

TURNOVER DES FLAVONOLS DANS LES TUNIQUES D'*ALLIUM CEPA* EN SURVIE

MICHEL TISSUT

Laboratoire de Physiologie Végétale, Université Scientifique et Médicale de Grenoble, France

(Reçu le 21 mars 1973. Accepté le 16 avril 1973)

Key Word Index—*Allium cepa*; Liliaceae; scales; ageing; flavonols; turnover.

Abstract—During ageing of isolated onion scales there is an accumulation of flavonols which increase continuously. This is not light-dependent but is associated with a high level of respiratory gaseous exchanges. Phenylalanine-[U-¹⁴C] is actively incorporated in these flavonols but experiments of pulse labelling show that they have either a very slow or no turnover. This suggests that enzymes able to destroy flavonols are lacking in this material.

Résumé—Dans des fragments de tunique d'oignon isolées et maintenues en suivie (ageing), a lieu dans l'épiderme externe une accumulation importante de flavonols, constamment croissante, liée à des échanges respiratoires très intenses et indifférente à la lumière. La phénylalanine-[U-¹⁴C] s'incorpore activement dans les flavonols ainsi formés. Des expériences de marquage de courte durée montrent que ces substances ont ici un turn over très lent voire nul, ce qui tend montrer l'absence, dans ce matériel, d'enzymes capables d'en assurer la destruction.

INTRODUCTION

DE TRÈS nombreuses recherches sont actuellement poursuivies, qui concernent la nature, la biosynthèse, la dégradation, la régulation de métabolisme, des polyphénols végétaux. L'ensemble de ces travaux a fait apparaître maintenant d'une manière évidente que les polyphénols des végétaux supérieurs, de structures clairement apparentées et produits, pour la plupart, grâce à des filières de biosynthèse très semblables (voie des pentoses-phosphates, de l'acide shikimique, menant aux acides aminés cycliques puis aux dérivés de l'acide cinnamique) sont cependant extrêmement différents par leur localisation cytologique et anatomique,¹⁻¹⁰ par les régulations de leur biosynthèse¹¹⁻¹⁵ et par ce que l'on suppose pouvoir être leur rôle dans des processus aussi divers que la régulation de la croissance, la défense contre les microorganismes parasites, la photosynthèse, la rigidité ou l'arrêt de certaines radiations.

¹ TRONCHET, J. (1968) *Compt. Rend.* **266**, 882.

² TISSUT, M. (1969) *Compt. Rend.* **268**, 65.

³ DELAVEAU, P. (1968) *Compt. Rend.* **267**, 726.

⁴ MENTZER, C., PACHECO, H. et VILLE, A. (1954) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **36**, 1137.

⁵ MAHESH, V. B. et SESHADRI, T. R. (1954) *J. Sci. Ind. Res.* **13B**, 835.

⁶ EGGER, K. et TISSUT, W. (1968) *Compt. Rend.* **267**, 1329.

⁷ GUILLIERMOND, A. et GAUTHERET, R. (1933) *Compt. Rend.* **196**, 369.

⁸ TISSUT, M. (1970) Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences de Grenoble, France.

⁹ MONTIES, B. (1969) *Bull. Soc. Fr. Physiol. Végét.* **15(1)**, 29.

¹⁰ CHARRIERE, Y. (1970) Thèse de troisième cycle, Faculté des Sciences de Grenoble, France.

¹¹ HILLIS, W. E. et ISHIKURA, N. (1970) *Phytochemistry* **9**, 1517.

¹² ENGELSMA, G. (1970) *Planta* **91**, 246.

¹³ PLA, J., VILLE, A. et PACHECO, H. (1967) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **49(4)**, 395.

¹⁴ ZUCKER, M. (1972) *Ann. Rev. Plant Physiol.* **23**, 133.

¹⁵ AHMED, S. I. et SWAIN, T. (1970) *Phytochemistry* **9**, 2287.

