure 39 : - Spectres Raman de résonance d'extraits anthocyaniques en solution aqueuse à pH 1.

A- Spectre d'un extrait anthocyanique obtenu à partir de colonies tissulaires de chou rouge âgées de 7 ou 14 jours.

B- Spectre de la cyanine chlorid (commercialisée par Roth).

B) UTILISATION DE LA SPECTROSCOPIE RAMAN A L'IDENTIFICATION ET LA
DETECTION DE DIVERSES MOLECULES.

L'application récente de la microsonde MOLE à effet Raman à la détection, la localisation et l'identification de divers composés dans les cellules végétales, nous a incité à effectuer une étude spectroscopique in vivo des cellules de colonies tissulaires de chou-rouge. Cependant, nous avons d'abord enregistré les spectres des différents types de rubrobrassicine.

1) Etude spectroscopique d'extraits anthocyaniques obtenus
à partir de colonies tissulaires de chou rouge

L'extraction des anthocyanes est réalisée avec de l'eau à 0,1% d'HCl. Les extraits obtenus à partir des colonies tissulaires âgées de 7 ou 14 jours, sont purifiés. Le pH des extraits est ajusté à 1 avant l'étude spectroscopique.

Après chromatographie descendante sur papier, les rubrobrassicines A,B et C sont éluées puis étudiées par spectroscopie dans les mêmes conditions que les extraits totaux.

La technique utilisée étant la spectroscopie Raman de résonance, les spectres enregistrés seront donc spécifiques de l'aglycone des anthocyanines. Pour obtenir ces spectres il est indispensable de mettre les anthocyanines en solution acide pour assurer la stabilité de l'aglycone.

Les spectres des extraits totaux purifiés, obtenus à partir des colonies tissulaires âgées de 7 ou 14 jours, sont identiques et d'aspect très voisin à celui de la cyanine chlorid-
(Figure 39)

Les spectres des rubrobrassicine A, B et C présentent des raies aux mêmes fréquences. Cependant, la fluorescence est très intense de 1200 à 1750 cm^{-1} (Figure 40). Cette expérience permet de confirmer que l'aglycone de chacune de ces molécules, est identique.

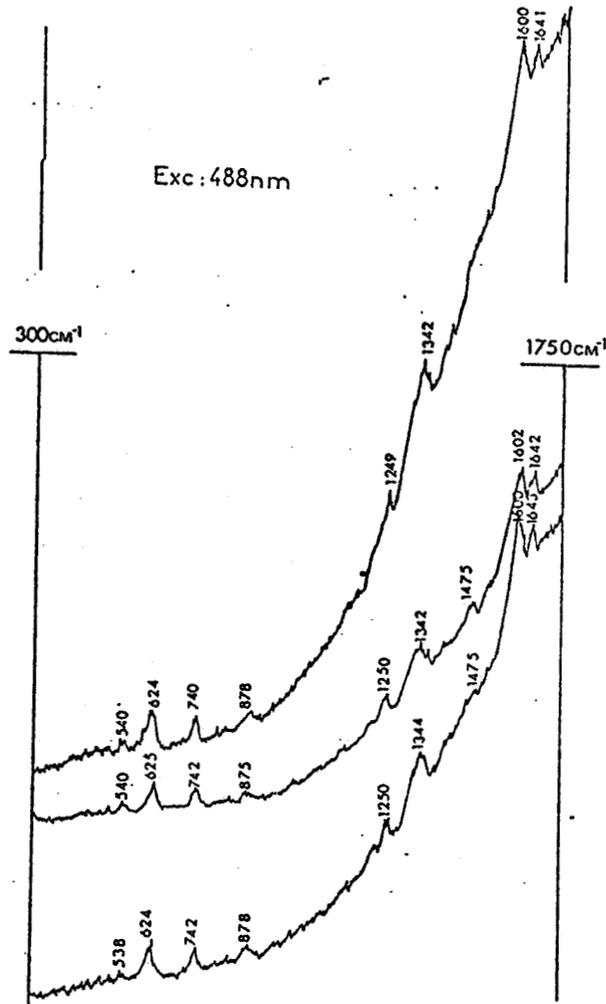


Figure 40 : - Spectres Raman de résonance des principales anthocyanines des colonies tissulaires de chou rouge, séparées par chromatographie descendante sur papier.

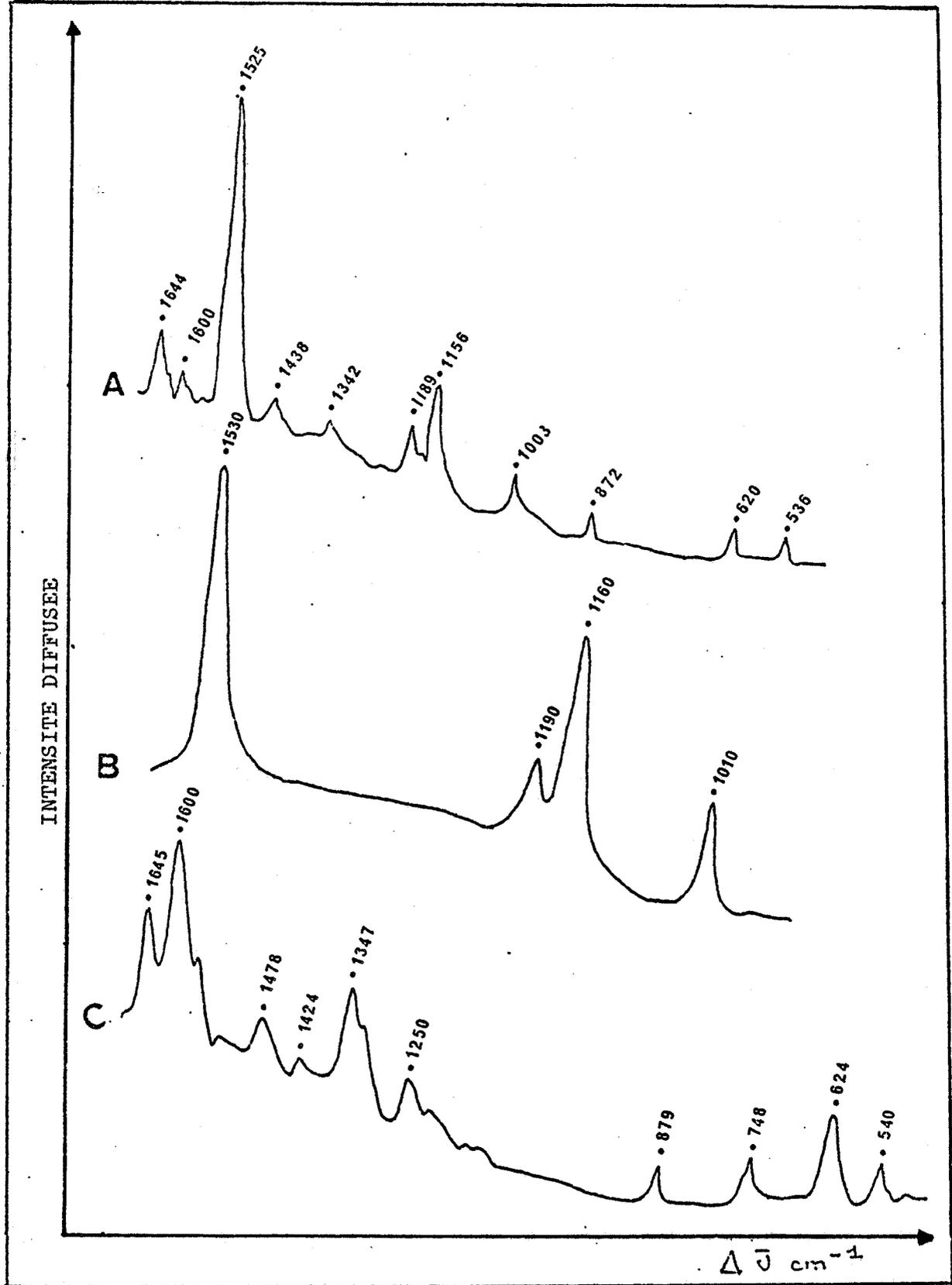


Figure 41 : - **A** Spectre Raman de résonance obtenu après microanalyses in situ de cellules anthocyaniques prélevées sur des colonies tissulaires âgées de 7 jours.

- **B** Spectre Raman de résonance obtenu après microanalyses in situ de cellules de fleur de tulipe jaune (STATOUA, 1932).

- **C** Spectre Raman de résonance de la rubrobrassicine en milieu aqueux à pH 1.

2) Microanalyses in situ des cellules de colonies tissulaires de chou rouge

Les microanalyses in situ des cellules anthocyaniques prélevées sur des colonies tissulaires âgées de 7 jours, procurent dans la majorité des cas un spectre caractérisé par la présence de raies spécifiques des caroténoïdes (fréquences 1525, 1189, 1156 et 1003 cm^{-1}). Les raies observées dans le domaine spectral compris entre 1550 et 1650 cm^{-1} , peuvent être attribuées aux anthocyanines; les intensités des raies de fréquences 1645 cm^{-1} et 1600 cm^{-1} sont différentes si nous comparons ce spectre à celui de la rubrobrassicine en solution aqueuse à pH 1 (Figure 41).

