

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE PRODUCTION D'ANTHOCYANES DANS LES FEUILLES DE BOUTURES À UN ŒIL DE CARIGNAN (*Vitis vinifera* L.) CULTIVÉES AU LABORATOIRE

ACHIEVEMENT OF ANTHOCYANINS PRODUCTION IN GRAPE LEAVES OF CARIGNAN (*Vitis vinifera* L.) EXITS OF ONE EYE CUTTINGS CULTIVATED IN LABORATORY

B. EZZILI* et ¹, G. DARNÉ** et M. BEJAOU*

*UBVRG, INRST, B.P. 95, 2050, Hammam Lif (Tunisie)

**Laboratoire des Sciences de la Vigne, Université Bordeaux I,
avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex (France)

Résumé : Sous certaines conditions de laboratoire (30 jours d'obscurité totale suivis de 21 jours de maintien en serre sous une photopériode de 12 heures), il est possible d'obtenir une production de pigments anthocyaniques par les feuilles de boutures à 1 œil du cépage Carignan avec un rendement égal à 25 p. cent de celui des feuilles du même cépage cultivé au vignoble dans la région d'El Khenguët (Tunisie). L'analyse par chromatographie liquide à haute performance montre que ce sont les mêmes molécules qui sont synthétisées par les boutures, mais avec une plus forte proportion d'anthocyanes estérifiées.

Abstract : Under some laboratory conditions, it is possible to obtain a production of anthocyanins by the leaves of grape cuttings.

The objective of this work consists in the comparison between contents in anthocyanin pigments of leaves of stemming Carignan of one eye cuttings cultivated in various conditions of laboratory with those of leaves of the same cultivated grape to the vineyard in the area of El Khenguët UCP Sidi Slama (Tunisia).

We have measured the growth in length and in diameter of stems of the cuttings processed 30 days in total darkness and compared to cuttings witnesses raised in greenhouse. The same comparison has been undertaken on cuttings having undergone 30 days stay in total darkness and 21 days of maintenance in greenhouse with witness that has undergone 51 days in greenhouse.

The total darkness during 30 days favors the growth in length and in diameter of shoots, reduced the leaf surface, and blocks the synthesis of anthocyanin as compared to the photoperiod of 12 hours of darkness/12 hours of light.

The total darkness during 30 steady days by a photoperiod of 12 hours light/12 hours darkness during 21 days induces a resumption of the leaf growth and a synthesis of anthocyanins in leaves and in stems.

The analysis of the anthocyanin, undertaken by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) allowed to detect the five anthocyanin 3-monoglucosides following: Delphinidin MG3 - Cyanidin MG3 - Petunidin MG3 - Pæonidin MG3 and Malvidin MG3.

They are in the free form and in the combined form, esterified by acetic, caffeic and coumaric acids in stemming leaves of the vineyard as well as in those developed in the laboratory. The combined anthocyanins are better represented in the cutting cultivated in laboratory.

The Cyanidin 3-monoglucoside, the Pæonidin 3-monoglucoside and the Malvidin 3-monoglucoside present a maximal content at the period of the fall of leaves. The other anthocyanin pigments have similar contents always weaker than those of Cyanidin MG3 and Pæonidine MG3.

The output in total anthocyanin obtained of the cuttings of the laboratory is equal to 25 p. cent of that of the vineyard.

Mots clés : anthocyanines, *Vitis vinifera* L., Carignan, boutures, feuilles, vignoble, serre

Key words : anthocyanins, *Vitis vinifera* L., Carignan, grape cuttings, grape leaves, vineyard, greenhouse

INTRODUCTION

L'importance des composés phénoliques de la Vigne est démontrée dans toute la filière liée au raisin et au vin : vinification, maladies des vins, conservation et vieillissement du vin, typicité des vins (SINGLETON et ESAU, 1969 ; RIBÉREAU-GAYON, 1972), indice de maturation du raisin (AUGUSTIN et GLORIES, 1992), etc. Certains travaux ont été consacrés aux anthocyanes et aux tanins des feuilles de Vigne en vue de mieux comprendre le métabolisme et le contrôle génétique de ces composés phénoliques (DARNÉ et GLORIES, 1988 ; DARNÉ, 1991), d'autres ont analysé les feuilles de Vigne rouge pour leurs propriétés hygiéniques et médicinales (LAPARRA et DARNÉ, 1989 ; EZZILI *et al.*, 1997). Mais la Vigne étant traitée contre les maladies cryptogamiques et parasitaires, les feuilles rouges provenant du vignoble peuvent renfermer des résidus de fongicides et d'insecticides.

Le lavage à l'eau ayant extraction, l'atomisation (LAPARRA et DARNÉ, 1989) ou la lyophilisation des extraits (EZZILI *et al.*, 1997) peuvent être à l'origine d'une diminution de la teneur en ces pigments.