Les fragments tissulaires d'organes de réserve en survie semblent constituer actuellement l'un des matériels d'étude les moins complexes. C'est en particulier le cas du parenchyme de pomme de terre en survie (un seul tissu, du moins pendant un certain temps),¹⁶ qui produit un nombre restreint de polyphénols, surtout de l'acide chlorogénique.^{17,18}

Notre étude a porté sur des fragments de bulbe d'oignon dont on sait depuis longtemps¹⁹ que les tuniques sèches, périphériques, sont riches en quercétol. Nous avons montré que la mise en survie de fragments de tuniques s'accompagne d'une synthèse très active et continue de flavonols qui a pour siège l'épiderme externe des tuniques; cette synthèse a lieu même à l'obscurité; elle est corollaire du niveau respiratoire élevé qui caractérise la mise en survie. Cette synthèse concorde avec l'apparition d'une activité PAL (E.C. 4.3.1.5) qui est particulièrement forte dans l'épiderme externe mais se manifeste également dans le parenchyme.²⁰ L'ensemble flavonique synthétisé est relativement complexe: il comprend le glucosyl 4'-quercétol,²¹ les 3,4' diglucoside et 7,4' diglucoside de quercétol²² et quatre autres glycosides présents en faible quantité et passant inaperçus dans les tuniques en place des bulbes au repos. Nous avons fait une étude chromatographique et spectrophotométrique sommaire de ces corps qui sont le glucosyl 3-kaempférol, le glucosyl 3-quercétol et, vraisemblablement, le glucosyl 4'-kaempférol et le glucosyl 4'-isorhamnétol.

L'étude présente comporte deux éléments: (a) la mise en évidence d'une incorporation de la phénylalanine dans les flavonols, nécessaire à l'étude des corrélations entre PAL et accumulation flavonique, (b) une approche des problèmes de durée de vie des flavonols, dans l'épiderme externe des tuniques en survie et de leur éventuel turn over, nous amenant à considérer de manière plus fondée les rapports entre biosynthèse et accumulation de ces substances dans ce matériel.

RESULTATS

Caractères généraux de l'incorporation

Plusieurs expériences ont été réalisées, au cours desquelles des fragments de tuniques internes de bulbe d'oignon ont été maintenues en survie pendant douze jours. Parallèlement aux mesures portant sur l'activité des flavonols purifiés en sont effectuées d'autres concernant l'activité globale des extraits hydroacétoniques (qui contiennent des acides aminés et, en particulier, une part importante de la phénylalanine incorporée, des sucres, les polyphénols peu ou pas polymérisés, etc.). Il leur correspond une mesure dite de 'radioactivité soluble'. L'activité globale des poudres résiduelles, contenant surtout les protéines, l'amidon et les parois cellulaires représente alors la 'radioactivité insoluble'.

En moyenne, l'ordre de grandeur de la quantité de radioactivité incorporée dans les poudres est égal à la radioactivité soluble. La nature des composés porteurs de la radioactivité soluble change au cours de l'expérience: essentiellement portée par la phénylalanine exogène, au début, celle-ci s'épuise plus ou moins rapidement suivant la quantité fournie et se retrouve alors dans les dérivés solubles (polyphénoliques), la phénylalanine subissant

¹⁶ STEWARD, F. C., WRIGHT, R. et BERRY, W. E. (1932) *Protoplasma* **16**, 576.

¹⁷ LEVY, C. C. et ZUCKER, M. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 2418.

¹⁸ ZUCKER, M. (1965) *Plant Physiol.* **40**, 779.

¹⁹ PERKIN, A. G. et HUMMEL, J. J. (1896), cité par KARRER, W. (1958) dans *Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe*, Birkhäuser, Basel.

²⁰ TISSUT, M. (1972) *Physiol. Vég.* **10**(2), 381.

²¹ HERRMANN, K. (1958) *Arch. Pharm. (Berlin)* **291**, 238.