Les spectres Raman réalisés sur des cellules anthocyaniques prélevées sur des colonies âgées de 14 jours, sont très différents de ceux obtenus à partir des cellules provenant des colonies tissulaires âgées de 7 jours: les caroténoïdes sont généralement absents et le spectre des anthocyanines est identique à celui obtenu à partir de l'extrait en solution aqueuse à pH 1 (Figure 41 ,C).

En analysant plusieurs cellules prélevées sur des colonies âgées de 7 jours, nous avons pu constater qu'il y a disparition progressive des caroténoïdes si on prolonge le temps d'irradiation. Cette expérience montre que les caroténoïdes sont des composés photochimiquement très sensibles. En outre, le spectre des anthocyanines n'évolue pas avec le temps d'irradiation et ne devient jamais identique à celui des anthocyanines en solution aqueuse à pH 1 (Figure 42).

././././.

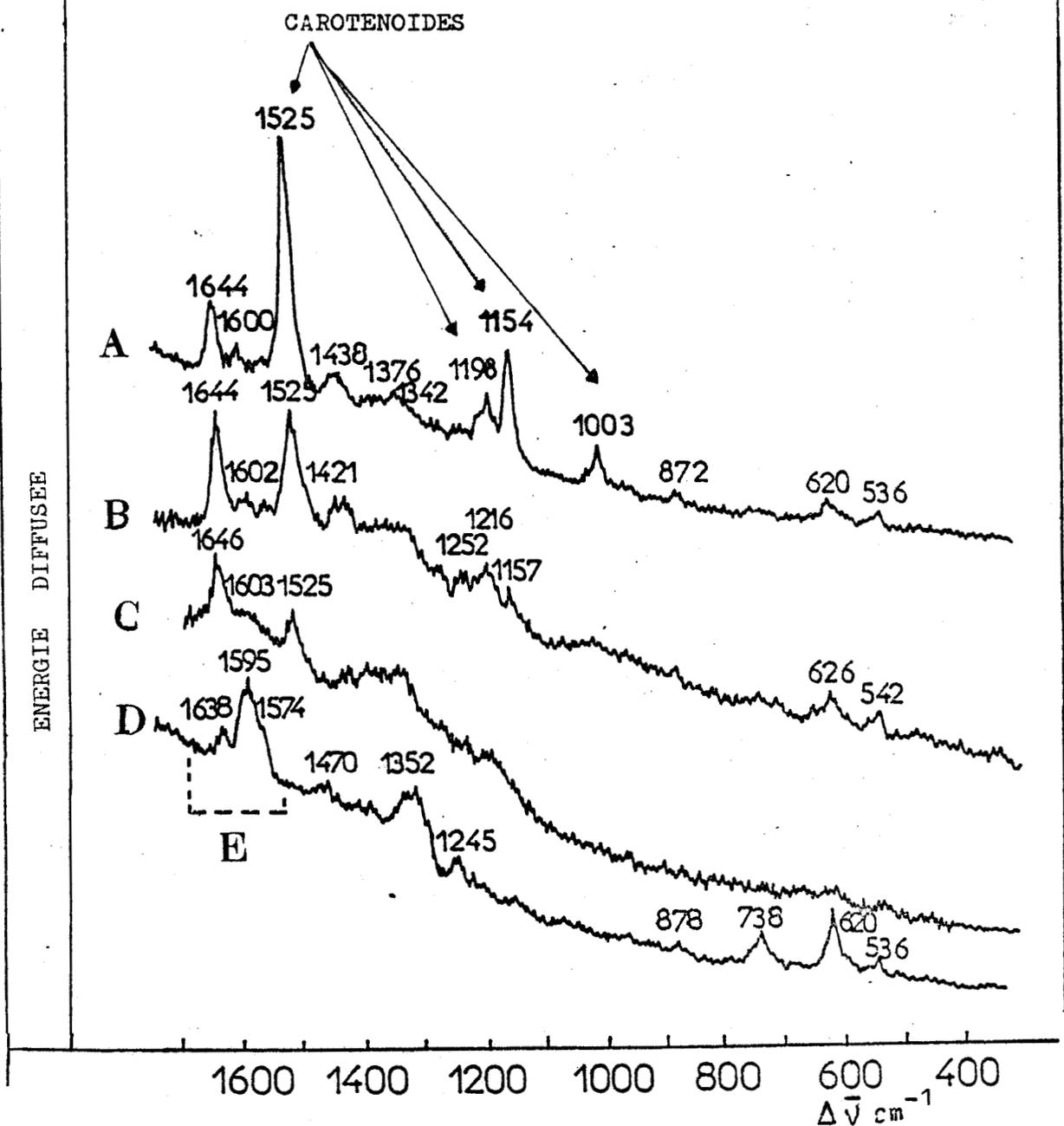


Figure 42 : - A - Spectre Raman de résonance obtenu après microanalyses in situ de cellules prélevées sur des colonies tissulaires âgées de 7 jours.

Les spectres B et C sont représentatifs des cellules prélevées sur colonies âgées de 7 jours, mais peuvent être également obtenus après un temps d'irradiation plus long.

- D - Spectre Raman obtenu pour la majorité des cellules prélevées sur des colonies tissulaires âgées de 14 jours.

- E - Variation d'intensité au niveau des raies du domaine spectral - 1550 - 1650 cm^{-1} .

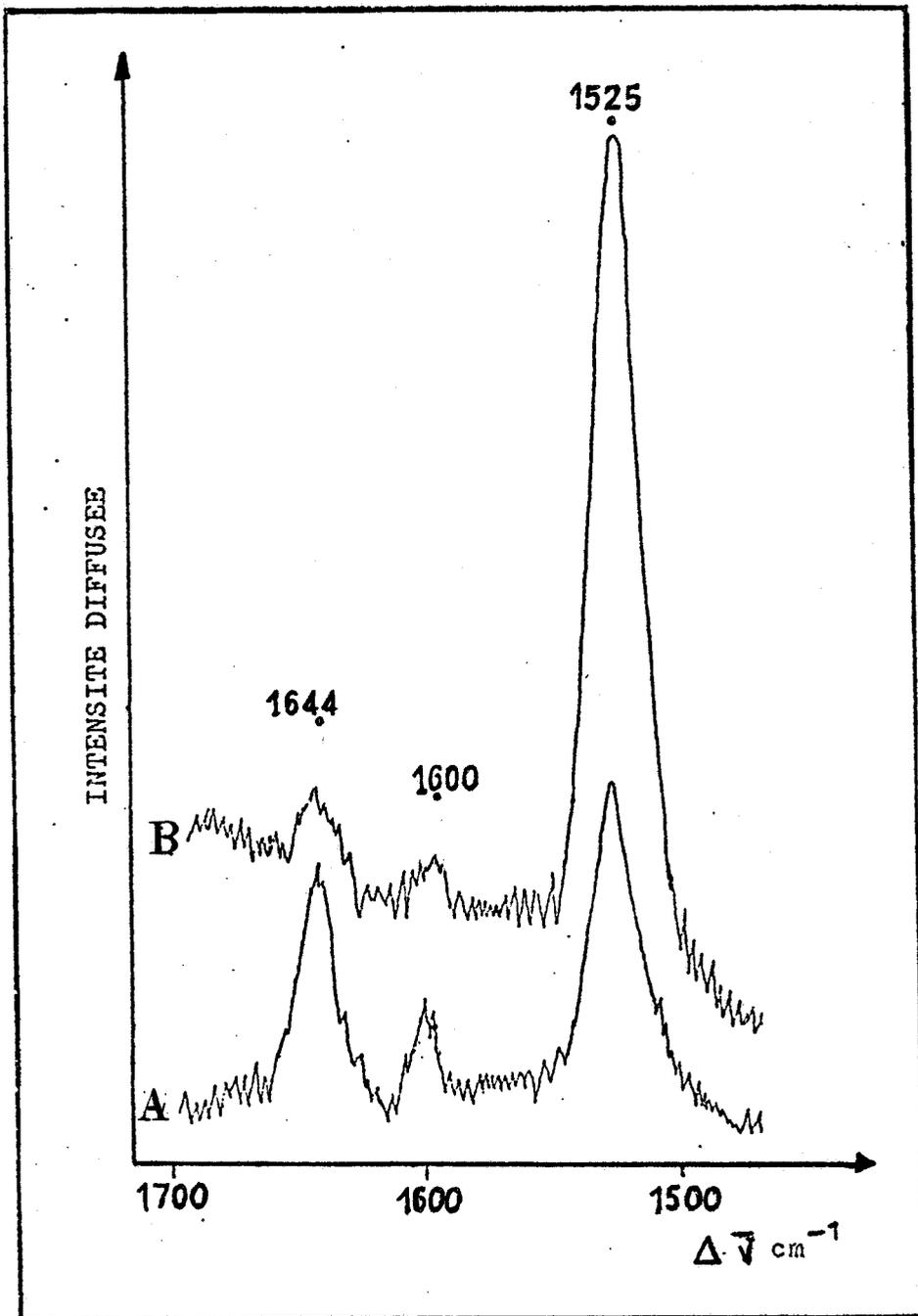


Figure 43 : Spectres Ramn de résonance obtenus après microanalyses in situ de cellules plasmolysées. Les cellules ont été prélevées sur des colonies tissulaires âgées de 7 jours.

