

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

11 N° de publication : 2 648 675  
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)  
21 N° d'enregistrement national : 89 08513  
51 Int Cl<sup>6</sup> : A 01 N 33/02; A 01 H 3/04.

12 DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

22 Date de dépôt : 27 juin 1989.

30 Priorité :

43 Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 52 du 27 décembre 1990.

60 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

71 Demandeur(s) : Etablissement Public dit : Institut National de la Recherche Agronomique I.N.R.A. — FR.

72 Inventeur(s) : Josette Martin ; Monique Carré.

73 Titulaire(s) :

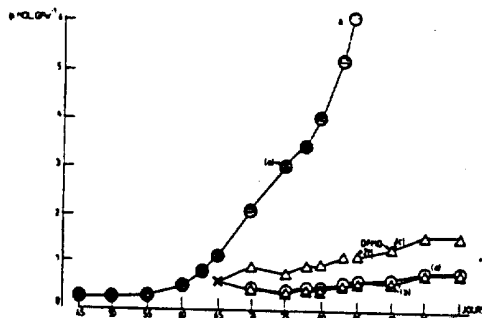
74 Mandataire(s) : Cabinet Ores.

54 Compositions propres à influencer le développement et la floraison de plantes, procédé de traitement de plantes par ces compositions et plantes modifiées obtenues.

57 La demande est relative à des compositions propres à influencer le développement et la floraison de plantes.

Ces compositions se caractérisent en ce qu'elles comprennent au moins une amine propre à se conjuguer *in situ* avec un phénol, notamment avec un acide hydroxycinnamique, associée à un véhicule de traitement approprié.

Applications à l'obtention de plantes modifiées.



FR 2 648 675 - A1

1

La présente invention est relative à une composition, comprenant essentiellement des amines, propre à influencer le développement et/ou la floraison de plantes, à un procédé de traitement de plantes qui met en œuvre ladite composition, et aux plantes modifiées obtenues par application dudit traitement.

Il est bien connu que la formation des racines des plantes implique une activité mitotique intense et des modifications métaboliques et qu'elle dépend de toute une série de facteurs physiologiques endogènes. Alors que les auxines semblent être un "inducteur" universel des racines adventices, d'autres facteurs sont également impliqués et ils peuvent devenir limitants dans certaines conditions ; c'est ainsi qu'il a été démontré que des inhibiteurs, des cofacteurs de formation de racines, des antagonistes de l'auxine et des agents nutritifs peuvent moduler la formation de racines.

Des études récentes indiquent que des polyamines peuvent jouer un rôle significatif dans la croissance et la senescence des plantes (cf ALTMAN et al ; 1981 in ADVANCES IN POLYAMINE RESEARCH, vol. 3, Pergamon Press, New-York, p. 365-376 et GALSTON, BIOSCIENCE, 1983, 33, p. 102-109) qui serait similaire à leur activité dans les tissus de mammifères et chez les procaryotes.

On sait que des plantes telles que *Nicotiana tabacum* var. *xanthi* n.c. contiennent des amides d'acides hydroxycinnamiques. CABANNE et al. (PHYSIOL PLANT. 1981, 53, p. 399-404 ont montré, en étudiant in vivo plusieurs variétés de *N. tabacum*, que des amides hydrosolubles s'accumulent dans les feuilles, tandis que les amides solubles dans les solvants organiques ne se trouvent que dans les inflorescences et en particulier dans les fleurs ; ils ont également démontré une corrélation entre l'accumulation d'amides et la floraison.