²² HARBORNE, J. B. (1965) *Phytochemistry* **4**, 107.

ainsi des transformations irréversibles, ou insolubles, parmi lesquels les protéines peuvent peut-être restituer une partie de phénylalanine au cours du temps, du fait de leur turn over.

Répartition de la radioactivité soluble dans l'épaisseur des tuniques

L'accumulation flavonique est ici limitée essentiellement à l'épiderme externe, lequel, au contraire de l'épiderme interne, est malheureusement inséparable du parenchyme. Pour évaluer l'ordre de grandeur du rapport radioactivité flavonique/radioactivité soluble totale dans ce tissu, il est nécessaire de connaître la géométrie de la répartition de la radioactivité soluble dans l'ensemble de la tunique.

Pour cela, on réalise trois fractions constituées respectivement: (a) d'épiderme externe et de parenchyme; (b) de parenchyme pur; et (c) d'épiderme interne (facilement décollé). Les deux premières fractions sont obtenues en sectionnant des fragments de tunique suivant un plan tangentiel proche de l'épiderme externe. Pour l'ensemble des essais effectués huit jours après marquage par la phénylalanine-[U-¹⁴C], la radioactivité se répartit en proportions tout à fait comparables à celles indiquées au Tableau 1.

TABLEAU 1. REPARTITION DE LA RADIOACTIVITE SOLUBLE DANS L'ÉPAISSEUR DE LA TUNIQUE D'OIGNON HUIT JOURS APRES MARQUAGE DE 10 mn PAR LA PHENYLALANINE-[U-¹⁴C]

Fraction	Masse fraîche (g)	Activité par g. (dpm)	Teneur flavonique (DO-ml/g)	R.A flavonols
				R.A soluble (%)
Externe	1,62	10 617	450	64
Moyenne	2,71	10 370	29	4
Interne	0,16	5016	100	30

La radioactivité soluble est donc à peu près uniformément répartie dans l'ensemble des fractions externe et moyenne. Ce résultat amène deux conclusions. Premièrement, il n'y a donc pas d'accumulation préférentielle importante des dérivés solubles de la phénylalanine dans l'épiderme externe. Sachant que les flavonols sont localisés dans ce tissu, ce fait renforce l'idée d'une synthèse d'autres dérivés polyphénoliques au niveau du parenchyme, qui possède d'ailleurs sa propre activité PAL.²⁰ En second lieu, le rapport des radioactivités solubles de l'épiderme externe et du parenchyme est sensiblement égal au rapport de ces deux tissus. L'épaisseur du parenchyme est extrêmement variable d'un point à l'autre d'une même tunique et d'une tunique à l'autre (variations de 1 à 20). Pour les estimations ultérieures nous utiliserons la valeur très approximative de 1/5 pour le rapport moyen épiderme externe/parenchyme.

Etudes de la cinétique d'incorporation de la phénylalanine [U-¹⁴C]

Les différentes expériences réalisées confirment toutes que, au cours de la survie, l'accumulation flavonique augmente régulièrement et qu'elle correspond à une activité PAL constamment maintenue à un niveau élevée (Fig. 1). Nous avons étudié la fourniture de la phénylalanine marquée suivant deux modalités: (a) en abondance suffisante pour obtenir pendant une période de plusieurs jours une incorporation maximale, et (b) à la suite des résultats obtenus, on détermine la quantité et le temps d'incorporation les plus favorables à des conditions de 'pulse labelling'.

Marquage long. En début de survie, on réalise deux trempages de 20 mn séparés par un intervalle de 24 hr. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 2.

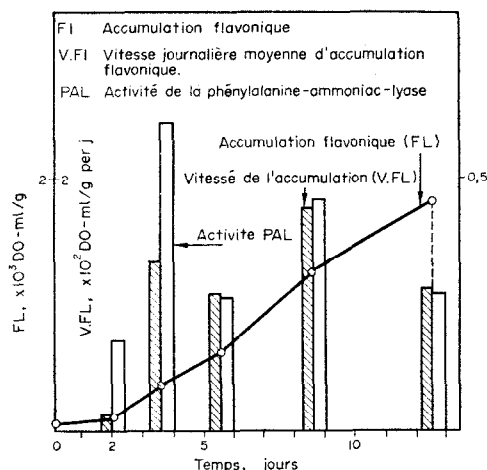


FIG. 1. EVOLUTION, AU COURS DU TEMPS, DE L'ACCUMULATION FLAVONIQUE ET DE L'ACTIVITE PAL DANS LA TUNIQUE DE BULBE D'OIGNON EN SURVIE.