A - spectre obtenu en irradiant au centre de la vacuole

B - spectre obtenu en irradiant uniquement le cytoplasme de la cellule plasmolysée.



Afin de localiser les caroténoïdes, nous avons effectué les microanalyses sur des cellules plasmolysées. En défocalisant le faisceau laser, il est possible d'irradier soit la vacuole avec, à sa périphérie, du cytoplasme soit le cytoplasme dégagé par plasmolyse.

Pour cette étude, nous n'avons pris en considération que deux raies caractéristiques des anthocyanines (fréquences 1644cm^{-1} et 1600cm^{-1}) et une raie caractéristique des caroténoïdes (fréquence 1525cm^{-1}).

Il n'a pas été possible de localiser les caroténoïdes avec précision. Cependant, la plus forte concentration est observée dans le cytoplasme au voisinage de la vacuole des cellules plasmolysées (Figure 43).

La détection de caroténoïdes en irradiant la vacuole, est certainement due au fait que le faisceau laser traverse du cytoplasme avant de pénétrer dans la vacuole.

Ces résultats sont obtenus à partir des microanalyses effectuées sur des cellules prélevées sur des colonies tissulaires âgées de 7 ou 14 jours. Cependant, nous avons noté une concentration en caroténoïdes beaucoup plus faible dans les cellules prélevées sur des colonies tissulaires âgées de 14 jours.

3) Analyse des phénomènes intervenant dans les variations d'intensité des raies spécifiques des anthocyanines.

Les variations d'intensité des raies propres aux anthocyanines (domaine spectral compris entre 1550 et 1650cm^{-1}) dans les spectres obtenus après microanalyses des cellules prélevées sur des colonies âgées de 7 et de 14 jours, traduisent vraisemblablement une modification

de la structure de l'aglycone au cours du développement des cellules. Cette modification peut avoir pour origine une variation de pH qui favorise la forme quinonique. Pour des raisons techniques nous avons comparé les résultats à ceux obtenus en utilisant un composé voisin de la cyanine chlorid : la malvidine 3,5 diglucoside. En effet, les variations observées sont comparables à celles obtenues pour la malvidine 3,5 diglucoside en solution aqueuse à pH 1 et à pH 6 (Figure 44).

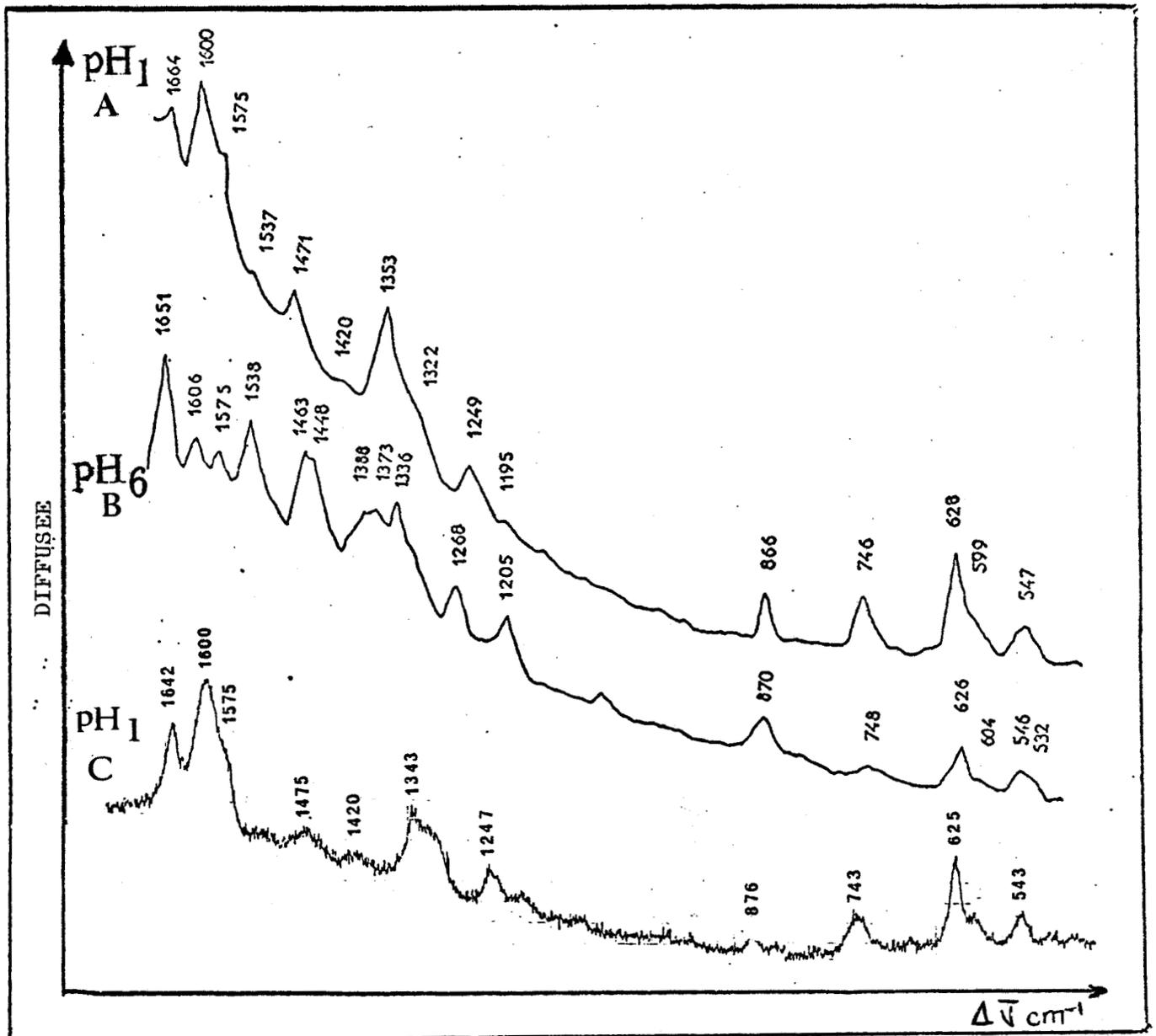


Figure 44 :- Spectres Raman de résonance de la malvidine 3,5 diglucoside sous sa forme de cation flavylum (pH 1 - A) et de base quinonique (pH 6 - B) (STATOUA, 1982) et de la cyanine chlorid en solution aqueuse à pH 1 (C) (MERLIN, 1983).

A pH 1, l'aglycone de l'anthocyanine est sous la forme cation flavylum et à pH 6 sous la forme base quinonique (Figure 45).

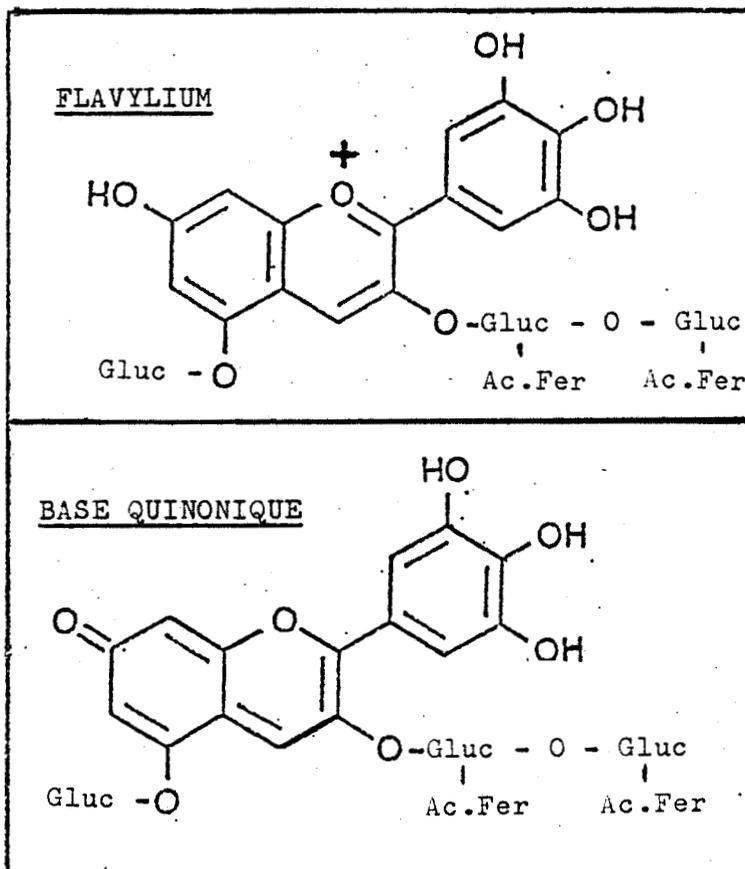


Figure 45 : - Structures des formes chimiques de la rubrobrassicine C (cyanidine 5 glucose, 3 di-feruoyl sophorose) en milieu acide.

- Ac . Fer : acide férulique.

- Gluc : glucose.

././././.