La recherche d'un procédé biotechnologique ou d'un autre mécanisme de production de ces métabolites secondaires au laboratoire, sans que la Vigne soit traitée par les pesticides, peut être un objectif important comme cela a été fait avec d'autres plantes supérieures (TAKEDA, 1988 et 1990). Ajoutons que la production de métabolites secondaires par des feuilles d'arbres nécessite un développement de la plante qui dure au moins 4-5 années. TABATA *et al.* (1974) et ZENK *et al.* (1978) ont montré que les cellules végétales peuvent avoir un potentiel de biosynthèse et produire des métabolites secondaires. Toutefois la variabilité biochimique notée au cours des repiquages entraîne une diminution dans les teneurs de ces métabolites secondaires. Dans certains cas, les cultures n'accumulent pas beaucoup de composés attendus (BERLIN *et al.*, 1985). Les métabolites formés ne sont pas éliminés dans le milieu, ils sont synthétisés dans le cytoplasme (ZENK, 1985) et stockés dans la vacuole (SANDERS *et al.*, 1977 ; KREIS et REINHARD, 1987 ; RENAUDIN *et al.*, 1985). Ces différents problèmes n'ont pas aidé cette technique alternative à trouver sa place dans la biotechnologie végétale de production, nous avons donc cherché d'autres moyens moins coûteux et pouvant arriver à un résultat intéressant ; d'où l'idée d'utiliser les boutures de sarments de Vigne et un procédé biophysique : la transduction des signaux lumineux.

L'objectif de notre travail consiste à faire produire ces métabolites secondaires par les rameaux et le

feuillage de boutures de Vigne à un œil cultivées au laboratoire. Afin d'apprécier la technique d'obtention de ces produits, nous avons comparé la composition en anthocyanes foliaires des boutures d'un cépage noir classique, le Carignan, à celle des feuilles du même cépage récoltées dans le vignoble à 3 dates de prélèvement.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - MATÉRIEL VÉGÉTAL

Les feuilles de Vigne proviennent du cépage Carignan (*Vitis vinifera* L.) et sont issues de l'Union Coopérative de Production (Khenguët EL Houjjaj Sidi Slama, Tunisie). Elles ont toujours été prélevées en face de la grappe de rang 1 sur le rameau principal.

Les prélèvements dans le vignoble ont été effectués en 1996 à 3 dates : le 02/10, le 17/10 et le 31/10.

Par ailleurs, 2 000 boutures de Carignan provenant de la même parcelle ont été coupées à une longueur standard de 12 centimètres, ébourgeonnées afin de ne retenir que le bourgeon de rang 8, puis plantées dans des bocaux de 1 litre contenant de l'eau de ville dont la composition est donnée dans le tableau I.

TABLEAU I
Composition de l'eau de ville utilisée
dans nos expériences

Table I - Composition of the city water used
in our experiments

Éléments	mg/l
K	6,5
Ca	144,5
Mg	36,5
Cl	362
NO ₃ ⁻	0
SO ₄ ⁻	400
PO ₄ ⁻	traces
Fe	0,9

Les boutures ont été maintenues à l'obscurité totale dans les conditions suivantes : humidité relative de 60 p. cent et température constante (23°C ± 2).

Le nombre de bourgeons ayant atteint le stade de débourrement appelé D0 a été noté chaque jour.

Tous les quinze jours, les boutures ont été lavées à l'eau courante et, par voie de conséquence, légèrement éclairées pendant une heure. Cette opération a été faite

deux fois durant le prétraitement à l'obscurité. Trente jours après la date de débourement à l'obscurité totale, les boutures ont été transférées dans une serre dont les conditions étaient une photopériode de 12 heures de lumière/12 heures d'obscurité, une température de $23^{\circ}\text{C} \pm 2$ et un degré d'humidité de 60 p. cent. Trois semaines plus tard, les feuilles devenues rouges ont été récoltées.

Nous avons apprécié la croissance en longueur et en épaisseur des pousses des boutures traitées à l'obscurité totale par rapport à celles de boutures témoins élevées en serre. Les mêmes mesures ont été effectuées sur les rameaux de boutures ayant d'abord subi 30 jours de prétraitement à l'obscurité totale avant d'être transférées pendant 3 semaines en serre et comparées à celles faites sur un témoin qui a subi 51 jours de serre.

Les feuilles issues des rameaux provenant des boutures à un œil cultivées au laboratoire d'une part, et celles prélevées au vignoble les 2, 17 et 31 octobre d'autre part, ont été congelées pendant 15 jours, puis lyophilisées et réduites en poudre fine.

II - ÉTUDE DES ANTHOCYANES

1) Préparation des échantillons

L'extraction des anthocyanes a été réalisée sur 1 gramme d'échantillon selon la technique de DARNÉ et MADERO-TAMARGO (1979). Les extraits phénoliques ont été concentrés sous vide puis repris dans 2 ml de méthanol à 1 p. cent d'HCl (v/v).

2) Dosage des anthocyanes

Les différentes molécules ont été séparées par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) selon les conditions chromatographiques suivantes :

- Colonne = Lichrocart 250 mm - 4 ;

- Phase stationnaire = Lichrospher 100 - RP - 18 (5 μm) ;

- Phase mobile : Mélange binaire d'un solvant « A » (eau à 5 p. cent d'acide formique, pH = 2,1) et d'un solvant « B » (Méthanol R.P. à 5 p. cent d'acide formique) préalablement filtrés sur membrane de 0,45 μm , selon le gradient d'éluion suivant :

temps en minutes	0	10	40	40,5	45
% solvant B	20	20	60	100	100

- Débit : 1 ml par minute ;

- Température : ambiante (23°C) ;

- Volume injecté : 20 μl d'extrait ce qui correspond à 1 mg MS préalablement filtré sur membrane de 0,45 μm ;

- Détection : par spectrophotométrie à λ 520 nm avec un détecteur Beckman 168 à barette de diodes ;

- Cellule de 11 μl ;

- Trajet optique de 10 mm.