Le Tableau 2 montre l'existence d'une incorporation continue dans les flavonols pendant la durée de l'expérience. Cependant, l'intensité d'incorporation apparente (la variation de la quantité de flavonols accumulés, qui représente le dénominateur de ce rapport est le bilan de la synthèse et d'un éventuel catabolisme) est beaucoup plus forte au début. Ce fait est à rapprocher de l'existence d'une activité PAL également plus forte à ce moment et aussi d'une vraisemblable baisse de la teneur en phénylalanine marquée disponible, au cours du temps.

TABLEAU 2. CINETIQUE D'INCORPORATION DE LA PHENYLALANINE DANS LES FLAVONOLS APRES MARQUAGE DE 2×20 mn

Lot	Temps (jours)	R.A spec. (dpm/DO-ml)	Flav. (DO-ml)	R.A. Flav. (dpm)	R.A sol. $\times 1/5$ (dpm)	R.A Flav.	
						R.A sol. $\times 1/5$ (%)	I. incor.
1	3	60	293	18 000	316 000	5,6	90
2	5	47	510	25 000	470 000	5,3	32
3	9	40	1163	46 500	750 000	6,2	32

Temps—Temps en jours après le deuxième marquage. R.A spec.—Radioactivité spécifique des flavonols. Flav.—Teneur en flavonols de la quantité de matériel végétal fournissant 1 g de poudre acétonique. R.A Flav.—Radioactivité incorporée dans la même quantité de flavonols. R.A. sol $\times 1/5$ —Estimation de la radioactivité de l'extract hydroacétonique de la quantité d'épiderme supérieur correspondant à un gramme de poudre acétonique de tunique. R.A Flav./R.A sol. $\times 1/5$ —Rapport entre la radioactivité incorporée dans les flavonols et la radioactivité soluble totale épidermique estimée pour une même quantité de matériel végétal. I. incor.—Intensité d'incorporation apparente de la radioactivité dans les flavonols nouvellement synthétisés depuis le prélèvement précédent, en dpm/DO-ml.

Un autre point remarquable réside dans l'augmentation de la radioactivité soluble au cours du temps. Il tend à montrer l'existence d'échanges entre les fractions insoluble et soluble.

Pulse labelling. 48 hr après le début de survie (la période de synthèse protéique très active

se termine alors) on réalise un trempage de 10 mn dans la solution de phénylalanine [$U-^{14}C$]. Au cours du temps, la radioactivité soluble épidermique approximative, constituée au temps 0 par la phénylalanine seule, décroît de moitié en 3 jours puis se stabilise assez nettement (Fig. 3). Elle représente alors environ 1/20 de la radioactivité soluble de l'expérience précédente. L'activité spécifique des flavonols purifiés est maximale au bout de 3 jours et décroît ensuite jusqu'à 50% de cette valeur au bout de 10 jours (Fig. 2). La radioactivité flavonique totale est pratiquement stable dès le troisième jour. Au contraire de l'expérience précédente, l'intensité d'incorporation apparente est donc pratiquement nulle dès ce moment.