Ce phénomène a pu être reconstitué in vivo, en traitant une cellule avec une solution d'HCl (0,005 M). Le passage du premier type de spectre (Figure , A) (forme quinonique de l'aglycone de l'anthocyanine) au second (Figure , C) (forme flavylum de l'aglycone de l'anthocyanine) est très rapide puisqu'il peut s'effectuer

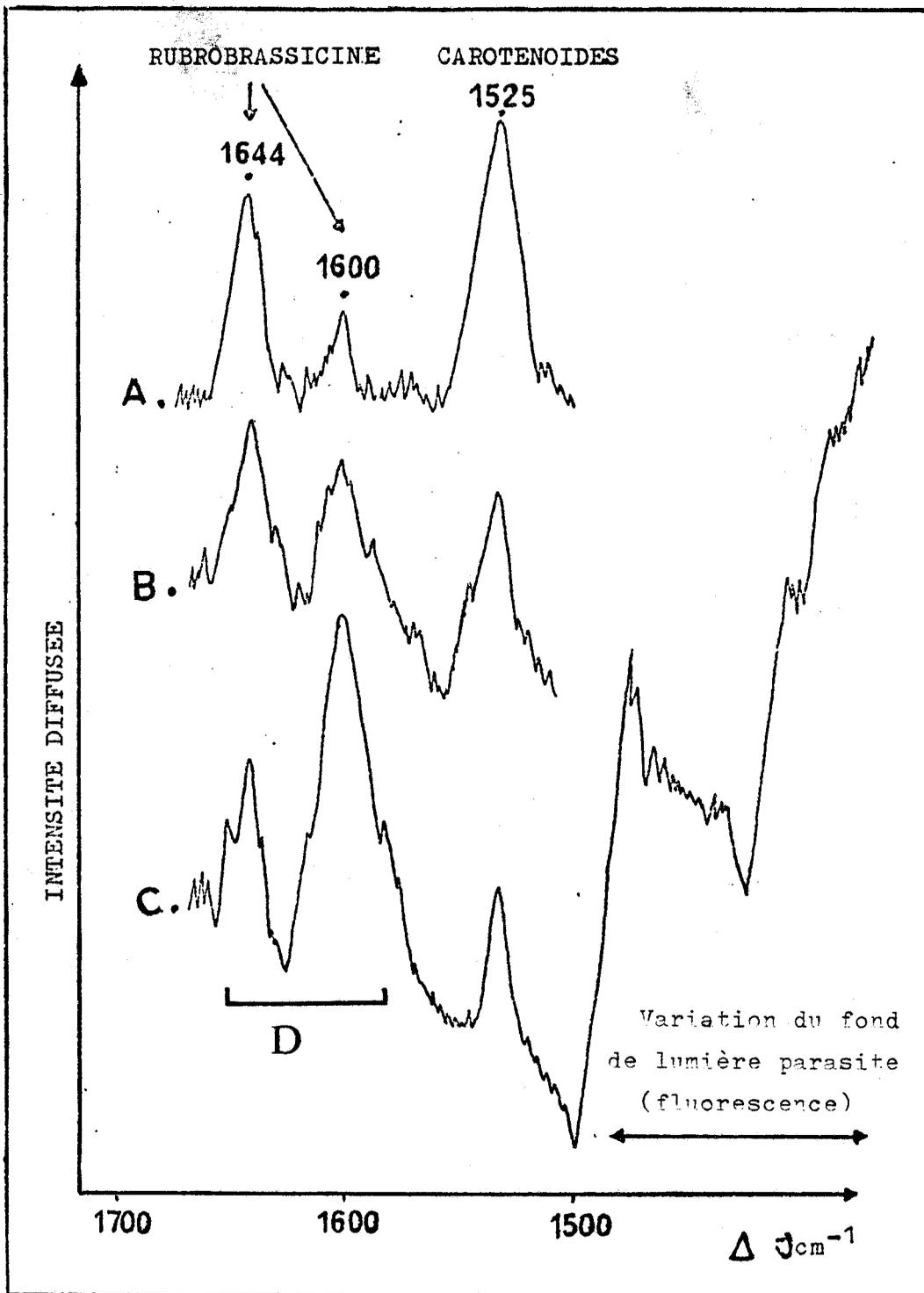


Figure 46 : - Spectres Raman de résonance obtenus après microanalyses in situ de cellules ayant été prélevées sur des colonies tissulaires âgées de 7 jours.

- A - spectre Raman obtenu après microanalyse d'une cellule non traitée à l'acide chlorhydrique.
- B - spectre Raman obtenu 3 minutes après le traitement d'une cellule à l'acide chlorhydrique (0,005 M).
- C - spectre Raman obtenu 5 minutes après le traitement d'une cellule à l'acide chlorhydrique (0,005 M).
- D - Variation d'intensité au niveau des raies du domaine spectral - 1550 - 1650 cm^{-1} .

en moins de cinq minutes. Une microanalyse réalisée trois minutes après le traitement à l'acide chlorhydrique, fournit un spectre de type intermédiaire (Figure 46 , **B**). L'éclatement de la cellule , indiqué par une brusque montée du fond de lumière parasite (fluorescence) (Figure 46 , **C**), n'apparaît qu'après avoir obtenu ces résultats.

Une modification du pH vacuolaire des cellules issues des colonies tissulaires en phase exponentielle de croissance ou en phase stationnaire de croissance, peut expliquer ce phénomène. Il est à noter que pour la spectrométrie Raman de résonance, une faible variation de pH (parfois moins d'une $\frac{1}{2}$ unité) au voisinage du pK, peut induire de fortes modifications dans les intensités relatives des raies attribuables aux différentes formes en présence (MERLIN, 1978).

4) Microanalyse in situ des cellules dépourvues d'anthocyanes.

Les cellules non anthocyaniques, situées dans la zone interne des colonies tissulaires, sont totalement dépourvues de caroténoïdes.

CONCLUSIONS

A) SUR LA CULTURE IN VITRO DES FRAGMENTS DE FEUILLES DE CHOU ROUGE

De nombreuses expériences réalisées sur le genre Brassica concernaient l'étude de la néoformation de calcs, de bourgeons et de racines à partir de fragments de feuilles cultivés in vitro.

Pour notre part, la culture in vitro de fragments de feuilles nous a permis de préciser les conditions qui permettent d'obtenir des colonies tissulaires.

Les diverses expériences ont permis d'observer que l'âge des feuilles et le lieu de prélèvement des explantats, sont deux facteurs importants pour la prolifération. De plus, la nature des tissus joue un rôle important dans la prolifération puisque ce sont les fragments de limbe avec nervure secondaire prélevés dans la région basale des feuilles moyennes de la "pomme" du chou, qui prolifèrent le mieux.

La solution de MARGARA, additionnée de 6 BAP ($5 \cdot 10^{-6}$ g.ml⁻¹), d'ANA (10^{-6} g.ml⁻¹) et de saccharose (10 g.l⁻¹) favorise la prolifération d'amas cellulaires plus friables à la surface des calcs compacts et chlorophylliens. Le repiquage de ces calcs sur le milieu de référence, n'induit que la prolifération des amas cellulaires friables. Comme DUBOIS et BOURIQUET (1973, 1974) pour les tissus de Silene alba, nous avons séparé ces amas cellulaires et les avons repiqués sur le milieu de base. Après quelques jours de culture, ils continuent à proliférer, que le milieu de base soit additionné de saccharose ou de glucose.

BUS
LILLE

Ces amas nous ont permis d'isoler des colonies tissulaires friables et homogènes qui prolifèrent rapidement.

Alors que pour beaucoup de tissus végétaux, la croissance est optimale avec des doses de sucres comprises entre 0,5 et 2 % (HILDEBRANDT et RIKER, 1956), les colonies tissulaires de chou-rouge supportent de fortes concentrations de saccharose ou de glucose et accumulent des anthocyanines quand l'éclairement est intense. Les colonies tissulaires friables, nous ont permis de réaliser des suspensions cellulaires. Cependant, les cellules n'élaborent pas d'anthocyanines quand elles baignent dans le milieu de culture. Afin d'étudier l'influence de divers facteurs sur la biosynthèse des anthocyanines, nous avons poursuivi nos expériences en cultivant les colonies tissulaires sur milieu solide.

B) INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE SUR LA BIOSYNTHESE DES ANTHOCYANINES.

Il est tout d'abord apparu que l'oxygénation est indispensable puisque les cellules n'accumulent pas d'anthocyanines quand elles sont au contact du milieu gélosé ou des parois des tubes. Les analyses spectrophotométriques ont montré que les colonies tissulaires repiquées en boîtes de Pétri en matière plastique, sont plus riches en chlorophylles. Il serait intéressant de voir s'il existe un rapport étroit entre les quantités de chlorophylles, d'anthocyanines et l'oxygénation tel que l'ont montré DOWNS (1964), SCHNEIDER et STIMSON (1971, 1972) et MANCINELLI et ses Collaborateurs (1974).

L'élaboration des anthocyanines est augmentée par meilleur éclaircissement des colonies tissulaires, par l'augmentation de la surface cellulaire qui n'est pas au contact du milieu de culture et par le nombre de colonies tissulaires repiquées en boîtes de Pétri en matière plastique.

L'augmentation de la biosynthèse n'est pas seulement due à ces facteurs. Il était donc important après avoir défini quelques conditions de culture, de trouver la température la plus favorable à la biosynthèse des anthocyanines avant d'étudier l'influence de la lumière et des facteurs chimiques dans des conditions expérimentales bien déterminées.

