

## SUR LES CAROTENOÏDES DU TISSU CAMBIAL DE RACINE DE CAROTTE CULTIVE *IN VITRO*

J. NAEF et G. TURIAN

Institut de Botanique générale, Université de Genève, Genève, Suisse

(*Reçu le 28 Septembre 1962*)

**Résumé**—Une souche normale, verte, de tissu cambial de carotte, cultivée *in vitro* et une souche mutante, orange, ont été soumises à l'analyse comparée qualitative et quantitative de leurs caroténoïdes. Nous avons confirmé qu'en plus des chlorophylles  $\alpha$  et  $\beta$ , la souche verte contient de petites quantités d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -carotène ainsi que de la xanthophylle (lutéine). La souche orange est dépourvue de chlorophylle, mais elle contient par contre d'importantes quantités d' $\alpha$ - et de  $\beta$ -carotène et de la xanthophylle (lutéine).

**Abstract**—The carotenoids of a normal, green strain of carrot root cambial tissue culture and of an orange mutant strain have been examined. It has been confirmed that the green strain contains, in addition to chlorophylls  $\alpha$  and  $\beta$ , only small quantities of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotenes as well as xanthophyll (lutein). The orange mutant strain is devoid of chlorophylls but contains high amounts of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotenes and xanthophyll (lutein).

### INTRODUCTION

LES souches de tissu cambial de racine de carotte, cultivées *in vitro*, élaborent de la chlorophylle à la lumière. Selon Goodwin, les racines de Carotte cultivées *in vitro* ne synthétisent pas de  $\beta$ -carotène ou de polyènes incolores, tant à la lumière qu'à l'obscurité.<sup>1</sup> Cela constituerait une surprenante dérogation à la règle générale de la présence constante de caroténoïdes dans les tissus chlorophylliens. Cependant, Gautheret signale la présence des caroténoïdes et des xanthophylles dans les cultures de tissus de carotte.<sup>2</sup>

La souche orange isolée par Eichenberger<sup>3</sup> à partir de la souche primitive de tissus de carotte de Gautheret présenterait le cas inverse, c'est à dire la synthèse exclusive et exagérée de caroténoïdes. L'observation microscopique a permis, en effet, d'y déceler des cristaux de carotène.<sup>3</sup>

Ces considérations nous ont incités à reprendre l'étude analytique comparée d'une souche mutante orange, avec, comme pigments de référence, les caroténoïdes isolés à partir de la racine de carotte potagère.

### RESULTATS

#### *Identification des caroténoïdes*

Les xanthophylles sont adsorbées généralement en une seule bande au sommet de la colonne chromatographique. Cependant, dans certains cas, une nouvelle chromatographie de la fraction xanthophylles a permis de distinguer en plus de la bande principale une à deux bandes secondaires. Après élution (voir Matériel et Méthodes), le constituant de la bande principale a donné un maximum d'absorption à 444  $\mu\mu$ . Ce maximum, avec la forme caractéristique de la courbe d'absorption complète d'une part et le comportement hypophasique du pigment vis à vis du méthanol à 90 pour cent d'autre part ont permis d'identifier ce constituant comme étant la lutéine. Par ailleurs, une cochromatographie de la xanthophylle extraite des tissus cultivés *in vitro* a été faite soit avec de la xanthophylle

<sup>1</sup> T. W. GOODWIN, *Ann. Rev. Biochem.* **24**, 497 (1955).

<sup>2</sup> R.-J. GAUTHERET, *La culture des tissus végétaux, techniques et réalisations*, Masson, Paris (1959).

<sup>3</sup> M. E. EICHENBERGER, *Compt. rend. soc. biol.* **145**, 239 (1950).

extraite de la racine de carotte et purifiée, soit avec de la xanthophylle commerciale. Les cochromatogrammes n'ont donné qu'une bande colorée. Les constituants des bandes mineures ont présenté un maximum d'absorption à la même longueur d'onde ( $444 \text{ m}\mu$ ) et ont été considérés comme apparentés à la lutéine (probablement époxy-lutéine). Leur valeur a simplement été ajoutée à celle de la lutéine typique.

Les carotènes ont également été identifiés tant par leur maximum d'absorption ( $\alpha$ -carotène à  $446 \text{ m}\mu$ ,  $\beta$ -carotène à  $450 \text{ m}\mu$ ), que par leur comportement épiphasique vis à vis du méthanol à 95 pour cent. Pour chacun de ces deux pigments, une cochromatographie a été faite avec le carotène correspondant extrait de la racine de carotte et purifié. Les cochromatogrammes n'ont révélé dans les deux cas qu'une seule bande colorée.