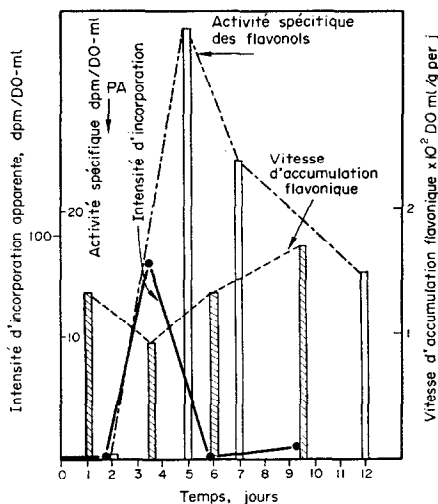


FIG. 2. INCORPORATION DE PHENYLALANINE-[$U-^{14}C$] DANS LES FLAVONOLS PAR UN MARQUAGE DE 10 mn.

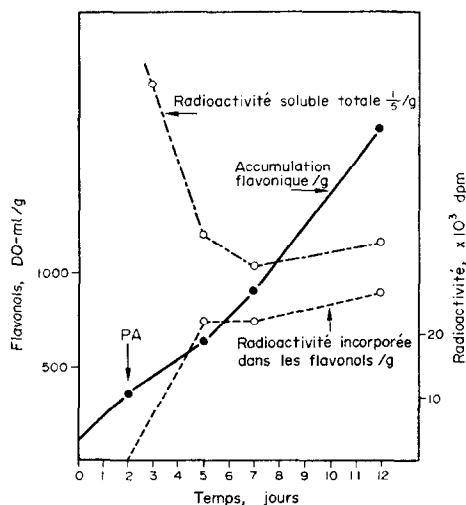


FIG. 3. VITESSE D'ACCUMULATION FLAVONIQUE ET D'INCORPORATION DU ^{14}C APRES MARQUAGE DE 10 mn.

A partir du cinquième jour, la radioactivité flavonique représente 70% de la radioactivité soluble estimée pour l'épiderme externe et dépasse même 100% dans les expériences de contrôle (cette valeur excessive pouvant être due à la très faible précision des estimations du rapport des épaisseurs épiderme/parenchyme). On peut donc affirmer que, dès ce moment, la radioactivité soluble de l'épiderme externe est pratiquement totalement portée par les flavonols (alors que ceux-ci ne représentent que 5-6% de la radioactivité soluble dans le marquage long).

CONCLUSION ET DISCUSSION

La phénylalanine marquée s'incorpore activement dans les flavonols, chez l'oignon. Ces substances y sont donc formées grâce à une activité PAL importante et suivant un schéma biosynthétique conforme à nos connaissances actuelles, contrairement à ce qui semble se passer dans quelques cas.^{11,13}

La comparaison des marquages de longue et courte durée nous montre que, dans le second cas, les conditions d'un pulse labelling sont rassemblées, dans le compartiment épidermique. Dès le deuxième prélèvement, on peut affirmer que toute la phénylalanine fournie a été incorporée. L'essentiel en a été engagé dans des molécules flavoniques.

Pour utiliser les résultats obtenus pour des mesures de turn over, deux remarques doivent