Cependant, il aurait été intéressant de réaliser une étude plus complète avec des températures plus basses ou plus élevées puisque GORIS (1963) a constaté que de courtes périodes de froid favorisent la biosynthèse des anthocyanines mais ralentissent la croissance. Cette étude pourrait être beaucoup plus complexe du fait de la relation qui existe entre l'apport de lumière et la température sur la biosynthèse des flavonoïdes ou la croissance des tissus. En effet, ENGELSMA (1968, 1970) a montré que plus la période d'incubation des tissus à l'obscurité est courte, plus élevée doit être la température pour obtenir l'optimum de biosynthèse des flavonoïdes.

Pour étudier l'influence de la nutrition carbonée et de la lumière, nous avons réalisé les expériences en cultivant les colonies tissulaires à température constante en faisant abstraction des interactions lumière - température qui peuvent avoir une influence sur la biosynthèse des anthocyanines.

C) INFLUENCE DE LA NUTRITION CARBONÉE ET DE LA PHOTOPÉRIODE.

En faisant varier la concentration en sucre, les rythmes photopériodiques et l'intensité de l'éclairement (lumière blanche) nous obtenons des résultats complexes. Toutefois, la croissance des colonies tissulaires est d'autant plus importante que le nombre d'heures d'éclairement journalier est plus élevé. Ceci a d'ailleurs été constaté par de nombreux auteurs (BUNNING et WELTE, 1954 ; LIORET, 1960). La biosynthèse des anthocyanines est également d'autant plus importante que le nombre d'heures d'éclairement journalier est plus élevé. Cependant, l'action de la lumière blanche sur l'utilisation des sucres semble beaucoup plus nette en photopériodes 18 : $\bar{6}$ et 24 : $\bar{0}$ car la biosynthèse des anthocyanines s'effectue encore après quatorze jours de culture. De plus la croissance des colonies tissulaires et la biosynthèse des anthocyanines sont d'autant plus importantes que la concentration en sucre et le nombre d'heures d'éclairement journaliers sont plus élevés. En outre, la nature du sucre utilisé (saccharose ou glucose) influe peu sur l'accumulation des pigments mais modifie de façon plus sensible la croissance des colonies tissulaires surtout si nous tenons compte de leur teneur en eau. Les colonies tissulaires repiquées sur les milieux additionnés de glucose, sont en effet plus riches en matière sèche.

Sans avoir pu doser les sucres dans les colonies tissulaires nous pouvons cependant penser qu'elles consomment mieux le glucose. En effet, en faisant varier simultanément la nature des sucres et la photopériode, il est possible de modifier la biosynthèse des anthocyanines et la croissance des colonies tissulaires. Ceci fait

penser qu'il a un rapport étroit entre l'utilisation des sucres par les colonies tissulaires et l'action de la lumière, car les colonies supportent mieux les fortes doses de saccharose quand elles sont éclairées continuellement et quand elles sont soumises à des rythmes photopériodiques plus courts (1 : $\bar{1}$, 2 : $\bar{2}$ et 3 : $\bar{1}$).

NAEF (1968) signale qu'il a des rapports étroits entre l'utilisation du glucose par des tissus végétaux cultivés in vitro et l'action de la lumière. Nous avons pour notre part constaté que le glucose limite la biosynthèse des anthocyanines en soumettant les colonies tissulaires aux rythmes photopériodiques 1 : $\bar{1}$ et 2 : $\bar{2}$. Dans ce cas, nous pouvons penser que l'absorption du glucose est trop importante et occasionne un blocage partiel des réactions de biosynthèse des anthocyanines; ce qui n'est pas la seule explication possible puisque sous l'effet de la lumière, il y a augmentation de la réduction des nitrates et de la genèse des acides aminés (CHAMPIGNY, 1960). Etant données les les interactions entre la nutrition carbonée et azotée sur l'accumulation des anthocyanines, cette seconde hypothèse pourrait être plus vraisemblable pour expliquer le ralentissement de biosynthèse.

Pour les colonies tissulaires de chou rouge, si la dose et la nature des sucres ainsi que le temps d'éclairement favorisent biosynthèse des anthocyanines, l'intensité de l'éclairement joue également un rôle important. Dans la limite de quantité d'énergie lumineuse (lumière blanche) dont nous disposions, nous avons pu constater que la biosynthèse augmente avec la quantité d'énergie lumineuse, le nombre d'heures d'éclairement journalier et la concentration en saccharose. L'élaboration des anthocyanines par

les colonies tissulaires dépend de la nature des sucres, de la photopériode, de la nature des sources lumineuses et de la densité du flux lumineux.

D) SUR LA NUTRITION AZOTEE.

Pour de nombreuses espèces, il est admis qu'une baisse du taux de nitrate et une augmentation de la teneur en sucre, favorisent la biosynthèse des anthocyanines. Dans le cas des colonies tissulaires de chou rouge, il apparaît que la biosynthèse des anthocyanines est d'autant plus importante que les concentrations en azote minéral et en sucre sont élevées. De plus, pendant les quatorze jours que dure la culture, tous les nitrates sont consommés quelles que soient leurs concentrations. L'augmentation de la quantité d'anthocyanines serait d'une part liée au début de la culture, à la croissance des colonies tissulaires et d'autre part après le quatorzième jour de culture, liée à l'intervention des sucres et d'autres substances restant dans le milieu. En outre, l'augmentation de la consommation des nitrates qui est étroitement liée à la présence des ions Ca^{++} , favorise la biosynthèse des anthocyanines.

Certes dans certains cas il pouvait sembler que la réduction de la quantité d'azote minéral favorisait la biosynthèse des anthocyanines, mais les milieux renfermaient alors de la L^+ glutamine et de l'hydrolysat de caséine. L'absence de ces composés dans les milieux de culture occasionnait de grandes variations au niveau de la croissance et de la biosynthèse des anthocyanines. La L^+ glutamine agit sur la croissance des colonies tissulaires et l'hydrolysat de caséine sur la biosynthèse des anthocyanines par les précurseurs qu'il contient (ex : phénylalanine).

L'étude de l'influence des précurseurs, a montré le rôle prépondérant de l'acide cinnamique et de la phénylalanine. Il aurait sans doute été intéressant d'étudier l'activité de la phényl-ammonialyase, mais cette étude ne serait vraiment réalisable que sur des colonies à pigmentation homogène. Elle serait également possible à réaliser avec des suspensions cellulaires, car si les cellules n'accumulent pas d'anthocyanines quand elles prolifèrent dans le milieu de culture, elles synthétisent des composés flavoniques. Les analyses chromatographiques ont montré que le kaempférol est le principal composé synthétisé par les cellules en suspension.

E) SUR LA STRUCTURE DE LA RUBROBRASSICINE ET LES MICROANALYSES IN SITU.

L'utilisation des techniques d'analyses classiques et de chromatographie descendante sur papier ont permis d'identifier les trois anthocyanines présentes dans les cellules des colonies tissulaires. Si les résultats obtenus sont en accord avec ceux de HARBORNE (1964), il aurait été intéressant d'analyser plus finement les extraits afin de savoir s'il existe d'autres pigments dérivés de la cyanidine tel que le mentionne TIMBERLAKE (1981). Les anthocyanines présentes dans le chou rouge, en quantité très faibles et récemment trouvées en utilisant une H.P.L.C sont :

- La cyanidine 5 glucose, 3 di para-coumaroyl sophorose
- la cyanidine, 5 glucose, 3 sinapoyl sophorose
- la cyanidine 5 glucose, 3 di sinapoyl sophorose
- la cyanidine 5 glucose, 3 malonyl sophorose

En outre, la spectrométrie Raman de résonance nous a

permis d'obtenir des informations originales sur la structure de la rubrobrassicine quand elle se trouve dans le liquide vacuolaire. La méthode d'analyse in situ étant non destructive, il est possible de dire que les microanalyses sont réalisées in vivo.

La spectrométrie Raman a permis de mettre en évidence les deux formes sous lesquelles la rubrobrassicine se présente dans les cellules vivantes. Ces formes appelées quinonique et cation flavylum, sont spécifiques des cellules anthocyaniques prélevées sur des colonies tissulaires d'âges différents. Les variations de structure de la rubrobrassicine sont essentiellement dues à un effet de pH. Les diverses analyses nous permettent de penser qu'il y aurait une modification du pH vacuolaire des cellules des colonies tissulaires en phase stationnaire de croissance. Cependant, il ne nous a pas été possible de résoudre le problème de la stabilisation de la forme quinonique (pH proche de la neutralité) à l'intérieur des vacuoles des cellules prélevées sur des colonies tissulaires âgées de sept jours.