Les teneurs ont été calculées par étalonnage externe.

RÉSULTATS

I - LES COMPOSÉS ANTHOCYANIQUES DES FEUILLES DE CARIGNAN ISSUES DU VIGNOBLE D'EL KHENGUET

1) Nature des anthocyanes

Suivant la date de prélèvement, on obtient de 9 à 18 pics sur les chromatogrammes réalisés à partir des extraits de feuilles de Carignan. Ils sont élués selon deux groupes :

- 5 anthocyanines identifiées par co-chromatographie avec des témoins constituent le premier groupe de pics élués entre 15 et 21 minutes.

- pic n°1 monoglucoside en 3 de la delphinidine (MG3-Dp),
- pic n°2 monoglucoside en 3 de la cyanidine (MG3-Cy),
- pic n°3 monoglucoside en 3 de la pétunidine (MG3-Pt),
- pic n°4 monoglucoside en 3 de la pæonidine (MG3-Pn),
- pic n°5 monoglucoside en 3 de la malvidine (MG3-Mv).

Ces anthocyanines sont présentes en quantité importante et variable. Ce sont les monoglucosides en 3 de la cyanidine, de la pæonidine et de la malvidine qui représentent la majeure partie des anthocyanes libres des feuilles de Vigne analysées.

Le deuxième groupe d'anthocyanines mis en évidence correspond à des anthocyanines combinées, c'est-à-dire estérifiées par les acides acétique, caféique et coumarique. Leur nombre varie avec la date de la récolte.

- pic n°6 acétate de delphinidine,
- pic n°7 acétate de cyanidine,
- pic n°8 acétate de pétunidine,

- pic n°9 aétate de pæonidine,
 pic n° 10 acétate de malvidine,
 pic n° 11 caféate de delphinidine,
 pic n° 12 caféate de cyanidine,
 pic n° 13 caféate de pétunidine,
 pic n° 14 caféate de pæonidine,
 pic n° 15 caféate de malvidine,
 pic n° 16 coumarate de cyanidine,
 pic n° 17 coumarate de pæonidine,
 pic n° 18 coumarate de malvidine.

II - COMPOSITION ANTHOCYANIQUE DES FEUILLES EN FONCTION DE LA DATE DE PRÉLÈVEMENT

1) Évolution de la teneur en anthocyanes totales

- Les vendanges ont eu lieu aux environs du 01/09/1996. Le tableau II montre qu'il y a une augmentation qui passe par un maximum situé environ un mois et demi après la date des vendanges et une diminution à l'époque de la chute des feuilles.

- Cette situation est due à l'évolution des anthocyanes non combinées, en particulier à celle des molécules majoritaires, les monoglucosides en 3 de la cyanidine, de la pæonidine et de la malvidine.

2) Évolution de la teneur en anthocyanes combinées

Les anthocyanes combinées des feuilles de Carignan représentent de 17 à 23 p. cent des anthocyanes totales selon la date de la récolte (tableau II). La teneur minimale en ces composés se trouve quand il y a un maximum d'anthocyanidines.

III - ÉVOLUTION DE LA NATURE DES ANTHOCYANES

1) Les anthocyanines

Les monoglucosides de la cyanidine, de la pæonidine et de la malvidine sont les principales molécules. La malvidine est moins bien représentée que la cyanidine.

La teneur en monoglucosides de la delphinidine et de la pétunidine augmente au fur et à mesure que l'on s'approche du stade de la chute des feuilles.

Chez le Carignan cultivé à El Khenguet, les proportions des principales anthocyanidines varient considérablement : diminution de la cyanidine, augmentation de la pæonidine et de la malvidine en fonction de la date de prélèvement (tableau II), mais ces trois molécules restent toujours majoritaires à la chute des feuilles.

Concernant la malvidine, il est très curieux de noter que l'augmentation de sa teneur est continue et que contrairement aux autres pigments majoritaires qui diminuent à la chute des feuilles, ce pigment est en nette augmentation. Ce fait n'est pas en désaccord avec l'hypothèse de JONSONN *et al.* (1983) qui considèrent que la méthylation constitue la dernière étape de la synthèse des anthocyanes des fleurs de *Petunia hybrida* Hort. Cette synthèse ne s'effectuerait pas dans les vacuoles, mais dans le cytosol où sont localisées les anthocyanines méthyl-transférases. On peut donc proposer un mécanisme de formation de la pæonidine et de la malvidine à partir de la cyanidine dans les feuilles de Carignan en Tunisie (figure 1).

TABLEAU II

Composition en anthocyanes des feuilles de Carignan prélevées dans le vignoble

Les teneurs sont exprimées en µg/g de matière sèche et les pourcentages sont exprimés par rapport à la teneur totale en anthocyanes.

Table II - Anthocyanin composition of Carignan leaves

Contents are expressed by µg/g of dried matter and percentages are expressed on total anthocyanin content.

