Connaissance de la Vigne et du Vin,
Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1989, **23,** N° 1, 1-6.

MISE EN ÉVIDENCE DE POLYAMINES (PUTRESCINE, CADAVERINE, NOR-SPERMIDINE, SPERMIDINE ET SPERMINE) DANS LES FEUILLES ET LES GRAPPES DE *Vitis vinifera* L.

M. BROQUEDIS*, B. DUMERY** et J. BOUARD*

* Laboratoire de Physiologie végétale et des Sciences de la Vigne,
Université de Bordeaux I, avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex (France).
** Institut expérimental du Tabac de la Seita, Domaine de La Tour, 24100 Bergerac (France)

Résumé : *Cinq polyamines libres, la putrescine, la cadavérine, la nor-spermidine, la spermidine et la spermine, ont été mises en évidence dans les feuilles et les grappes du Cabernet-Sauvignon et de l'Ugni blanc. La spermidine est toujours la polyamine la plus abondante. La cadavérine est faiblement représentée ou absente selon le cépage ou l'organe considéré.*

Bien que les publications sur les polyamines soient de plus en plus nombreuses, ce qui s'explique par l'importance que l'on accorde maintenant à ce nouveau groupe de régulateurs de croissance, aucune jusqu'à présent ne se rapporte à la Vigne. Or, les polyamines paraissent impliquées dans de nombreux phénomènes et notamment dans certains aspects du développement des fruits. Il était donc intéressant de rechercher leur présence chez la Vigne, notamment dans les baies, afin d'étudier, le cas échéant, leur rôle dans le développement des grappes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I — MATÉRIEL VÉGÉTAL

Les polyamines libres ont été recherchées dans les feuilles et les grappes de deux variétés de *Vitis vinifera* L., le Cabernèt-Sauvignon et l'Ugni blanc. Seules les grappes de rang 2 provenant de rameaux principaux et les limbes des feuilles situées en face de ces grappes ont été retenus pour cette étude. Les prélèvements ont été effectués le 29-7-87. La croissance des feuilles était terminée et les baies n'avaient pas encore atteint le stade véraison.

Le matériel prélevé a été immédiatement congelé. Les baies ont ensuite été séparées des rafles et les pépins des péricarpes. Tous ces échantillons ont alors été lyophilisés puis réduits en poudre et analysés.

II — MÉTHODES D'ANALYSE

La technique utilisée est celle qui a été mise au point à l'Institut expérimental du Tabac de Bergerac à partir des méthodes de FLORES et GALSTON (1982) et de MASSE et *al.*, (1985).

a) Extraction des polyamines

L'extraction est réalisée par l'acide perchlorique ($HClO_4$). On mélange 500 mg de la poudre obtenue à 10 ml d'une solution aqueuse de $HClO_4$ à 5 p. cent. Après macération pendant 15 heures, à 4° C, et sous agitation intermittente, la solution recueillie est centrifugée pendant 10 minutes à 8000 t min^{-1} puis filtrée. Le filtrat est récupéré.

b) *Benzoylation*

Pour pouvoir doser les polyamines par chromatographie liquide à haute performance (CLHP), il est nécessaire de benzoyler le filtrat. Cette benzoylation est réalisée à l'aide du chlorure de benzoyle

A 2 ml du filtrat obtenu on ajoute 6 ml d'une solution de soude (NaOH, 2N) et 20 μl de chlorure de benzoyle pur mesurés très exactement à l'aide d'une microseringue. La benzoylation se poursuit pendant 20 minutes et au cours de ce laps de temps la solution subit, à intervalles réguliers, 3 agitations de 20 secondes. On ajoute ensuite 2 ml d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium, puis 6 ml d'éther éthylique froid. La solution est alors agitée fortement et après quelques minutes de repos il se forme deux phases bien distinctes, une phase inférieure aqueuse et une phase supérieure éthérée contenant les polyamines benzoylées. Après avoir prélevé exactement 3 ml de cette phase éthérée, on évapore l'éther sous un courant d'azote, de façon à obtenir un extrait sec. Cet extrait est ensuite repris par 300 μl de solvant de chromatographie.

c) *Dosage des polyamines par CLHP*

Les conditions chromatographiques suivantes ont été adoptées :

— Colonne :
  - dimensions : 250 × 4 mm
  - phase stationnaire : micro Bondapack C18
  - diamètre des particules : 10 μm

— Phase mobile :
  - eau-acétonitrile (60 / 40 ml)
  - acide trifluoroacétique (0,1 ml)
  - débit : 1 ml min^{-1}

— Température : 20° C

— Détection : UV à 254 nm

— Volume injecté : 20 μl

Pour déterminer les quantités des différentes polyamines benzoylées séparées par chromatographie on utilise un étalon interne, le diaminoheptane, que l'on incorpore en quantité connue dans la solution d'extraction ($HClO_4$) avant de procéder à la benzoylation.