Les microanalyses in situ ont révélé l'absence ou la présence de caroténoïdes dans les cellules anthocyaniques, suivant l'âge des colonies tissulaires et le degré d'éclairement. Ces caroténoïdes sont localisés dans le cytoplasme des cellules. En outre, il semble que les caroténoïdes soient synthétisés d'une part par les cellules au cours de la phase exponentielle de croissance (pour disparaître au cours de la phase stationnaire) et d'autre part dès que les cellules commencent à accumuler des anthocyanines sous l'effet de la lumière blanche. De plus, les expériences ont montré que :

- les colonies tissulaires sont peu sensibles à l'action de la lumière monochromatique, mais sont beaucoup plus sensibles à l'intensité du flux lumineux et au temps d'éclairement
- le calcium inhibe l'action du phytochrome chez des plantules de chou rouge (PECKET et HATHOUT BASSIM, 1975), mais n'exerce aucune action néfaste sur la biosynthèse des anthocyanines par les colonies tissulaires.
- les caroténoïdes sont des composés photochimiquement très sensibles et leur apparition dans les cellules semble associée à celle des anthocyanines.

Toutes ces observations peuvent apporter une réponse à l'hypothèse de ROLLIN (1970) qui estime que les caroténoïdes seraient des photorécepteurs intervenant dans la biosynthèse des anthocyanines sous l'influence de la densité du flux lumineux et du temps d'éclairement.

L'étude des différents facteurs qui favorisent la biosynthèse des anthocyanines par les colonies tissulaires mises en culture sur milieu solide, a permis de dégager certains faits. Cependant, l'étude de l'élaboration de composés flavoniques et hypothétiquement des anthocyanines, pourrait être réalisée sur un matériel plus homogène telle qu'une suspension cellulaires plus favorable pour aborder certaines expériences. Dans ces conditions, il serait également très intéressant de suivre le devenir des diverses molécules à l'aide de la microsonde MOLE à effet Raman.

BIBLIOGRAPHIE

AMORIN H.V, DOUGALL D.K, SHARP W.R - 1977 - The effect of carbohydrate and nitrogen concentration on phenol synthesis in Paul'Scarlet Rose cells grown in tissue culture. Plant Physiol , 39 , 91 - 95.

ARTHUR J.M. - 1932 - Red pigment production in apples by means of artificial light sources. Contrib. Boyce Thompson Inst. , 4 , 1 - 18.

ARTHUR J.M. - 1936 - Radiation and anthocyanin pigments. In : Biological effects of radiation. B.M Düggar ed. , vol 2 , 1109 - 1118.

AUGUSTO O., CILENTO G., JING JUNG et PILL-SOON SONG. - 1978 - Photo-transformation of phytochrome in the dark. Biochemical and biophysical Research Communications , 83 (3), 963 - 969.

BAJAJ Y.P.S., et NIETSCH P. - 1975 - In vitro propagation of red cabbage(Brassica oleracea var capitata). Journal of experimental botany , 26 (25), 883 - 890.

BALLAN DUFRANCAIS C., TRUCHET M.et DHAMELINCOURT P. - 1979 - Interest of laser Raman microprobe (MOLE) for the identification of purinic concretions in histological sections. Biol. Cellulaire , 36 , 51.

BATE SMITH E.C. - 1948 - Paper chromatography of anthocyanins and related substances in petal extracts. Nature , 4100, 835 - 838.

BATE SMITH E.C. - 1954 - Leuco-anthocyanins - I. Detection and identification of anthocyanindins formed from leuco-anthocyanins in plants. Biochem. J. , 58 , 122 - 125.

BATE SMITH E.C. - 1954 - Flavonoids compounds in foods. Adv. Food Res. , 2 , 261 - 300.

BILLOT J. - 1965 - Analyse des pigments anthocyaniques des fleurs de Jaracanda. Annales de l'Université de Madagascar. Série sciences et techniques , 2 , 41 - 55.

BILLOT J. - 1967 - Décoloration des pigments anthocyaniques en milieu acétonique. Physiologie Végétale , 5 (3) , 293 - 310.

BILLOT J. - 1969 - Recherches sur les pigments anthocyaniques - recoloration des anthocyanes par l'acide chlorhydrique. Application à leur estimation. Physiologie Végétale , 7 , 105 - 115.

BLACKELY L.M., STEWART F.C. - 1961 - Growth induction in cultures of Haplopappus gracilis. I) The behavior of cultured cells. American Journal of Botany , 48 , 351 - 358.

BLANK F. - 1958 - Anthocyanins, flavones, xanthones. HANBUCH der Pflanzenphysiologie. Springer Verlag, Berlin - Gottingen - Heidelberg , 10 , 300 - 345.

BOISARD J., MARME D. et BRIGGS W.R - 1974 - In vivo properties of membrane-bound phytochrome. Plant Physiol, 54 , 272 - 276.

BREGEAUT J. et ROLLIN P. - 1965 - Influence de la lumière sur la synthèse des anthocyanes chez Phacelia tanacetifolia . Israel J. Bot. , 14 , 59 - 68.

BUNNING E. et WELTE H. - 1954 - Photoperiodisch Reaktionen an pflanzlichen Gewebe kulturen. Physiol. Plant. , 7 , 197 - 203.

CHAMPIGNY M.L. - 1960 - Influence de la lumière sur la genèse des acides aminés dans les feuilles de Bryophyllum daigremontianum. Thèse Paris.

CONSTABEL F. SHYLUK J.P., et GAMBORG O.L. - 1971 - The effects of hormones on anthocyanins accumulation in cells of Haplopappus gracilis. Planta (Berl) , 96 , 306 - 316.

CREASY L.L. - 1968 - The significance of carbohydrate metabolism in strawberry leaf disks. Phytochemistry, 7 , 1743 - 1749.

DELHAYE M. et DHAMELINCOURT P. - 1975 - Raman microprobe and microscope with laser excitation. J. Raman spectroscopie , 3 , 33 - 43.

DEUBERT K.H. - 1978 - A rapid method for extraction and quantitation of total anthocyanin of Cranberry fruit. J. Agric. Food. Chem., 26 , (6).

DHAMELINCOURT P. - 1980 - Possibilités d'application de la MOLE à la biologie, biochimie et à la biophysique. Spectrochimie infrarouge et Raman - Laboratoire propre du CNRS.

DOWNS R.J. - 1964 - Photocontrol of anthocyanin synthesis. Journal of the Washington Academy of Sciences , 54 , 112 - 120.

DOWNS R.J., SIEGELMAN H.W. BUTTER W.L et HENDRICKS S.B. - 1965 - Photoreceptive pigments for anthocyanin synthesis in apple skin. Nature, 205, 905 - 910.

DRUMM H et MOHR H. - 1978 - The mode of interaction between blue (UV) light photoreceptor and phytochrome in anthocyanin formation in Sorghum seedlings. Photochemistry and Photobiology , 27 , 241 - 248.

DUBOIS J. - 1980 - Communication personnelle. Laboratoire de physiologie végétale. Université des Sciences et Techniques, Villeneuve d'ascq.

DUBOIS J. et BOURIQUET R. - 1973, 1974 - Culture in vitro de tissus et de suspensions cellulaires de Silene alba (Miller) E.H.L. Krause. Soc. Bot. du NORD de la France , T XXVI - XXVII, 70 - 88.

DUMORTIER F. et VENDRIG J. - 1978 - Effect of "penetrant carriers" in relation to the photocontrol of anthocyanin synthesis in Mung beans (Phaseolus aureus): Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie , 87 , (4), 313 - 324.

ENGELSMA G. - 1967 - Photoinduction of phenylalanine deaminase in gherkin seedlings : I) Effect of blue light. Planta , 75 , 207 - 219

ENGELSMA G. - 1967 - Phenol synthesis and photomorphogenesis. Philips Technical Review, 28 , 101 - 110.

ENGELSMA G. - 1968 - The influence of light of different spectral region on the synthesis of phenolic compounds in gherkin seedlings, in relation to photomorphogenesis. V) The temperature dependence. Acta. Bot. Neerl. , 17 , (6) , 499.

ENGELSMA G. - 1970 - Photoinduction of phenylalanine deaminase in gherkin seedlings. The role of temperature. Planta, 90 , 133 - 141.

- FOURY C. et AUBERT S. - 1977 - Observations préliminaires sur la présence et la répartition des pigments anthocyaniques dans un mutant d'artichaut (Cynara scolymus L.) à fleurs blanches. Ann. Amélioration des plantes., 25 (5) , 603 - 612.
- FREY-WYSSLING A. et BLANK F. - 1943 - Untersuchungen über die physiologie des anthocyanes in Keimlingen von Brassica oleracea L. var Capitata. Lr rubra. Ber. Schweiz. Bot. Ges. , 503 (A) , 550 - 578.
- GAUTHERET - 1941 - Action du saccharose sur la croissance des tissus de carotte. C. R. Soc. Biol. , 135 , 875 - 878.
- GEISSMAN T.A. - 1955 - Anthocyanins, chalcones, aurones flavones and related water soluble plant pigments. Modern Methods of Plant Analysis , 3 , 450 - 498.
- GENEVOIS L. - 1955 - Biosynthèse des pigments des fruits et légumes. Ann. Nutrition et Alimentation , 9 , 295 - 322.
- GEZA HRAZDINA et CREASY L.L. - 1979 - Light induced changes in anthocyanin concentration, activity of phenylalanine ammonia lyase and flavanone synthetase and some of their properties in Brassica oleracea . Phytochemistry, 18 , 581 - 584.
- GORIS A. - 1963 - Influence du froid intervenant au moment du repiquage des tissus de racines de carotte cultivés in vitro. Ann. Sc. Nat. Bot et Biologie végétale , 12^{ième} série , 415 - 423.
- GRILL R. et VINCE D. - 1965 - Photocontrol of anthocyanin formation in turnip seedlings. II) The possible role of phytochrome in the response to prolonged irradiation with far red or blue light. Planta , 67 , 122 - 135.
- HARBORNE J.B. - 1959 - Chromatographic Reviews , Vol I , M Lederer Edit. Elsevier Amsterdam.
- HARBORNE J.B. - 1964 - Plant polyphenols. XI) The structure of acylated anthocyanins. Phytochemistry , 3 , 151 - 160.
- HARBORNE J.B. , MABRY T.J. et MABRY R.C. - 1975 - The flavonoids. CHAPMAN and Hall Edit. London.