Stades	Vignoble 02/10/1996		Vignoble 17/10/1996		Vignoble 31/10/1996	
	µg/g	%	µg/g	%	µg/g	%
Anthocyanes non combinées	1218,9	78,00	3290,8	82,31	2325,1	76,48
MG3-Dp	14,9	0,80	71,8	1,79	117,2	3,85
MG3-Cy	792,4	50,00	1602,8	40,08	483,6	15,90
MG3-Pt	11,8	0,75	79,6	1,99	92,8	3,05
MG3-Pn	368,8	23,66	1208,0	30,21	1187,7	39,06
MG3-Mv	31,0	1,98	328,9	8,20	443,8	14,59
Anthocyanines combinées	339,3	21,77	707,0	17,68	715,0	23,55
Acétates	175,6	11,26	206,4	5,16	329,2	10,82
Caféates	27,5	1,76	155,6	3,89	77,6	2,55
Coumarates	136,2	8,74	345,0	8,92	308,2	10,12
Anthocyanes totales	1558,2	100	3998,0	100	3040,0	100

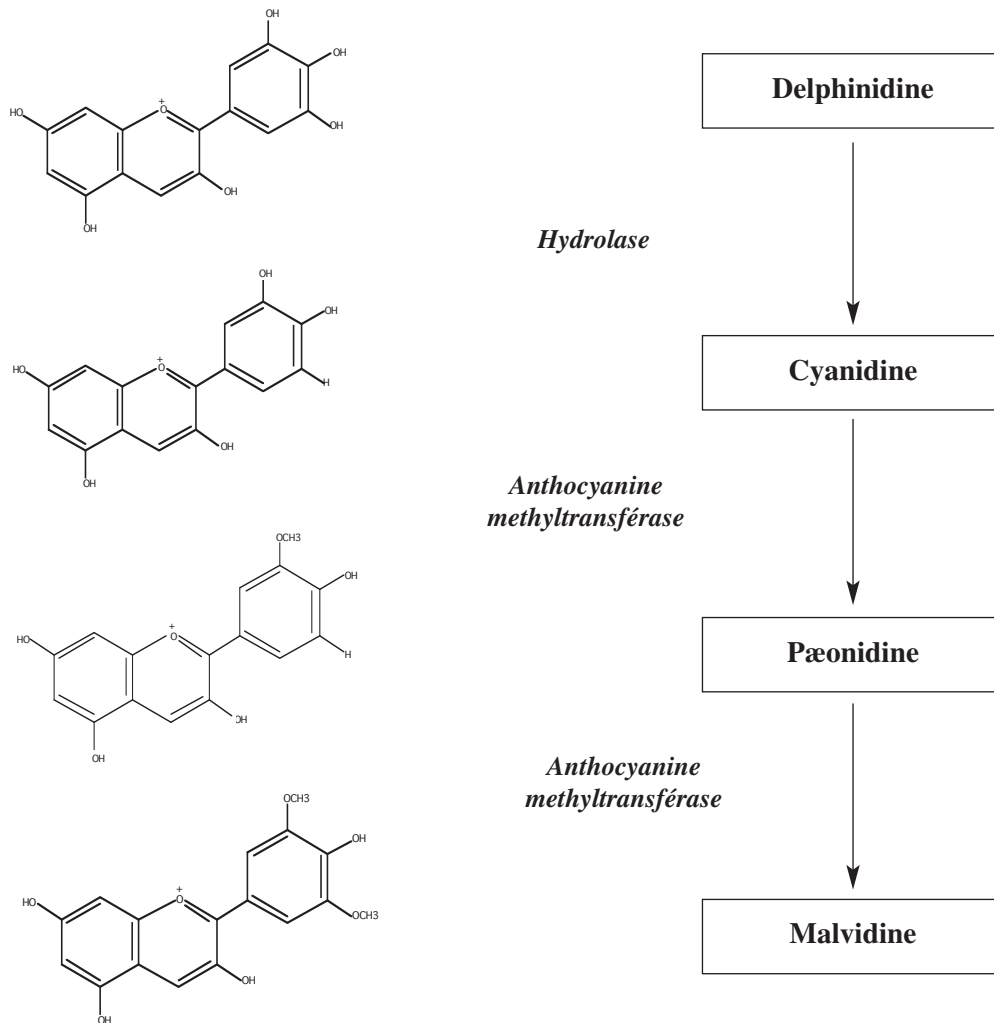


Fig. 1 - Schéma hypothétique de la formation des différentes molécules anthocyanidiques des feuilles de Carignan à partir de la cyanidine.

Fig. 1 - Hypothetic formation of the anthocyanidins from the cyanidin in Carignan grape leaves.

Vérification de l'hypothèse :

Les tableaux III, IV et V montrent respectivement l'évolution de la cyanidine et de la cyanidine combinée en fonction de la date de prélèvement (tableau III), puis de la pæonidine et de ses dérivés (tableau IV), et enfin de la malvidine et de ses dérivés (tableau V).

Si il y a transformation de la cyanidine en pæonidine on peut écrire que :

(cyanidine + cyanidine combinée + pæonidine + pæonidine combinée) 17/10/1996

=

(cyanidine + cyanidine combinée + pæonidine + pæonidine combinée) 31/10/1996

Le 17/10/1996, l'égalité donne 45,7+ 31,6 = 26,8 + 51,9 le 31/10/1996.