#### *Caroténoïdes de la souche verte de tissu cambial de carotte*

Les dosages ont confirmé ce que l'on savait sur les caroténoïdes élaborés par cette souche.<sup>2</sup> Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

TABLEAU 1. TENEUR EN CAROTÈNES ET XANTHOPHYLLES DES TISSUS DE CAROTTE EXPRIMÉE EN MG/100 G DE POIDS FRAIS

Caroténoïdes	Souche verte*		Souche orange†		Racine de carotte potagère
	49 jours	97 jours	67 jours	75 jours	
Carotènes totaux	0,165	0,126	1,400	1,665	8,247
Xanthophylles totales	0,180	0,151	0,254	0,174	0,163
$\alpha$ -carotène	—	—	0,319	0,309	0,652
$\beta$ -carotène	0,165	0,126	1,081	1,046	7,595
Rapport xanthophylles/carotènes	1,08	1,20	0,18	0,11	0,02

\* Les résultats concernant la souche verte se rapportent à la même série d'explantats.

† Les résultats concernant la souche orange se rapportent à deux séries différentes d'explantats.

Il semble que le taux de pigments diminue chez les colonies âgées. Les carotènes sont essentiellement représentés par la forme  $\beta$ . L' $\alpha$ -carotène, en traces (environ 5 à 10 pour cent), n'a pas toujours pu être décelé. Les xanthophylles sont présentes en quantité plus forte que les carotènes (xanthophylles/carotènes = 1,1-1,2). Cette particularité se retrouve dans les résultats des analyses de sept extraits considérés. Par la valeur élevée de son rapport xanthophylles/carotènes, la souche verte s'apparente aux tissus chlorophylliens typiques.

Les xanthophylles ont été dosées après hydrolyse, donc globalement. Nous n'avons pas cherché à distinguer les xanthophylles libres des éventuelles xanthophylles estérifiées que peuvent contenir les tissus de carotte. Nos résultats ne peuvent donc être comparés à ceux obtenus par Chodat<sup>4</sup> et Wentzinger<sup>5</sup> avec les algues *Chlorella rubescens* et *Dictyococcus cinnabarinus*, qui ont observé une augmentation des xanthoesters accompagnant une chute des xanthophylles libres en fonction de l'âge des cultures.

#### *Caroténoïdes de la souche orange de tissu cambial de carotte*

La principale caractéristique de cette souche est l'absence de chlorophylles (Fig. 1). Aucune analyse n'a permis de révéler ces pigments. Par contre, elle synthétise une grande quantité de caroténoïdes (tableau 1). Dans cette souche, les carotènes constituent la majeure

<sup>4</sup> F. CHODAT, *Arch. Sci. phys. et nat.* 5ème période, **20**, 96 (1938).

<sup>5</sup> F. WENTZINGER, *Evolution des pigments caroténoïdes chez une algue verte*, Thèse, Genève (1940).

partie des pigments. Les xanthophylles s'y trouvent également en quantité importante mais ne dépassent jamais celle des carotènes (9,5-15,4 pour cent des caroténoïdes totaux). La souche orange, bien que renfermant une quantité appréciable de carotènes, en possède 5 à 6 fois moins que la racine de carotte potagère (tableau 1). Par contre, elle possède une quantité comparable de xanthophylles.

#### DISCUSSION

La racine de carotte potagère produit en abondance et presque exclusivement de l' $\alpha$ - et du  $\beta$ -carotène.<sup>6</sup> Nous n'y avons dosé que des traces de xanthophylle du type lutéine. Le rapport xanthophylles/carotènes y est par conséquent très bas (0,02, tableau 1), ce qui confirme les résultats obtenus par Booth<sup>7</sup> et les xanthophylles représentent, dans notre cas, 19,4 pour cent des caroténoïdes totaux. Selon Zechmeister et Escue,<sup>8</sup> la racine de carotte sauvage ne produit presque exclusivement que des xanthophylles. Dans des racines jaunes de carotte, les xanthophylles représentent même 75-93 pour cent des caroténoïdes totaux.<sup>9</sup>