Le calcul précis de ces quantités nécessite la détermination des facteurs de réponse des polyamines benzoylées par rapport à l'étalon interne. Ces facteurs de réponse dépendent des polyamines et des conditions chromatographiques utilisées.

RÉSULTATS

Les résultats obtenus (figure 1), mettent en évidence l'existence de 5 polyamines libres dans les organes étudiés : la putrescine (PUT), la cadavérine (CAD), la nor-spermidine (NOR-SPD), la spermidine (SPD) et la spermine (SPM).

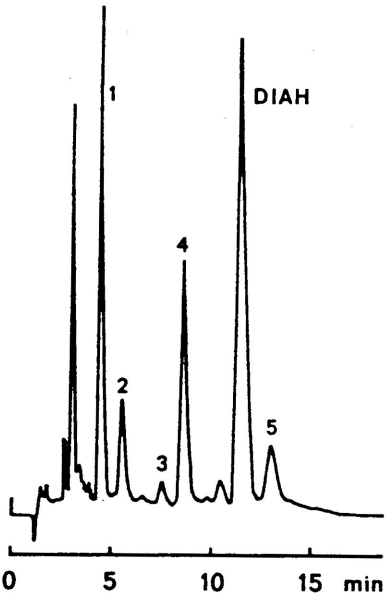

Fig. 1. — Chromatogramme, obtenu par CLHP, d'un extrait de péricarpes de baies de raisin. 5 polyamines sont présentes dans ces organes : 1, la putrescine; 2, la cadavérine; 3, la nor-spermidine; 4, la spermidine; 5, la spermine. Le DIAH (diaminoheptane) est l'étalon interne.

Les tableaux I et II donnent les valeurs obtenues pour chaque organe, en nMoles par gramme de matière sèche.

a) *Les polyamines des feuilles*

Les 5 polyamines existent dans les feuilles du Cabernet-Sauvignon, mais il n'y en a que trois dans celles de l'Ugni blanc, la cadavérine et la nor-spermidine étant absentes. Malgré cela la teneur en polyamines totales est la même dans les feuilles des deux cépages et la spermidine y est de beaucoup la plus abondante.

b) *Les polyamines des rafles*

La cadavérine est présente en très faible quantité chez le Cabernet-Sauvignon et n'existe pas chez l'Ugni blanc. Chez les deux cépages la spermidine est la polyamine la plus abondante et les teneurs sont identiques. Il en est de même pour la quantité totale de polyamines.

c) *Les polyamines des pépins*

La spermidine est encore la polyamine la plus abondante. La putrescine et la spermine sont bien représentées. Il n'y a pas de cadavérine chez l'Ugni blanc.

d) *Les polyamines des péricarpes*

La spermidine est toujours la plus abondante. La cadavérine, présente chez l'Ugni blanc est absente chez le Cabernet-Sauvignon. Chez les deux cépages, la teneur en putrescine atteint la moitié de celle de la spermidine.

e) *Les polyamines des pellicules et des pulpes*

Les polyamines étant présentes dans les péricarpes, il était intéressant de préciser si elles se trouvaient dans la totalité du péricarpe ou bien si elles étaient localisées seulement dans la pellicule ou dans la pulpe.

TABLEAU I

Les polyamines dans les feuilles et les grappes d'Ugni blanc.

Les résultats sont exprimés en nMoles g^{-1} MS

POLYAMINES	FEUILLES	GRAPPES		
	Limbes	Rafles	Péricarpes	Pépins
Putrescine	104	95	159	177
Cadavérine	—	—	41	—
Nor-Spermidine	—	42	63	16
Spermidine	518	320	350	501
Spermine	52	94	16	105
TOTAL	674	551	629	799

TABLEAU II

Les polyamines dans les feuilles et les grappes de Cabernet-Sauvignon.