- HATHOUT BASSIM T.A. et PECKET R.C. - 1975 - The effect of membrane stabilizers on phytochrome controlled anthocyanin biosynthesis in Brassica oleracea. Phytochemistry , 14 , 731 - 733.
- HAYASHI K. - 1962 - The anthocyanins. In Geissman T.A. The chemistry of flavonoids compounds. Pergamon Press , 9 , 248 - 285.
- HELLER R. - 1948 - Sur la formation d'anthocyanes dans des tissus de vigne vierge cultivés in vitro, par suppression de l'azote du milieu de culture. C. R. Soc. Biol , 142 , 768 - 769.
- HENDRICKS S.B. - 1968 - How light interacts with living matter. Scientific American, 219 , 174 - 189.
- HILDEBRANDT A.C. et RIKER A.J. - 1953 - Influence of concentration of sugars and polysaccharides on callus tissue growth in vitro. American Journal of Botany , 40 , 66 - 76.
- HUAULT C. - 1969 - L'action du phytochrome sur la régulation de la synthèse de la phénylalanine ammonia-lyase chez la plantule de moutarde (Sinapis alba L.); un problème de biologie moléculaire. Thèse de 3^{ième} cycle. Rouen.
- JOHNSON C.B. - 1980 - The effect of red light in the high irradiance reaction of phytochrome. Evidence for interaction between Pfr and phytochrome cycling- driven process. Plant Cell and Environment , 3 , 45 - 51.
- JOHNSON B.B. et MITCHELL E.D. Jr. - 1978 - In vitro propagation of Broccoli from stem, leaf and leaf rib explants. Hort. Science, 3 , 246 - 247.
- KLEIN A.O. et HAGEN C.W.Jr. - 1961 - Anthocyanin production in detached petals of Impatiens balsamina. Plant Physiol., 36 (1) , 1 -9.
- KOTARO T., YAMAMOTO K.T. et FURUYA M. - 1979 - Effect of enzymatically digested microsome fractions on red light enhanced pelletability of pea phytochrome in vitro, in the response of calcium ion. Plant and Cell Physiology , 20 (8) , 1591 - 1601.

KOUKOL J. et CONN E.E. - 1961 - The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV) Purification and properties of phenylalanine deaminase of Hordeum vulgare. J. Biol. Chem. , 236 , 2692 - 2698.

KREUZALER F. et HAHLBROCK K. - 1972 - Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants : formation of naringenin from p-coumaroyl CoA and malonyl CoA. F.E.B.S. Letters , 28 , 69 - 72.

KU P.K. et MANCINELLI A.L. - 1972 - Photocontrol of anthocyanin synthesis I) Action of short, prolonged and intermittent irradiation on the formation of anthocyanin in cabbage, mustard and turnip seedlings. Plant Physiol. , 49 , 212 - 217.

KUBEK D.J. et SHULER M.L. - 1980 - The effect of variation in carbon and nitrogen concentrations on phenolics formation in plant cell suspension cultures. Journal of natural Products , 13 (1) , 87 - 96.

LARGEAU C., CASADEVALL E., BERKALOFF C. et DHAMELINCOURT P. - 1980 - Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in Botryococcus braunii. Phytochemistry , 19 , 1043 - 1051.

LIORET C. - 1960 - Recherches sur le métabolisme de deux tissus végétaux cultivés in vitro. Thèse. Paris.

Mac CLURE. - 1968 - Photocontrol of Spirodela intermedia flavonoids. Plant Physiol. , 43 , 193 - 200.

MANCINELLI A.L., PING-KAUG KU (TAI) et SINSINNO R. - 1974 - Photocontrol of anthocyanin synthesis : phytochrome, chlorophyll and anthocyanin synthesis. Photochemistry and Photobiology , 20 , 71 - 79.

MANCINELLI A.L. et RABINO I. - 1975 - Photocontrol of anthocyanin synthesis IV) Dose dependence and reciprocity relationships in anthocyanin synthesis. Plant Physiol , 56 , 351 - 355.

MANCINELLI A.L., CHIA-PING HUANG YANG, LINDQUIST P. et ANDERSON O.R. et RABINO I. - 1975 - Photocontrol of anthocyanin synthesis. III) The action of streptomycin on the synthesis of chlorophyll and anthocyanin. Plant Physiol , 55 , 251 - 257.

- MARGARA - 1977 - Communication personnelle - LEGRAND B. Laboratoire de Physiologie végétale, Villeneuve d'ascq.
- MATSUMOTO T., NISHIDA K., NOGUCHI N. et TAMAKI E. - 1973 - Some factors affecting the anthocyanin formation by Populus cells in suspension culture. Agr. Biol. Chem. , 37 (3) , 561 - 567.
- MEIJER G. - 1968 - Rapid growth inhibition of gherkin hypocotyl in blue light. Acta Bot. Neer. , 17 , 9 - 14.
- MERLIN J.C. - 1978 - Utilisation de sondes Raman de resonance pour l'étude des interactions protéine-ligand. Thèse d'Etat. Université des Sciences et Techniques, Villeneuve d'ascq.
- MERLIN J.C. - 1983 - Communication personnelle. Laboratoire de spectrochimie infrarouge et Raman du C.N.R.S. Université des Sciences et Techniques , Villeneuve d'ascq.
- MOHR H. - 1957 - Der Einflub monochromatischer Strahlung auf das Langenwastum des Hypocotyls und die Anthocyanbildung bei Keimlingen von Sinapis alba L. (=Brassica alba). Planta , 49 , 349 - 405.
- MOHR H. et VAN NES E. - 1963 - Der Einflub sichtbarer Strahlung auf die flavonoids synthese und Morphogenèse der buchweizen Keimlingen. I) Synthèse von Anthocyan. Z. Bot. , 51 , 1 - 16.
- MOHR H., DRUMM H., SCHMIDT R. et STEINITZ B. - 1979 - The effect of light pretreatments on phytochrome mediated induction of anthocyanin and of phenylalanine ammonia-lyase. Planta , 146 , 369 - 376.
- MORINVILLE P. - 1979 - La culture in vitro des tissus de feuilles de chou rouge (Brassica oleracea var Tête de Nègre). DEA , Université des Sciences et Techniques , Villeneuve d'ascq.
- MURASHIGE et SKOOG - 1962 - A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissues cultures. Plant Physiol. , 15, 473 - 497.

- NAEF J. - 1968 - Recherches sur le développement des tissus végétaux cultivés in vitro dans ses rapports avec l'utilisation du glucose et l'action de la lumière. Thèse. Université de Genève, Inst.Bot.Gen.
- NAKAMURA N., NAKAMAE H. et MAEKAWA S. - 1980 - Effects of light and kinetin on anthocyanin accumulation in the petals of Rosa hybrida, Hort cv. Ehigasa. Z. Pflanzenphysiology Bd. , 98 , S. 263 - 270.
- NAKATANI N., FUKUDA H. et FUWA H. - 1979 - Major anthocyanin of Bolivian Purple corn (Zea mays L.). Agric. Biol. Chem., 43 , (2) , 389 - 391.
- NEISH A.C. - 1960 - Biosynthetic pathway of aromatic compounds. Annu. Rev. Plant Physiol. , 55 - 80.
- NIETSCH P. - 1975 - In vitro propagation of red cabbage: Brassica oleracea (var Capitata). Journal of Experimental Botany , 26 , 883.
- NIETSCH J.P. et NIETSCH C. - 1965 - Néof ormation de fleurs in vitro chez une espèce de jour court: Plumbago indica L. Ann. Physiol. Vég. , 7 (4), 251 - 258.
- PECKET R.C. et HATHOUT BASSIM - 1974 - Mechanism of phytochrome action in the biogenesis of anthocyanin in Brassica oleracea. Phytochemistry 13, 815 - 821.
- PECKET R.C. et HATHOUT BASSIM - 1974 - The effect of kinetin in relation to photocontrol of anthocyanin biosynthesis in Brassica oleracea. Phytochemistry , 11 , 1395 - 1399.
- PILLET P.E. et TAKAHASHI P. - 1979 - Effect of abscisic acid on anthocyanin content in light exposed roots. Plant Science Letters, 17 , 1 - 6.
- PILL-SOON SONG et QUAE CHAE - 1979 - The transformation of phytochrome to its physiologically active form. Photochemistry and Photobiology, 30 , 117 - 123.
- PIRIE A. et MULLINS M.G. - 1976 - Changes in anthocyanin and phenolic content of grapevine leaf and fruit tissue treated with sucrose, nitrate and abscisic acid. Plant Physiol , 58 , 468 - 472.