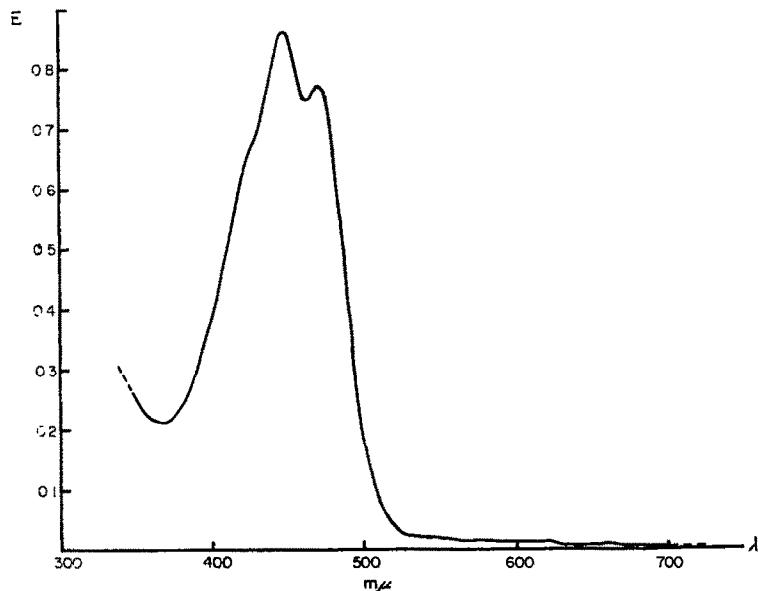


FIG. 1. COURBE D'ABSORPTION D'UN EXTRAIT, AVANT SAPONIFICATION, PROVENANT DE 7,375 G DE TISSUS DE CAROTTE CULTIVÉS *in vitro*, (SOUCHE ORANGE), ÂGÉS DE 75 JOURS, DANS 49 ML D'ÉTHER DE PÉTROLE.

Remarquer l'abondance de caroténoïdes (450 et 470 mμ) et l'absence complète de chlorophylle (660 mμ).

En revanche, dans la souche de tissu cambial cultivée *in vitro*, riche en chlorophylle,<sup>10</sup> le rapport xanthophylle/carotènes est élevé et se rapproche de celui des tissus de feuilles.<sup>11</sup>

La souche mutante de tissu cambial de carotte présente une composition en caroténoïdes beaucoup plus proche de celle des racines des variétés potagères, à savoir un taux élevé

<sup>6</sup> T. W. GOODWIN, *The Comparative Biochemistry of the Carotenoids*, Chapman and Hall Ltd. (1952).

<sup>7</sup> V. H. BOOTH, *J. Soc. Chem. Ind.* **64**, 194 (1945).

<sup>8</sup> L. ZECHMEISTER and R. B. ESCUE, *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.* **27**, 179 (1941).

<sup>9</sup> A. R. KEMMERER and G. S. FRAPS, *Food Res.* **10**, 457 (1945).

<sup>10</sup> J. NAEF, *Compt. rend.* **255**, 1986 (1962).

<sup>11</sup> L. ZECHMEISTER, *Handbuch der Pflanzenanalyse* (Edited by G. KLEIN), Vol. III/2, p. 1239 (1932).

en carotènes et relativement faible en xanthophylles. Le rapport xanthophylles/carotènes y est par conséquent bas. Cette souche d'Eichenberger semble particulièrement intéressante au point de vue de la déviation métabolique caroténogène. En effet, on peut penser que la perturbation génétique primaire détermine chez cette souche une déviation du métabolisme défavorable à la synthèse chlorophyllienne mais favorable à une caroténogénèse accrue, à l'instar de ce qui se passe dans la racine de carotte potagère.

#### MATERIEL ET METHODES

##### *Matériel biologique*

Nous avons utilisé une souche de tissu cambial de racine de carotte ainsi qu'une souche mutante orange isolée par Eichenberger.<sup>3</sup>

Ces souches ont été cultivées selon la méthode classique de Gautheret,<sup>2</sup> à partir d'explantats provenant des souches d'origine.

Comme matériel de référence, nous avons utilisé des racines de carotte potagère hivernées.

##### *Caroténoides*

L' $\alpha$ - et le  $\beta$ -carotène ainsi que la zanthophylle ont été extraits de la racine de carotte potagère et purifiés par chromatographie. Un échantillon de zanthophylle aimablement fourni par Fluka A.G. a également servi de référence.

##### *Milieux et conditions de culture*

La souche normale, chlorophyllienne, a été cultivée sur un milieu gélosé à 1 pour cent constitué par de la solution de Knop diluée de moitié, du glucose 2%, de la vitamine B<sub>1</sub> (10<sup>-6</sup>), de l'acide indolyl-acétique (10<sup>-8</sup>) et une solution d'oligoéléments. Les colonies ont été maintenues dans une chambre climatisée à 23° et soumises à un éclairage de 14 heures par jour fourni par des tubes fluorescents Philips (type "Lumière du jour").<sup>10</sup>

La souche mutante, caroténogène, a été cultivée sur milieu de Heller<sup>12</sup> gélosé, avec les mêmes substances de croissance et dans les mêmes proportions. Le milieu contenait par contre 5% de glucose. Ces colonies ont été maintenues à la température du laboratoire (18-20°) et à la lumière diffuse (elles ont été mises parfois comme les premières à la chambre climatisée). Dans les deux cas, nous avons choisi des colonies relativement âgées en vue d'extraire une quantité suffisante de pigments. Elles ont donc été cultivées pendant 49-96 jours pour la première souche et 67-75 jours pour la seconde.