Des cultures in vitro d'explants foliaires de

diverses variétés de Roses et de *N. tabacum* respectivement ont été réalisées sur un milieu de culture de base comprenant les éléments minéraux de MURASHIGE et SKOOG, les vitamines de MOREL et MARTIN, 3 % de saccharose, 100 mg/l d'inositol et 200 mg/l de glutamine, additionné d'auxine pour induire le processus de différenciation vers la rhizogénèse ou additionné d'auxine et de cytokinine pour induire ledit processus de différenciation vers la caulogénèse (cf MARTIN et al. C.R. ACAD. SC. PARIS, Tome 298, 21 Septembre 1981, Série III p. 175-177 et Malfatti et al. *PHYSIOL. PLANT.* 1983, 57, p. 492-498). La deuxième de ces publications démontre que 5 amines libres ont été identifiées dans les tissus mis en culture dans de tels milieux, à savoir 3 amines aliphatiques: la putrescine, la spermidine et la spermine, et 2 amines aromatiques: la tyramine et la phénéthylamine. La concentration en amines libres est plus importante en caulogénèse qu'en rhizogénèse, sauf pour la tyramine. La spermine est présente à l'état de traces; le taux de spermidine présente à raison de 300 nmol par g de matière fraîche demeure égal dans les trois milieux de culture (sans addition d'hormone, avec addition d'auxine et avec addition d'auxine et de cytokinine); la putrescine augmente davantage dans les explants sur milieu de caulogénèse que dans les autres explants. La teneur en tyramine augmente surtout (d'environ 20 %) dans les explants cultivés sur milieu de base et sur milieu de rhizogénèse, tandis que la teneur en phényléthylamine augmente temporairement (d'environ 40 %) uniquement dans les explants en caulogénèse entre le 6ème et le 20ème jour de culture. En ce qui concerne les teneurs en acides aminés libres des explants, elles augmentent le plus fortement dans les explants cultivés en milieu de base et dans les explants en rhizogénèse, les augmentations étant les plus fortes pour 5 d'entre eux, à savoir l'asparagine, la glutamine, l'histidine, la proline, ainsi que l'acide glutamique. Cependant, alors

que dans les explants témoins les teneurs de ces 5 acides aminés continuent d'augmenter au-delà du 10ème jour de culture, dans les tissus qui différencient des racines ou des bourgeons, les teneurs tendent à diminuer quand les organes néoformés apparaissent. Ce deuxième article note, en outre, que les teneurs en amides seraient considérablement plus élevées, dans les cultures in vitro, que dans la plante.

Il a été proposé, d'autre part, (cf MARTIN et al. PLANT CELL REPORTS (1985), 4, p. 158-160) d'ajouter des amides d'acides hydroxycinnamiques à un milieu de culture de base tel que précédemment décrit, additionné d'auxine et de cytokinine, pour réaliser des cultures in vitro d'explants de *N. tabacum*, dans le but d'apprécier l'influence de ces dérivés sur la multiplication et la différenciation cellulaires des explants du Tabac. Les amides d'acides hydroxycinnamiques testés ont été des dérivés de la putrescine, à savoir la p-coumaroyl-putrescine, la cafeoyl-putrescine et la feruloylputrescine et leurs actions ont été comparées à celle de la putrescine. Les Auteurs ont observé que lorsque les dérivés susdits sont ajoutés au milieu de culture, il se produit une croissante proliférative rapide d'un callus indifférencié, l'effet de croissance optimal étant obtenu avec la cafeoylputrescine et avec la feruloylputrescine. La croissance peut être maintenue indéfiniment en transférant les calli dans un milieu de culture identique, à ceci près que dans certaines expérimentations la différenciation des bourgeons à partir du callus et les changements subséquents du développement jusqu'à la formation de plantules, ont été obtenus par transfert dans un milieu de culture dépourvu d'amides d'acides hydroxycinnamiques. Les Auteurs ont, de plus, établi que l'effet favorisant la croissance n'est obtenu qu'à des concentrations comprises entre  $5 \cdot 10^{-5}M$  et  $2.5 \cdot 10^{-4}M$  avec la cafeoylputrescine et à des concentrations comprises entre  $10^{-4}M$  et  $5 \cdot 10^{-4}M$  avec la

feruloylputrescine. Au-dessus de ces concentrations l'effet de croissance diminue pour disparaître à la concentration de  $5.10^{-3}M$ , cette concentration n'ayant cependant aucune activité toxique. A  $10^{-3}M$  et au-dessus, les amides d'acides cinnamiques n'exercent aucune action. Entre  $2,50.10^{-3}M$  et  $5.10^{-3}M$ , les deux amides inhibent partiellement la sortie des bourgeons, mais favorisent la formation de callus. De  $10^{-4}M$  à  $5.10^{-3}M$ , ces dérivés inhibent fortement aussi bien la multiplication des cellules que la formation des bourgeons. A noter que la putrescine libre n'exerce aucun effet sur la croissance, à quelque concentration que ce soit, et a un effet toxique à partir de  $10^{-3}M$ . Les Auteurs concluent leur étude par la formulation de l'hypothèse selon laquelle ces données pourraient constituer des régulateurs de croissance dans des cultures (végétales) in vitro.