La somme des pourcentages de cyanidine et de pæonidine est à peu près la même, ce qui laisse à penser que, dans les feuilles de Carignan, la cyanidine se transforme en pæonidine.

Le même raisonnement conduit à penser que, dans les feuilles de Carignan, la pæonidine se transforme en malvidine.

Notons tout de même qu'à partir du 17/10/1996, la biosynthèse de la cyanidine est perturbée alors que le passage de la cyanidine à la pæonidine est un mécanisme restant aussi actif.

2) Les anthocyanes combinées

Le 17/10/1996, on passe de 78 à 82,5 p. cent d'anthocyanines, alors que les composés combinés chutent de 22 à 17,5 p. cent, ce qui suggère qu'une par-

TABLEAU III**Evolution de la cyanidine et de la cyanidine combinée en fonction du temps****Table III - Cyanidin and combined cyanidin evolution in function of time**

Date	Cyanidine	Acétate	Caféate	Coumarate	Total
2/10	50,90	-	-	2,91	53,80
17/10	37,26	3,10	0,60	4,70	45,70
31/10	15,60	3,20	-	8,02	26,80

TABLEAU IV**Evolution de la pæonidine et de la pæonidine combinée en fonction du temps****Table IV - Pæonidin and combined pæonidin evolution in function of time**

Date	Pæonidine	Acétate	Caféate	Coumarate	Total
2/10	25,985	11,009	0,763	-	37,7
17/10	30,993	0,651	0,086	-	31,6
31/10	41,996	7,445	2,500	-	51,9

TABLEAU V**Evolution de la malvidine et de la malvidine combinée en fonction du temps****Table V - Malvidin and combined malvidin evolution in function of time**

Date	Malvidine	Acétate	Caféate	Coumarate	Total
2/10	1,990	-	-	-	1,99
17/10	7,690	0,086	2,620	-	10,4
31/10	14,340	-	-	-	14,34

TABLEAU VI**Evolution de la delphinidine et de la delphinidine combinée en fonction du temps****Table VI - Delphinidin and combined delphinidin evolution in function of time**

Date	Delphinidine	Acétate	Caféate	Coumarate	Total
2/10	0,96	-	-	2,403	3,30
17/10	1,70	0,779	0,076	0,30	2,85
31/10	3,80	-	-	-	3,80

TABLEAU VII**Evolution de la pétunidine et de la pétunidine combinée en fonction du temps****Table VII - Petunidin and combined petunidin evolution in function of time**

Date	Pétunidine	Acétate	Caféate	Coumarate	Total
2/10	0,759	0,163	1,001	-	1,920
17/10	1,860	0,226	0,263	?	?
31/10	3,000	-	-	?	?

TABLEAU VIII**Influence de l'obscurité totale sur les paramètres de la croissance des boutures du Carignan****Table VIII - Total darkness influence on growth parameters of Carignan grape cuttings**

	Témoin (serre) Photopériode 12/12	Traité Pousses ayant évolué à l'obscurité totale		
Longueur (mm)	51,2 ± 6,7	112,4 ± 10,6		
Aire de la tige (mm ²)	11,2 ± 1,1	(G1) 24,1 ± 2,1	(G2) 18,3 ± 1,9	(G3) 14,8 ± 2,1
Surface foliaire (mm ²)	1680 ± 210	128 ± 25		

tie des anthocyanines apparues à cette date provient de l'hydrolyse des anthocyanines combinées correspondantes. Une autre hypothèse peut également être envisagée, qui est le passage des anthocyanines aux anthocyanines combinées, ce qui explique l'absence totale d'acétate de cyanidine le 02/10/1996 et l'abondance de ce composé le 17/10/1996. A cette date, toutes les anthocyanidines peuvent être estérifiées à l'acétate et au caféate, alors que le coumarate n'estérifie que la delphinidine et la cyanidine. Le 31/10/1996, il n'y a plus que l'acétate de cyanidine, le caféate de pæonidine et le coumarate de cyanidine.

Il est probable que la biosynthèse de la pétunidine, de la delphinidine et de la malvidine se fait d'abord sous forme combinée. C'est ce qui explique, en partie, la disparition totale de la pétunidine combinée (tableau VII), de la delphinidine combinée (tableau VI) et de la malvidine, ainsi que l'augmentation de leurs teneurs en fin de cycle.

II - LES COMPOSÉS ANTHOCYANIQUES DES FEUILLES DES BOUTURES DE CARIGNAN CULTIVÉES AU LABORATOIRE.

L'induction d'anthocyanes, telle que nous l'avons obtenue d'une manière reproductible pendant les trois dernières années (1995-1996-1997), nécessite deux phases successives :

- une première phase où il n'y a pas ou peu de lumière ;

- une phase lumineuse.

Nous décrirons d'abord l'évolution du végétal durant ces 2 phases et nous analyserons ensuite les données relatives aux composés phénoliques.

1) Phénologie

Les boutures à un œil de Carignan sont maintenues à l'obscurité totale, à la température de $23^{\circ}\text{C} \pm 2$. Le débourrement se fait alors normalement. Au bout de 30 jours, les bourgeons ayant débourré développent 5-6 feuilles très réduites caractérisées par l'absence de pigments chlorophylliens.