##### *Extraction et dosage des pigments*

(a) *Extraction.* Les extractions ont été faites à partir de 4 à 5 colonies, soit 6-10 g de tissus frais. Les colonies prélevées étaient pesées puis broyées dans un mortier en présence de sable de quartz additionné d'une petite quantité de carbonate de calcium. Le sable était humecté constamment par de l'acétone, le broyat transporté dans un tube à essais et le mortier rincé à l'acétone. Le tube était alors conservé au froid (4°) pendant au moins deux heures, son contenu était ensuite filtré sur un entonnoir de Büchner et le sable abondamment lavé à l'acétone. La solution acétonique était encore filtrée sur un entonnoir ordinaire et recueillie dans une ampoule à décanter dans laquelle on versait ensuite de l'éther de pétrole. L'addition d'une quantité suffisante d'eau à l'extrait acétonique permettait le passage des caroténoïdes dans l'épiphase constituée par l'éther de pétrole. L'opération était répétée une à deux fois puis les fractions réunies étaient lavées à l'eau,

<sup>12</sup> R. HELLER, *Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro*. Thèse. Paris (1953).

ramenées à un volume de 20-50 ml par évaporation et séchées sur sulfate de sodium. Cet extrait était alors soumis à une première estimation quantitative au spectrophotomètre (Fig. 1).

(b) *Saponification.* L'extrait était saponifié au moyen de quelques pastilles de KOH dissoutes dans 2 ml d'eau ajoutés à l'extrait. Le tout était amené en phase homogène au moyen d'éthanol absolu, puis abandonné une nuit à la chambre froide à 4°. Le mélange alcalin était coupé par addition d'eau. L'épiphase éthéropétrolique était encore lavée à l'eau pour éliminer toute trace d'alcali, puis séchée sur sulfate de sodium. Une partie enfin, était prélevée et soumise à une lecture au spectrophotomètre. La solution était ensuite amenée à un volume de 2-3 ml par évaporation sous vide.

(c) *Chromatographie.* L'extrait ainsi préparé<sup>13</sup> était versé au sommet d'une colonne à chromatographie de 1,8 cm de diamètre. La colonne était remplie sur 8-10 cm de haut par de l'alumine (Siegfried) ou par un mélange de MgO-cérite (Johns-Manville) (1 : 1), ce dernier ayant donné de meilleurs résultats. La colonne était lavée au préalable à l'éther de pétrole. L'élution se faisait au moyen d'éther de pétrole sous une légère aspiration à la trompe à vide. Dans certains cas, l'éther de pétrole était enrichi par de l'acétone (5 pour cent), pour faciliter l'élution. Les éluats étaient conservés pour être dosés (carotènes). Les pigments difficiles à éluer, les xanthophylles, étaient repris en découpant le chromatogramme avec une spatule. Ils étaient ensuite élués dans un flacon contenant de l'éther de pétrole additionné d'éthanol absolu. Le tout était filtré, lavé à l'eau et séché sur sulfate de sodium. Cette solution était alors prête à être dosée en même temps que les premières fractions.

(d) *Dosages.* Les dosages ont été faits à différentes étapes de l'extraction et sur différentes fractions, au moyen du spectrophotomètre Beckman, modèle DU, entre 435 et 455 m $\mu$ . Dans certains cas, des courbes d'absorption complètes (390 à 510 m $\mu$ ) ont été réalisées afin de vérifier le maximum d'absorption. Dans d'autres, les lectures étaient limitées à l'absorption maximum pour les différents pigments dans un volume connu d'éther de pétrole en vue de déterminer une valeur quantitative. Les calculs ont été établis sur la base des valeurs d'extinction aux maxima au moyen des coefficients spécifiques d'extinction ( $\alpha$ -carotène  $E_{1\text{cm}}^1 = 2750$  à 446 m $\mu$ , selon Porter et Lincoln;<sup>14</sup>  $\beta$ -carotène  $E_{1\text{cm}}^1 = 2590$  à 450 m $\mu$ , selon Zechmeister;<sup>15</sup> xanthophylle  $E_{1\text{cm}}^1 = 2500$  à 445 m $\mu$ , selon Zscheile<sup>16</sup>).

*Remerciements*—Nous remercions vivement le Professeur R.-J. Gautheret de ses conseils et de l'attention qu'il a prêtée à nos recherches ainsi que le Professeur F. Chodat qui a bien voulu permettre la réalisation de ce travail.

<sup>13</sup> G. TURIAN, *Arch. Mikrobiol.* **36**, 139 (1960).

<sup>14</sup> J. W. PORTER and R. E. LINCOLN, *Arch. Biochem.* **27**, 390 (1950).

<sup>15</sup> L. ZECHMEISTER, *Chem. Rev.* **34**, 267 (1944).

<sup>16</sup> E. P. ZSCHEILE, J. W. WHITE, B. W. BEADLE and J. R. ROACH, *Plant Physiol.* **17**, 331 (1942).