Un Article de MARTIN et al. paru dans C.R. ACAD. SCI PARIS, 1981 (Série III), 293, p. 249-251, rapporte que l'infection de feuilles par le virus de la mosaïque du Tabac a pour effet d'augmenter la production d'amides d'acides hydroxycinnamiques (polyamines conjuguées à un acide hydroxycinnamique par une liaison amide) et que l'application topique des conjugués sur des feuilles infectées diminue le nombre des lésions par le virus de la mosaïque du Tabac.

Dans un Article publié dans PLANT MOLECULAR BIOLOGY, édité en 1987 par PLENUM PUBLISHING CORP. sous la direction de D. VON WETTSTEIN et NAM-HAI CHUA, J. MARTIN-TANGUY et al. (p. 253-263) rappellent qu'il est bien connu que la résistance des plantes aux virus est souvent associée à la floraison, les particules virales étant pratiquement absentes des méristèmes, des organes sexuels et des graines où les amides d'acides hydroxycinnamiques s'accumulent en grandes quantités.

La présente invention s'est donné pour but de produire des plantes, notamment des plantes ligneuses et

des plantes herbacées, présentant un nombre de ramifications considérablement supérieur à celui des plantes conformes à l'Art antérieur, avec une longueur de tiges très supérieure aux longueurs de tiges des précédentes, donnant lieu à des plantes de taille et d'envergure notablement plus importantes que les plantes conformes à l'Art antérieur. La présente invention s'est également donné pour but de pourvoir à des plantes, notamment à des plantes ligneuses et des plantes herbacées, qui se distinguent par leur floraison précoce, par un plus grand nombre de fleurs par plante, par un plus grand diamètre de chacune des fleurs et par une plus grande densité du nombre de pétales de chacune des fleurs, que dans le cas des plantes connues dans l'Art antérieur. La présente invention s'est, de plus, donné pour but de pourvoir à des plantes, notamment à des plantes ligneuses et des plantes herbacées, présentant un taux d'amides d'acides hydroxycinnamiques contrôlé à volonté pour favoriser une ou plusieurs étapes de développement de la plante. La présente invention s'est, en outre, donné pour but de pourvoir à des plantes, notamment à des plantes ligneuses et à des plantes herbacées, dont la nature des amides d'acides hydroxycinnamiques qu'elles contiennent et notamment la nature des amines conjuguées à un acide hydroxycinnamique, qu'elles contiennent, est contrôlée à volonté pour favoriser une ou plusieurs étapes de développement de la plante.

La présente invention a pour objet une composition de traitement de plants obtenus par culture cellulaire in vitro de matériel végétal, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une amine propre à se conjuguer in situ avec un phénol, notamment avec un acide hydroxycinnamique, associée à un véhicule de traitement approprié.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite composition, celle-ci comprend de la putrescine

associée à un véhicule de traitement approprié.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition, celle-ci comprend de la spermidine associée à un véhicule de traitement approprié.

5 Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition, celle-ci comprend de la spermine associée à un véhicule de traitement approprié:

10 Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition, celle-ci comprend de la cadavérine associée à un véhicule de traitement approprié.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition, celle-ci comprend de la tyramine associée à un véhicule de traitement approprié.

15 Conformément à un mode de réalisation avantageux de ladite composition, celle-ci comprend de la putrescine et de la tyramine, associées à un véhicule de traitement approprié.

20 Selon au autre mode de réalisation avantageux, de l'invention, ladite composition comprend de la spermidine et de la tyramine associées à un véhicule de traitement approprié.

25 Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite composition comprend de la putrescine, de la spermidine et de la tyramine associées à un véhicule de traitement approprié.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite composition comprend de la spermidine, de la tyramine et de la phényléthylamine associées à un véhicule de traitement approprié.

30 Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite composition comprend une, deux ou trois des amines susdites, ainsi qu'un acide hydroxycinnamique, associés à un véhicule de traitement approprié.

35 Selon une disposition avantageuse de ce mode de

réalisation l'acide hydroxycinnamique est l'acide caféique.

Selon un mode de réalisation avantageux de la composition conforme à la présente invention, le véhicule de traitement approprié est constitué par de l'eau dans laquelle les constituants actifs sont dissous pour former une solution de traitement.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de la composition conforme à la présente invention, le véhicule de traitement approprié est constitué par un système de libération progressive des constituants actifs qu'il contient, pris dans le groupe qui comprend notamment les liposomes et systèmes similaires.

Selon un mode de réalisation avantageux de la composition conforme à la présente invention, l'amine ou chacune des amines est présente dans la composition à une concentration de l'ordre de  $10^{-5}M$  à  $10^{-3}M$  (concentration finale).