être notées. En premier lieu, des quantités faibles de phénylalanine incorporées dans les protéines sont vraisemblablement réémises progressivement du fait du turn over de ces substances. Cette réémission pourrait être à l'origine de la valeur non nulle de l'intensité d'incorporation dans les flavonols, au cours de la dernière étape de l'expérience. Dans une expérimentation ultérieure, consacrée à la mesure de turn over de la PAL, il sera donc bon de mesurer soigneusement le turn over de l'ensemble protéique et de réaliser un marquage par l'acide cinnamique. Notons cependant que le remplacement de la phénylalanine par l'acide *trans* cinnamique pour le marquage de l'acide chlorogénique des feuilles de *Xanthium* n'entraîne pas de modification très importante des courbes d'activité spécifique de l'acide chlorogénique en fonction du temps.²³ Secondement, on ne possède pas de connaissance claire du fonctionnement du compartiment constitué par le parenchyme de l'oignon; cependant, il est net que la phénylalanine s'y incorpore dans des dérivés phénoliques (existence d'une importante activité PAL et de polyphénols dans le parenchyme) suivant une chronologie semblable à celle de l'épiderme.²⁰ Tout se passe donc vraisemblablement comme si, pour les métabolismes qui nous occupent, les deux ensembles épidermique et parenchymateux devenaient rapidement des compartiments distincts, fonctionnant plus ou moins synchroniquement. Ces observations étant formulés, les résultats expérimentaux obtenus tendent à montrer que le turn over des flavonols est très faible, voire nul dans ce matériel, pendant la durée d'expérience au cours de laquelle les flavonols synthétisés seraient donc intégralement accumulés. Il faut d'ailleurs noter que les niveaux d'activité PAL et d'accumulation des flavonols sont du même ordre de grandeur et ne permettent pas d'envisager l'existence d'un turn over rapide. Ce résultat montre l'originalité du métabolisme de l'oignon en survie et confirme la diversité des destins des polyphénols dans le matériel végétal: En effet, Taylor et Zucker mettent en évidence un turn over très actif pour l'acide chlorogénique dans le parenchyme de pomme de terre en survie et la feuille de *Xanthium*²³ et Barz *et al.*²⁴ montrent l'installation d'un catabolisme important du kaempférol à l'obscurité, dans la plantule de pois-chiche. A une échelle de temps plus longue, au cours de la vie de la feuille de différentes espèces, l'accumulation flavonique globale peut subir de fortes baisses qui font également apparaître l'existence d'un catabolisme, surtout en fin de croissance.⁸

Dans l'épiderme externe d'oignon en survie, les caractères particuliers de l'accumulation flavonique sont les suivants: forte activité PAL longtemps maintenue, croissance continue de l'accumulation flavonique associée à un turn over lent ou nul. Ce dernier fait et le maintien de quantités importantes de quercétol dans les tuniques sèches tendent à montrer l'absence de systèmes enzymatiques aptes à détruire les flavonols chez l'oignon.

Tous ces éléments définissent bien un métabolisme d'accumulation typique dont il sera intéressant de voir dans quelle mesure il peut exister également au cours de la vie normale de l'oignon et quelles sont ses relations avec l'accumulation de quercétol libre dans les tuniques sèches.

Il faut d'ailleurs noter que, chez l'oignon, ce que nous avons appelé la mise en survie n'est pas aussi nettement distinct de la vie normale que dans les cas typiques: la survie typique est obtenue en maintenant dans une atmosphère aérée, humide et aseptique, des tranches fines de parenchyme d'organes de réserve (ex. pomme de terre) qui deviennent alors le siège d'échanges respiratoires très intenses correspondant à un métabolisme respiratoire

²³ TAYLOR, A. O. et ZUCKER, M. (1966) *Plant Physiol.* **41**, 1350.

²⁴ BARZ, W., HOSEL, W. et ADAMEK, C. (1971) *Phytochemistry* **10**, 343.

particulier, à une réorganisation importante de l'ultrastructure du parenchyme²⁵ et au développement de diverses activités enzymatiques (ex. phénol-oxydases²⁶ qui pourraient être les effecteurs du catabolisme de l'acide chlorogénique chez la pomme de terre). Chez l'oignon, nous plaçons dans les conditions de survie, un matériel constitué d'un parenchyme de réserve et d'épidermes, où la coupure est ici très peu importante et ne perturbe pratiquement pas l'organisation normale de la tunique. L'augmentation des échanges respiratoires et la stimulation métabolique sont cependant manifestes. Une étude comparée des métabolismes de survie chez l'oignon et dans des parenchyme d'organes de réserve au comportement typique serait donc certainement intéressante.

PARTIE EXPERIMENTALE

Cultures. Des oignons de la variété 'Jaune paille des Vertus', de diamètre allant de 7 à 10 cm sont désinfectés superficiellement. Les deux premières tuniques sont écartées et les tuniques suivantes sont coupées en deux et disposées sur du papier filtre dans lequel de l'eau stérile circule par capillarité, les surfaces de section reposant sur le papier.²⁰ Ce dispositif est installé à la température du laboratoire, dans une enceinte désinfectée. Chaque expérience est répétée 2 ou 3 fois.