PRATT L.H. - 1978 - Molecular properties of phytochrome. Photochemistry and Photobiology , 27 , 81 - 105.

PRIMO MILLO et HARADA E. - 1975 - Morphogenèse et propagation végétative à partir de tissu de feuilles de chou rouge. Brassica oleracea var Tête de Nègre. C.R. académie des Sciences , 280 (25) , 2845-2847.

RABINO I., MANCINELLI A.L. et KUZMANOFF K.M. - 1977 - Photocontrol of anthocyanin synthesis VI) Spectral sensitivity, irradiance dependence and reciprocity relationships. Plant Physiol., 59 , 569 - 573.

RANJEVA R. - 1978 - La biosynthèse des dérivés hydroxycinnamiques chez Petunia hybrida. Un exemple de diversification biochimique. Thèse. Université Paul Sabatier. Toulouse.

REINHOLD J. et KOCHS - 1935 - Der Einfluss der Düngung auf Ertrag und Qualität des Kohles. Zeitsch. Pfl. Ern. Dung. U Bodenkd , 39 , 198 - 211.

RIBEREAU - GAYON P. - 1959 - Recherches sur les anthocyanes des végétaux. Application au genre Vitis. Lib. Gen. de l'Enseignement Ed Paris

RIBEREAU-GAYON P. - 1963 - Les anthocyanes des fruits: méthodes d'identification et applications. Mises au point de chimie analytique, organique, pharmaceutique et bromatologique. Deuxième partie , 190 - 220.

RIBEREAU-GAYON P. - 1968 - Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod. Paris.

ROBINSON T. - 1975 - The organic constituents of higher plants. Cordus Press Ed. North Amherst, Mass, (USA)

ROLLIN P. - 1964 - Les réactions de photomorphogenèse chez les plantules de Phacelia tanacetifolia. Ann. Physiol. Vég. , 6 , 5 - 16.

ROLLIN P. - 1970 - Phytochrome, photomorphogenèse et photopériodisme Monographies de physiologie végétales (Masson et Cie).

SANNIE C. et SAUVAIN N. - 1952 - Les couleurs des fleurs et des fruits. Anthocyanes et flavones. Mémoire du muséum national d'histoire naturelle, nouvelle série, série B II. Paris.

SARKANEN K.V. et LUDWIG C.H. - 1971 - Lignins occurrence formation structure and metabolism. Wiley - Interscience, Wiley and Sons, Inc., New York, London, Sydney, Toronto.

SCHNEIDER M.J. et STIMSON W.R. - 1971 - Contribution of photosynthesis and phytochrome to the formation of anthocyanins in turnip seedlings. Plant Physiol , 48 , 312 - 315.

SCHNEIDER M.J. et STIMSON W.R. - 1972 - Phytochrome and photosystem I interaction in a high energy photoreponse. Proc; Nat. Acad.Sci.USA. , 69 , 2150 - 2154.

SEILLEUR P. et MARTIAT J.C. - 1978 - Régénération de plantes à partir d'explants de limbe foliaire de chou chinois (Brassica pekinensis) Bull. Soc. Roy. Bot. de Belgique. , T II (2) , 237 - 242.

SEJHADRI T.k. - 1962 - In the chemistry of flavonoids compounds. J.B. HARBORNE Ed. Academic Press - New York.

SHAH R.R. et MEHTA A.R. - 1978 - Effect of nitrogen nutrition on growth and phenolic accumulation in Crotalaria tissues cultured in vitro. Indian Journal of Experimental Biology., 16 , 1144 - 1147.

SHAH R.R. et MEHTA A.R. - 1978 - Growth and phenolic production in callus cultures of Crotalaria . Reprinted from Curr. Sci. , 47 (3) , 91 - 92.

SHAH R.R. et MEHTA A.R. - 1978 - Influence of phenolic acids on growth and production of phenolic compounds in Crotalaria callus cultures. Bangladesh Journal of Botany , 7 (1) , 51 - 57.

SHAH R.R., SUBBAIAH K.V. et MEHTA A.R. - 1978 - Carbohydrate influence on polyphenol accumulation in Cassia and Datura tissues cultured in vitro. Biologia Platarum (Praha) , 20 (1) , 5 - 13.

SIEGELMAN H.W. et HENDRICKS S.B. - 1957 - Photocontrol of anthocyanin formation in turnip and red cabbage seedlings. Plant Physiol, 32, 393-398.

SLABECKA-SZWEYKOWSKA A. - 1952 - On the conditions of anthocyanins formation in the Vitis vinifera tissue cultivated in vitro. Acta. Soc. Bot. Poloniae , 21 , 537 - 576.

SLABECKA-SZWEYKOWSKA - 1955 - On the influence of wave length of light on the biogenesis of anthocyanin pigment in the Vitis vinifera tissue in vitro. Acta. Soc. Bot. Poloniae , 24 (1) , 3- 11.

SLABECKA-SZWEYKOWSKA A. - 1955 - The influence of light on the biogenesis of rubrobrassicine in seedlings of red cabbage. Acta.Soc.Bot Poloniae , 24 (1) , 13 - 26.

STABA E.J. - 1969 - Plant tissue culture as a technique for the phytochemist. Phytochemistry , 2 , 75 - 106.

STATOUA A. - 1982 - Apport de la spectrométrie Raman de résonance à l'étude des anthocyanes. Thèse de 3^{ième} cycle, Université des Sciences et Techniques, Villeneuve d'ascq.

STRAUS J. - 1959 - Anthocyanin synthesis in corn endosperme tissue cultures. I) Identity of pigments and general factors. Plant Physiol 34 (5) , 536 - 541.

STRAUS J. - 1960 - Anthocyanin synthesis in corn endosperme tissue cultures. II) Effect of certain inhibitory and stimulatory agents. Plant Physiol , 35 (5) , 645 - 650.

SZWEYKOWSKA A. - 1957 - Anthocyanin pigments and the influence of light on the development of cabbage seedlings. Acta. Soc. Bot. Poloniae , 26 (2) , 349 - 359.

SZWEYKOWSKA A. - 1959 - The effect of nitrogen feeding on anthocyanin synthesis in isolated red cabbage embryos. Acta. Soc. Bot. Poloniae , 28 (3) , 530 - 549.

THIMANN K.V. et EDMONDSON Y.H. - 1949 - The biogenesis of anthocyanins. I) General nutritional conditions leading to anthocyanin formation Arch. Biochem. , 22 , 33 - 53.

- THIMANN K.V , EDMONDSON Y.H et RADNER B.S. - 1951 - The biogenesis of anthocyanins. III) The role of sugars in the anthocyanin formation. Arch. Biochem. Biophys. , 34 , 305 - 323.
- THIMANN K.V et RADNER B.S. - 1955 - The biogenesis of anthocyanins V) Evidence for the mediation of pyridines in anthocyanin synthesis. Arch. Biochem. Biophys. , 59 , 511 - 525.
- THIMANN K.V et RADNER B.S. - 1958 - The biogenesis of anthocyanins. VI) The role of riboflavine. Arch. Biochem. Biophys. , 74, 209 - 223.
- TIMBERLAKE C.F. - 1981 - Anthocyanins in fruits and vegetables. Recent Advances in the Biochemistry of Fruit and vegetables , chap 12.
- TOPONI M. - 1963 - Caractères histologiques de fragments de feuilles de chou vert (Brassica oleracea L. var. Acephala) cultivés in vitro. C. R. Acad. Sci. Paris , 256 , 485 - 487.
- TOPONI M. - 1963 - Caractères histologiques de fragments de feuilles de chou rouge (Brassica oleracea L. var. Capitata) cultivés in vitro. C. R. Acad. Sci. Paris , 256 , 1144 - 1147.
- VASSEUR J. - 1978 - Etude du bourgeonnement de fragments de feuilles étiolées d'endive (Chicorium intibus L.) en fonction des critères physiologiques et biochimiques. Thèse d'état - Université des sciences et techniques de Lille.
- VINCE D et GRILL R. - 1966 - The photoreceptors involved in anthocyanin synthesis. Photochemistry and Photobiology , 5 , 407 - 411.
- VON ALFERMAN A.W.A , MERZ D et REINHARD E. - 1975 - Induktion der anthocyanbiosynthese in Kalluskulturen von Daucus carota. Planta Medica. Suppl. 70 - 78.
- WELLMANN E , GEZA HRAZDINA et GRISEBACH H. - 1976 - Induction of anthocyanin formation and of enzymes related to its biosynthesis by UV light in cell culture of Haplopaopus gracilis. Phytochemistry , 15 , 913- 915

WITHROW R.B., KLEIN W.L., PRICE L. et ELSTAD V. - 1953 - The influence of visible and near infra red radiant energy on the organ development and pigments synthesis in bean and corn. Plant Physiol; 28 , 1 - 14.

YAMAMOTO K.T. et FURUYA M. - 1975 - Photoreversible binding in vitro of cytosolic phytochrome to particulate fraction isolated from pea Planta , 17 , 177 - 186.

YOUNG. - 1973 - Studies on the growth in culture of plant cells. XVI) Nitrogen assimilation during nitrogen limited growth of Acer pseudoplatanus cells in chemostat culture. J. Exp. Bot. , 24 , 1172-1178.