Les plants ainsi développés sont transférés en serre thermorégulée à $23^{\circ}\text{C} \pm 2$ le jour, 20°C la nuit, sous une photopériode de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité.

Au bout d'une semaine, une croissance foliaire est notée et une pigmentation normale apparaît. Les premiers signes d'apparition d'une coloration rouge sur

l'épiderme des rameaux principaux apparaissent 10 à 13 jours après leur transfert. La coloration devient plus franche, de type rouge vineux, et les feuilles de la base et de la partie apicale grandissent normalement.

2) Influence de l'obscurité totale sur les paramètres végétatifs

a) Croissance en longueur

Le tableau VIII compare la croissance en longueur, un mois après le débourrement, des pousses développées à l'obscurité à celle des boutures développées en serre (12 heures de lumière + 12 heures d'obscurité). Les différences sont significatives à $\alpha = 0,001$ selon le test de Student. L'obscurité totale induit donc une augmentation de la longueur du rameau, phénomène bien connu.

b) Croissance en épaisseur

Le tableau VIII indique, en mm^2 , l'aire de la tige développée selon les conditions de traitements et coupée transversalement dans la partie médiane. La méthode statistique de la plus petite différence significative montre nettement qu'à l'obscurité totale trois groupes (G1, G2, G3) s'individualisent, présentant chacun une aire nettement supérieure à celle des pousses développées en serre. Le classement obtenu selon cette méthode serait alors :

$$\text{Serre} < \text{G3} < \text{G2} < \text{G1}.$$

Le maintien des boutures à l'obscurité totale a donc induit une croissance en épaisseur de la pousse nettement plus importante que celle des boutures témoins développées uniquement en serre éclairée (12 h/24). Ce résultat, inattendu, pourrait s'expliquer par une augmentation du volume des cellules par turgescence du fait de l'absence de transpiration à l'obscurité totale, phénomène que nous cherchons à vérifier actuellement.

c) Surface foliaire

L'obscurité totale réduit 15 fois la surface foliaire par rapport aux conditions de serre.

A partir de ces données, nous constatons que cette première phase, où il n'y a pas ou très peu de lumière induit un allongement anormal des tiges, une augmentation de leur diamètre et une réduction considérable de la surface foliaire, mais elle n'entraîne pas de synthèse d'anthocyanes. Ces conditions sont pratiquement celles d'un étiolement.

TABLEAU IX

Influence du prétraitement à l'obscurité sur les paramètres de la croissance des boutures de Carignan transférées en serre (12 heures de lumière par jour)

Table IX - Influence of the pretreatment to the darkness on growth parameters of Carignan grape cuttings transferred in greenhouse (12 hours of light per day)

	Témoin (serre 51 jours)	Traité (30 jours d'obscurité + 21 jours en serre)		
Longueur (mm)	61,8 ± 7,2	120,2 ± 18,1		
Aire de la tige (mm ²)	11,4 ± 1,8	(G1) 20,1 ± 2,7	(G2) 16,5 ± 2,7	(G3) 13,9 ± 1,9
Surface foliaire (mm ²)	1740 ± 250	1080 ± 215		

TABLEAU X

Composition en anthocyanes des feuilles des boutures de Carignan cultivées au laboratoire

Les teneurs sont exprimées en µg/g de matière sèche et les pourcentages sont exprimés par rapport à la teneur totale en anthocyanes.

Table X - Anthocyanin composition of Carignan leaves

Contents are expressed by µg/g of dried matter and percentages are expressed on total anthocyanin content.

Stades	Feuilles rouges (stade 1)		Feuilles rouges (stade 1 + 15 jours)	
	µg/g	%	µg/g	%
Anthocyanines	770,1	64,19	922,1	72,95
MG3-Dp	52,0	4,30	92,5	7,31
MG3-Cy	282,4	23,54	395,0	31,25
MG3-Pt	46,7	3,89	34,4	2,72
MG3-Pn	286,6	23,83	324,1	25,64
MG3-Mv	102,4	8,53	76,1	6,02
Anthocyanines combinées	429,5	35,80	341,9	27,04
Acétates	140,5	11,71	103,0	8,14
Caféates	90,2	7,51	20,2	1,59
Coumarates	198,8	16,57	218,7	17,30
Anthocyanes totales	1199,0	100	1264,0	100

Au bout de 30 jours, il y a des perturbations morphologiques, mais aucune désintégration membranaire n'a été constatée par les observations microscopiques, bien que le substrat utilisé soit de l'eau ordinaire.

III - INFLUENCE DU PRÉTRAITEMENT À L'OBSCURITÉ SUR LA CROISSANCE VÉGÉTATIVE DE LA BOUTURE

1) Croissance en longueur

Le transfert des boutures du système des faibles lumières à la lumière blanche n'a pas affecté la croissance en longueur de leurs pousses, si l'on compare les pourcentages d'augmentation, entre 30 et 51 jours, à ceux des pousses des boutures cultivées directement en serre (tableau IX).

2) Croissance en épaisseur

Contrairement à la croissance en longueur, la section de la tige a diminué quel que soit le groupe. Cela démontre que la pousse étiolée acquiert des caractères différents de la pousse normale et, quand on revient en conditions de serre, la pousse tend à revenir à ses caractéristiques d'origine : la transpiration diminuerait la turgescence des cellules.

tères d'origine : la transpiration diminuerait la turgescence des cellules.