Selon un autre mode de réalisation avantageux de la composition conforme à la présente invention, celle-ci est en outre associée à un inhibiteur d'au moins l'une des enzymes qui commandent la biosynthèse de la putrescine.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de la composition conforme à la présente invention, celle-ci comprend en outre au moins l'une des enzymes propres à favoriser la biosynthèse d'au moins l'une des amines susceptibles de se conjuguer in situ à un acide hydroxycinnamique.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ladite composition comprend au moins une enzyme choisie dans le groupe qui comprend l'ornithine-décarboxylase, la SAM-décarboxylase, la spermidine-synthétase et l'arginine-décarboxylase.

La présente invention a également pour objet un procédé de traitement de plants obtenus par culture cellulaire in vitro qui comprend une première phase de culture cellulaire de matériel végétal, laquelle comprend

elle-même une première étape de mise en culture dans un milieu favorisant la caulogénèse et une deuxième étape de mise en culture dans un milieu favorisant la rhizogénèse, et une deuxième phase d'acclimatation et de repiquage des  
5 petits plants obtenus à l'issue de la première phase, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend une troisième phase qui consiste à traiter les plants repiqués par une composition telle que définie dans ce qui précède.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du  
10 procédé de traitement conforme à l'invention, les plants repiqués sont traités par une composition comprenant au moins une amine apte à se conjuguer in situ avec un acide hydroxycinnamique, éventuellement au moins un acide hydroxycinnamique, associé(s) à un véhicule de traitement  
15 approprié.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux du procédé de traitement conforme à l'invention, les plants repiqués sont traités par une composition comprenant au moins l'une des amines susdites,  
20 éventuellement au moins un acide hydroxycinnamique, un inhibiteur d'au moins l'une des enzymes qui sont aptes à intervenir dans la biosynthèse de l'une des amines susdites, associés à un véhicule de traitement approprié.

Selon une disposition avantageux de ce mode de  
25 mise en oeuvre, la troisième phase du traitement comprend une première étape de traitement par une composition comprenant au moins l'une des amines susdites et éventuellement au moins un acide hydroxycinnamique et une deuxième étape de traitement par une composition comprenant  
30 au moins un inhibiteur de l'une des enzymes qui interviennent dans la biosynthèse de l'une des amines susdites.

Selon encore un autre mode de mise en oeuvre avantageux du procédé de traitement conforme à la présente  
35 invention, la troisième phase de celui-ci comprend le

traitement des plants repiqués, par une composition  
comprenant au moins l'une des amines susdites,  
éventuellement au moins un acide hydroxycinnamique, au  
moins l'une des enzymes qui sont aptes à intervenir dans la  
5 biosynthèse de l'une desdites amines, au moins un  
inhibiteur de l'une desdites enzymes, associés à un  
véhicule approprié.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de  
mise en oeuvre, l'inhibiteur ou les inhibiteurs des enzymes  
10 susdites se trouve dans une composition séparée qui est  
appliquée dans une deuxième étape de la troisième phase du  
traitement.

La présente invention a en outre pour objet les  
plantes obtenues par le procédé de traitement conforme à la  
15 présente invention.

Outre les dispositions qui précèdent,  
l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui  
ressortiront de la description qui va suivre.

L'invention sera mieux comprise à l'aide du  
20 complément de description qui va suivre, qui se réfère à  
des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la  
présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces  
exemples et les parties descriptives correspondantes, sont  
25 donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de  
l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une  
limitation.

Les exemples qui vont suivre concernent  
essentiellement les rosiers et les tabacs ; cependant, on  
30 comprendra aisément que l'invention s'applique à toutes les  
plantes, et notamment aux plantes ligneuses et aux plantes  
herbacées, et plus particulièrement aux rosacées, à la  
vigne, aux solénacées, aux espèces ornementales, aux  
plantes utilitaires destinées à l'alimentation ou à des  
35 usages pharmaceutiques ou cosmétiques.