Marquages. On utilise la L-phénylalanine-[U-¹⁴C] d'activité spécifique égale à 270 mCi/mM, fournie par le CEA. On trempe les demi-tuniques dans une solution dont l'activité est de 0,1 mCi pour 200 ml. Après trempage, le matériel végétal est égoutté et repose 15 mn à l'air avant d'être rincé abondamment à l'eau stérile. Les tuniques, essuyées, sont alors mises en culture.

Extractions, purifications. Le matériel végétal prélevé est broyé $\times 3$ au mixer dans l'acétone. Les solutions sont réunies, lavées par l'éther de pétrole (P.E. : 60–80°) concentrées et ramenées à un vol. défini. Une aliquote sert au dosage flavonique total. Une autre aliquote, plus importante (200–1000 DO-ml de flavonols) est acidifiée par HCl 2 N et portée à 100° pendant 30 mn. Les aglycones flavoniques sont extraits $\times 3$ avec 50 ml d'Et₂O. La solution étherique est rincée abondamment $\times 10$ par H₂O puis concentrée sous vide, déposée sur papier Whatman No. 1 et chromatographiée dans l'acide acétique à 30 %; on découpe la bande qui contient le quercétol et on l'élue par le MeOH. On néglige les faibles quantités de kaempférol et d'isorhamnétol. L'éluat reconcentré est déposé sur CM de polyamide 20 \times 40 cm. La plaque est développée par trois solvants successifs: (1) H₂O-EtOH-MeEtCO-(MeCO)₂CH₂, 11:4:4:1; (2) C₆H₆; (3) C₆H₆-MeEtCO-MeOH, 2:1:1. La bande contenant le quercétol est élue par MeOH. On dose le quercétol dans la solution obtenue et on la soumet à une mesure de radioactivité par scintillation avec le mélange scintillant PPO, POPOP dan le toluène. La quantité de flavonols par flacon ne doit pas dépasser 1 μ M (quenching). Les essais-témoins (mélanges de quercétine non marquée et de phénylalanine-[U-¹⁴C]) montrent que des traces de radioactivité, au maximum de l'ordre de 1/10⁵ de la radioactivité initiale peuvent persister au niveau de la quercétine. Le rinçage de la solution étherique par H₂O est une étape capitale de la purification. Les deux systèmes chromatographiques ont le double rôle d'achever l'élimination de la phénylalanine (*R_f* très fort sur papier et dans le solvant 1 sur polyamide) et d'assurer la séparation entre la quercétine et les autres composants du mélange d'origine végétale. Compte-tenu du niveau de l'incorporation dans les flavonols, les traces de radioactivité 'parasite' sont négligeables.

Dosage des flavonols. Les flavonols sont dosés par spectrophotométrie différentielle en présence de AlCl₃. La mesure de teneur flavonique est directement exprimée en DO-ml par g de poudre acétonique: cette mesure représente la DO de la solution où les flavonols contenus dans la masse de végétal correspondant à 1 g de poudre acétonique sont dissous dans 1 ml de solvant. 1 μ M de quercétol correspond à 22,7 DO-ml.

Fusion alcaline. Les aglycones obtenus par hydrolyse acide sont dissous dans KOH à 15 % dans l'H₂O et maintenus 2 hr à l'ébullition sous reflux. La solution refroidie et acidifiée est extraite par Et₂O. La solution étherique est concentrée, déposée sur gel de silice et chromatographiée dans le solvant C₆H₆-Dioxanne-HOAc, 90:25:4.

Remerciements—C'est grâce à M. le Professeur Carlier et à M. Fer que les mesures de radioactivité par scintillation ont été réalisées. Je les remercie pour leur amabilité et leurs conseils.

²⁵ BEN ABDEKADER, A. (1972) Thèse de Doctoret, Université Paris VI, France.

²⁶ BABA, S. (1958) *Mem. Coll. Sci. Univ. Kyoto* **35B**, 63.