3) Surface foliaire

Le transfert des boutures de l'obscurité à la serre pour 21 jours induit une augmentation de leur surface foliaire de 1 000 p. cent. Mais il ne permet pas de rattraper la surface foliaire moyenne des pousses cultivées en serre depuis le début pendant 51 jours.

IV - LES COMPOSÉS ANTHOCYANIQUES DES FEUILLES DES BOUTURES DE CARIGNAN CULTIVÉES AU LABORATOIRE

1) Nature des anthocyanes

Nous retrouvons les mêmes pigments (tableau X) que ceux synthétisés dans les feuilles du vignoble.

2) Rendement anthocyanique des feuilles

Le procédé d'induction des anthocyanes dans les feuilles des boutures de Carignan au laboratoire n'a permis d'obtenir que 25 p. cent de la teneur maximale

déterminée dans les feuilles de Carignan prélevées au vignoble pour le meilleur stade étudié (17/10/1996).

a) Les anthocyanines

Les monoglucosides en 3 de la cyanidine (MG3-Cy) et de la pæonidine (MG3-Pn) représentent les 2 anthocyanines les plus importantes. Cela rappelle le prélèvement au vignoble du 17/10/96 où ces 2 anthocyanines représentent les 2/3 des anthocyanines non combinées. Nous n'avons jamais obtenu de stade plus évolué que celui-là par ce procédé et en utilisant la lumière blanche.

b) Les anthocyanes combinées

Elles sont aussi importantes en quantité que les anthocyanes non combinées. Une bonne partie existe sous forme d'acétate. Les coumarates se trouvent à une concentration légèrement supérieure à celle des caféates. Cela rappelle encore le prélèvement du 17/10/96 effectué au vignoble où ces anthocyanines combinées représentent les molécules majoritaires. Là encore, ce procédé et l'utilisation de la lumière blanche ne nous ont jamais permis d'obtenir de stade plus évolué que celui-là.

CONCLUSIONS

En ce qui concerne les anthocyanes des feuilles de Carignan du vignoble, seule la dernière date, c'est-à-dire le 31/10/1996, permet de classer ce cépage parmi ceux qui présentent trois anthocyanidines majoritaires, à savoir la cyanidine, la pæonidine et la malvidine.

L'évolution des anthocyanes combinées en fonction de la date de prélèvement laisse supposer que ces composés pourraient s'hydrolyser en libérant les acides et les anthocyanines correspondantes. Seule une étude par marquage radioactif avec de l'acétate au carbone 14 pourrait confirmer cette hypothèse.

Il est probable que c'est la synthèse de cyanidine qui se fait en premier lieu dans les feuilles de Carignan et qu'il y a ensuite transformation en pæonidine comme nous l'avons indiqué. Le même raisonnement s'applique pour passer de la pæonidine à la malvidine (figure 1).

En ce qui concerne la production des anthocyanes par les boutures de Carignan au laboratoire, il est net que la première phase de culture (30 jours d'obscurité) induit un étiolement responsable chez le Carignan d'un allongement de la tige, d'une croissance anormale en épaisseur et d'une réduction considérable de la surface

foliaire. Cela s'accompagne d'un blocage de la synthèse des anthocyanes qui sont absentes des feuilles de ces boutures. Ces conditions font penser aux conditions de phototropisme et d'élongation des tiges induites par la lumière et principalement par l'UV lointain (BRIGGS et INO, 1983 ; BRIGGS *et al.*, 1988).

La deuxième phase, après le transfert des boutures de l'obscurité à la serre éclairée sous une photopériode de 12 h, est caractérisée principalement par une forte reprise de la croissance laminaire (la surface foliaire est multipliée par 10 en 21 jours), par une croissance en longueur presque nulle, par une réduction de l'aire de la tige et surtout par une induction de la biosynthèse d'anthocyanes. Il y a là une tendance à un « retour physiologique » induit par les conditions de la serre.

Par ailleurs, le profil anthocyanique des feuilles ne correspond pas à celui du dernier prélèvement effectué au vignoble (31/10/96), mais il ressemble plutôt à celui du premier prélèvement (02/10/96) caractérisé par une prépondérance des anthocyanes combinées. Cela montre la limite des possibilités de la plante à réaliser la synthèse des anthocyanes dans ces conditions de laboratoire, puisque si ces conditions sont maintenues encore quelques jours, ses feuilles jaunissent et tombent.

Quant au rendement anthocyanique, il est voisin de 25 p. cent de la teneur maximale notée dans les feuilles prélevées au vignoble. Cela signifie que, dans nos conditions expérimentales, la bouture paraît incapable de biosynthétiser la quantité normale des anthocyanes majoritaires qui, dans ce cas particulier, sont les monoglucosides en 3 de la cyanidine, de la pæonidine et de la malvidine. On constate aussi que les réactions d'hydrolyse des anthocyanines combinées en anthocyanines libres constatée au vignoble se trouvent ici inhibées.