**EXEMPLE 1****Culture cellulaire et traitement des  
plants repiqués résultants**

1. Des méristèmes prélevés sur de jeunes tiges herbacées en  
5 pleine croissance de diverses variétés de rosiers ont été  
mis en culture pendant 7 jours dans un milieu de culture de  
caulogénèse contenant les éléments suivants :
- A) . les macro- et microéléments de MURASHIGE  
et SKOOG
  - 10 . les vitamines de MOREL et MARTIN
  - . la L-glutamine à  $6,8 \times 10^{-4}M$
  - . l'inositol à  $5,5 \times 10^{-4}M$
  - . le saccharose à  $8,7 \times 10^{-2}M$
  - B) . une auxine à  $10^{-5}M$
  - 15 . une cytokinine à  $10^{-7}M$
2. Au jour J8, les microplants ont été transférés dans un  
milieu de culture contenant outre les éléments A,  
uniquement une auxine, pour développer les racines, dans  
lequel la culture a été poursuivie pendant 21 à 28 jours.
- 20 Au cours de ces 2 étapes la culture a été poursuivie dans  
une salle de culture dans les conditions similaires  
suivantes :
- .  $20^{\circ}C \pm 0,5^{\circ}C$
  - . éclairement  $120-150 W-m^2$  (tubes fluorescents  
25 PHILIPS 110 et lampes incandescentes 40 W)
  - . photopériode : 16 heures
  - . humidité relative : 70-80 %.
3. Les plants obtenus ont ensuite été acclimatés en chambre  
climatisée sous tunnel plastique, durant 8 à 10 jours à une  
30 température de  $20^{\circ}C \pm 0,5^{\circ}C$ ,
- . avec un éclairement de  $120-150 W-m^2$  et
  - . une photopériode de 16 heures,
- après avoir été transférés dans des pots remplis d'un  
mélange tourbe/gravier (50/50).
- 35 4. Les plants sont ensuite sortis du tunnel et maintenus  
pendant 1 semaine dans une chambre climatisée aux

conditions indiquées plus haut.

5. Le traitement conforme à l'invention débute alors et est poursuivi pendant 9 semaines dans les conditions suivantes : pendant les 3 premières semaines les plants sont traités par 3 x 100 ml par semaine d'une composition de traitement conforme à l'invention ; les semaines suivantes, les plants sont traités par 2 x 150 ml par semaine. Les compositions de traitement contiennent avantagement l'amine ou les amines à des concentrations finales de  $10^{-3}M$  à  $2 \times 10^{-3}M$  ; en particulier, lorsqu'elles contiennent de la putrescine, celle-ci est présente à une concentration de  $2 \times 10^{-3}M$ . Lorsqu'elles contiennent de l'inhibiteur, celui-ci est présent à une concentration de  $2 \times 10^{-3}M$ .
- 15 Le traitement peut être appliqué par arrosage, par exemple. Le traitement est avantagement complété par l'application d'une composition nutritive telle que celle décrite par COIC et LESAINT.

#### EXEMPLE 2

- 20 Résultats obtenus sur une variété de Roses Mercedes au bout de 65 jours de traitement par une composition conforme à l'invention.

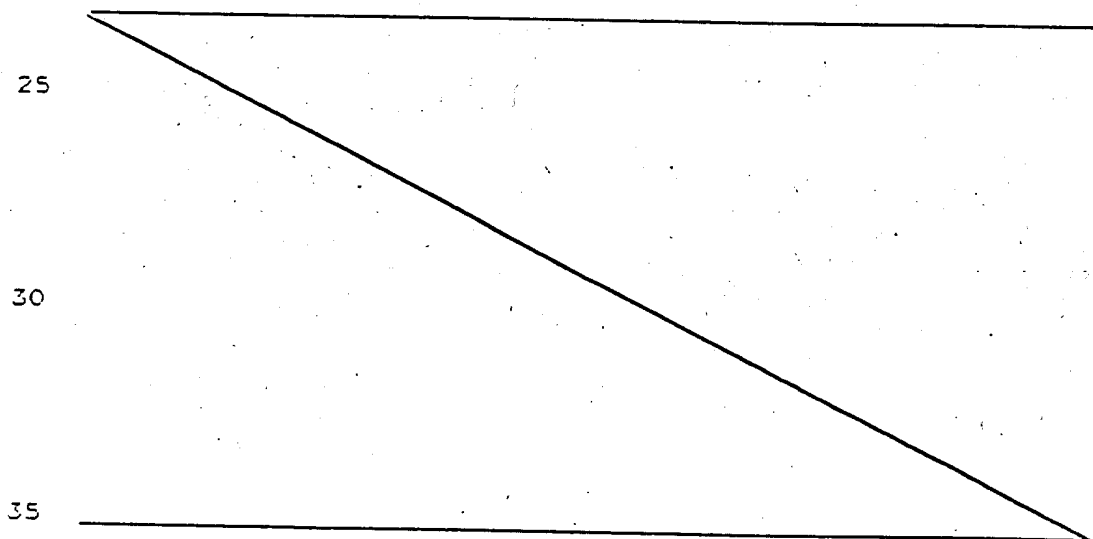


Tableau 1 : CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES ET FLORALES  
65 JOURS APRES LE DEBUT DU TRAITEMENT