Les résultats sont exprimés en nMoles g^{-1} MS

POLYAMINES	FEUILLES	GRAPPES		
	Limbes	Rafles	Péricarpes	Pépins
Putrescine	55	88	210	132
Cadavérine	17	16	—	49
Nor-Spermidine	37	35	22	45
Spermidine	456	323	428	410
Spermine	93	70	36	102
TOTAL	658	532	696	738

Des analyses ont donc été faites sur d'autres échantillons prélevés début septembre. Elles montrent, qu'à cette époque, les cinq polyamines sont présentes dans les pellicules (figure 2), alors que dans les pulpes la nor-spermidine n'existe pas.

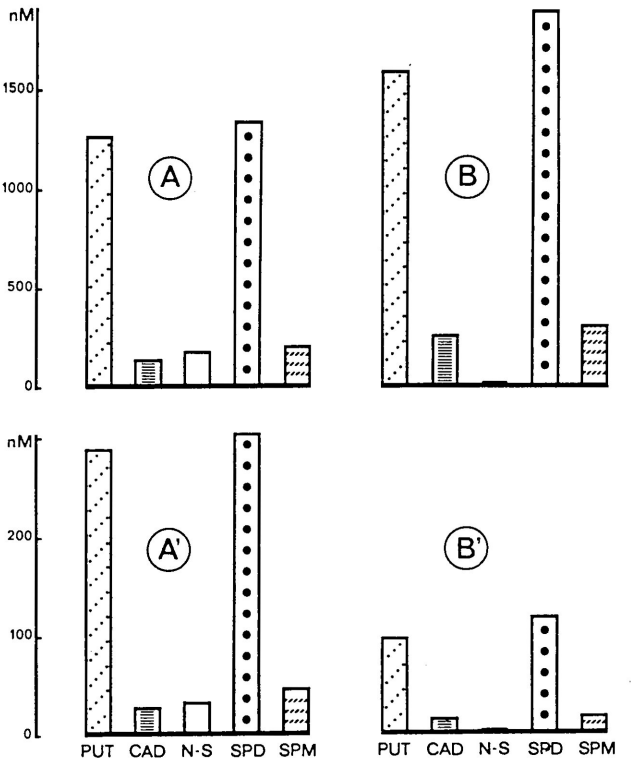

Fig. 2. — Les polyamines des pellicules et des pulpes du Cabernet-Sauvignon. Les résultats sont exprimés en nMoles g^{-1} MS (A : pellicules, B : pulpes) et pour 100 pellicules (A') et 100 pulpes (B'). N-S = nor-spermidine.

Lorsqu'on exprime les résultats par rapport à la matière sèche (figure 2, A et B), on constate que les valeurs trouvées sont toujours plus élevées pour les pellicules que pour les pulpes, quelle que soit la polyamine considérée. Globalement les pellicules semblent accumuler 3 fois plus de polyamines que les pulpes ou même davantage. Les quantités de spermidine et de putrescine demeurent toujours les plus importantes et assez voisines.

Si les résultats sont exprimés en nMoles pour 100 pellicules et 100 pulpes (figure 2, A' et B'), il apparaît nettement que, dans une baie, c'est la pulpe qui contient la plus grande partie de chacune des polyamines, la quantité totale atteignant 23 % de plus.

CONCLUSION

Ce premier travail sur les polyamines de la Vigne montre que cette plante renferme, elle aussi, les polyamines libres classiques et que la spermidine, à l'époque con-

sidérée, est la plus abondante, aussi bien dans les feuilles que dans les rafles et les baies. Il est par ailleurs curieux de constater ici que la cadavérine, toujours peu abondante lorsqu'elle existe, est présente seulement dans les péricarpes de l'un des deux cépages, l'Ugni blanc et seulement dans les limbes, rafles et pépins de l'autre cépage. Un tel résultat demande, bien sûr, a être confirmé mais laisse néanmoins penser que tous les cépages pourraient ne pas se comporter de la même façon. Il paraît évident, en outre, étant donné les rôles attribués aux polyamines, que des différences de teneur doivent se manifester au cours du développement des différents organes.

Remerciements

Nous remercions très vivement Monsieur FELTRIN et Madame SAUVAGE pour leur assistance technique.

Manuscrit reçu le 11 octobre 1988 ; accepté pour publication le 3 novembre 1988.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

FLORES H.E. et GALSTON A.W., 1982. Analysis of polyamines in higher plants by high performance liquid chromatography. *Plant Physiol.*, **69,** 701-706.

MASSE J., LABERCHE J.Cl. et JEANTY G., 1985. Influence de polyamines exogènes sur la croissance de plantules de Maïs (*Zea mays* L.). *C.R. Acad. Sc.,* Paris, Série III, N° 1, 27-32.