Nous cherchons actuellement à savoir quels sont le ou les facteurs essentiels agissant sur la production des anthocyanes au cours de la deuxième phase. Nous pensons que l'induction de la synthèse de ces pigments par la lumière blanche pourrait être due à la lumière UVB qui, selon WELLMANN (1983), contrôle la biosynthèse des flavonoïdes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AUGUSTIN M. et GLORIES Y., 1992. Maturité phénologique des raisins rouges. Application au millésime 1991. *Rapport des activités de recherches 1990-1992*, Institut d'Œnologie, Université de Bordeaux II, 55-57.

- BERLIN J., BEIER H., FECKER L., FORCHE E., SASSE F., SCHIEL O. et WRAY V., 1985. Conventional and new approaches to increase the alkaloid production of plant cell cultures. *In : Primary and secondary metabolism of plant cell cultures*. Neumann and *al.*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 272-280.
- BRIGGS W.R. et INO M., 1983. Blue-light-absorbing photoreceptors in plants. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **303**, 347-359.
- BRIGGS W.R., MOSINGER E. et SCHAFER, 1988. Phytochrom regulation of greening in Barley - Effects on chlorophyll accumulation. *Plant Physiol.*, **86**, 435-440.
- DARNÉ G., 1991. Recherches sur la composition en anthocyanes des grappes et des feuilles de Vigne. *Thèse d'Etat ès sciences*, Université Bordeaux I, 206 pages.
- DARNÉ G. et GLORIES Y., 1988. Les anthocyanes des feuilles de différentes variétés de *Vitis vinifera* L. entre la véraison du raisin et la chute des feuilles. *Vitis*, **27**, 71-78.
- DARNÉ G. et MADERO - TAMARGO J., 1979. Mise au point d'une méthode d'extraction des lipides solubles totaux, des glucides solubles totaux et des composés phénoliques solubles totaux des organes de la Vigne. *Vitis*, **18**, n°3, 221-228.
- EZZILI B., HABIB. J., DARNÉ. G. et CHEMLI R., 1997. Influence de la date de prélèvement sur les teneurs en anthocyanes et en éléments minéraux du cépage Alicante Bouschet cultivé à El Khenguët (Tunisie). *Bull O.I.V.*, **70**, 795-796.
- JONSONN L.M., DONKER-KOOPMAN W.E., VITSLAGER P. et SCHRAM A.W., 1983. Subcellular localization of anthocyanin methyltransferase in flowers of *Petunia hybrida*. *Plant Physiol.*, **72**, 287-290.
- KREIS W. et REINHARD E., 1987. Selective uptake and vacuoles storage of cardiac glycosides by suspension cultured *Digitalis lanata* cells. *J. Plant. Physiol.*, **129**, 311-318.
- LAPARRA J. et DARNÉ G., 1989. La feuille de vigne rouge en phytothérapie : Étude des composés anthocyaniques de quelques préparations pharmaceutiques. *Plantes médicinales et phytothérapie*, **23**, n°2, 129-135.
- RENAUDIN J.P., BROWN S.C. et GUERN J., 1985. Compartmentation of alkaloids in a cell suspension of *Catharanthus roseus*. A reappraisal of the role of pH gradient. *In : Primary and secondary metabolism of plant cell cultures*, Neumann *et al.*, Springer Verlag, Berlin et Heidelberg, 124-132.
- RIBÉREAU-GAYON P., 1972. Évolution des composés phénoliques au cours de la maturation du raisin. II : discussion des résultats obtenus en 1969, 1970 et 1971. *Connaissance Vigne Vin*, **6**, n°2, 161-175.
- SANDERS J.A., CONN E.E., LIN C.R. et STOCKING C.R., 1977. Subcellular localization of the cyanogenic glycoside of sorghum by autoradiography. *Plant. Physiol.*, **59**, 647-652.
- SINGLETON V.L. et ESAU P., 1969. Phenolic substances in Grapes and Wine, and their significance. *Advances in Food research*, supplement I, Academic Press ed., New York et Londres, 282 p.
- TABATA M., UKAMI M., HIRAOKA N. et KONOSHIMA M., 1974. Pigment formation in callus cultures of *Lithosperu erythrorhizon*. *Phytochem.*, **13**, 927-932.
- TAKEDA J., 1988. Light-induced synthesis of anthocyanin in Carrot cells in suspension. I - The factors affecting anthocyanin production. *J. Experimental Botany*, **39**, n°205, 1065-1077
- TAKEDA J., 1990. Light-induced synthesis of anthocyanin in carrot cells in suspension. II - Effects of light and 2-4D on induction and reduction of enzyme activities related to anthocyanin synthesis. *J. Experimental Botany*, **41**, n°227, 749-755
- WELLMANN E., 1983. *In : Encyclopedia of plant physiology*, new series, vol. 16B, Shropshire W.J. et Mohr H. ed., Springer-Verlag, New York, 745-756.
- ZENK M.H., EL SHAGI H., STOCKIGT J., WELLER W. et DEUS B., 1978. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *In : Plant tissue culture and its biotechnology application*, Bazz W., Reinhard E. et Zenk M.H. ed., Springer-Verlag, Berlin et Heidelberg, 27-43.
- ZENK M.H., 1985. Benzyl isoquinoleinalkaloid formation. *In : The chemistry and biology of isoquinolein alkaloids*, Philpson *et al.*, ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg et New York, 240-256.

Reçu le 26 octobre 1998 ;
 accepté pour publication le 8 décembre 1998.