Roses = Mercedes

	Nombre de tiges principales et indépendantes	Nombre de fleurs fanées	Nombre de fleurs ouvertes	Nombre de boutons floraux	Total Fleurs	Diamètre des fleurs (cm)	Nombre de rangs de pétales
Témoïn	1 à 2 tiges de 10 à 15 cm	1	2	1 à 2	4	3.0 cm	4
Put	2 tiges de 30 à 40 cm	2	4	4	8	6.5 cm	6
Spd	3 tiges de 30 à 40 cm	1	3	4	7	6.5 cm	8
Spm	6 tiges de 30 à 40 cm	2	7	4	11	5.0 cm	6
Cad	3 tiges de 40 à 50 cm	2	6	4	10	5.0 cm	4
Tyr	3 tiges de 15 à 20 cm	1	3	0	3	6.5 cm	4

5

10

15

20

25

30

35

TABLEAU I (Suite)

	35	30	25	20	15	10	5
Caf	1		1	Sénescence			
Put + Caf	1 tiges de 30 à 40 cm		1	3	4	7	8
Spd + Caf	2 tiges de 30 à 40 cm		1	3	4	7	8
Put + Tyr	2 tiges de 30 à 40 cm		1	2	2	4	8
Spd + Tyr	4 tiges de 30 à 40 cm		1	5	3	8	8
Put + Tyr + Caf	4 tiges de 30 à 40 cm		3	3	5	8	4
Spd + Tyr + Caf	2 tiges de 30 à 40 cm		1	4	3	7	8
Put + Spd + Tyr	3 tiges de 40 à 50 cm		2	3	3	6	8
Put + Tyr + Phenyl + Caf	3 tiges de 50 cm		1	6	4	10	10 à 12

TABLEAU I  
(suite)

35	30	25	20	15	10	5
Spd + Tyr + Phenyl + Caf	2 tiges de 50 cm	3	4	2	6	8 6.0 cm

Métabolites utilisés :

Put (Putrescine)  
 Spd (Spermidine)  
 Spm (Spermine)  
 Cad (Cadavérine)  
 Tyr (Tyramine)  
 Caf (acide caféique)  
 Phenyl (Phényléthylamine)

## EXEMPLE 3

Variations des taux des amines libres et des amines conjuguées dans des plants de tabac.

Les Figures 1 et 2 annexées illustrent respectivement :

La Figure 1 : la réversion de l'effet de l'inhibiteur irréversible de l'ODC par la putrescine,

la Figure 2 : les effets d'un inhibiteur de l'ODC sur l'accumulation d'amines conjuguées dans les sommets d'un plant de tabac.

L'inhibiteur DFMO ou DL-adifluorométhylornithine est mis en oeuvre à une concentration de  $2 \times 10^{-3}M$  et la putrescine est également mise en oeuvre à une concentration de  $2 \times 10^{-3}M$ .

Dans la Figure 1 :

- les cercles vides représentent la caféoyl-putrescine,
- les triangles vides représentent la caféoyl-spermidine,
- les cercles pleins représentent l'accumulation exponentielle des amines conjuguées (caféoyl-putrescine + caféoyl-spermidine) dans les sommets des plants de tabac témoins,
- les carrés pleins représentent les amines conjuguées (caféoyl-putrescine + caféoyl-spermidine) après l'addition d'inhibiteur de l'ODC et de putrescine dans les sommets des plants de tabac (retour aux concentrations du témoin).

La Figure 1 représente donc la variation du taux des amines conjuguées, après addition de l'inhibiteur de l'ODC et de la rescine ( $2 \times 10^{-3}M$ )

L'ensemble A constitue l'illustration de l'apparition de l'émergence du complexe floral aussi bien dans les témoins que dans les plants de tabac traités par l'inhibiteur et la putrescine.

Les concentrations des amines sont indiquées en ordonnée ; les résultats sont exprimés en fonction du nombre de jours qui suivent les semis (en abscisse).

Dans la Figure 2 :

- les cercles vides,
  - les cercles pleins et
  - les triangles vides ont la même signification que dans la
- 5 Figure 1.
- les triangles pleins illustrent l'inhibition de la
- floraison.

En particulier, la Courbe a représente le  
taux de caféoyl-spermidine après addition de l'inhibiteur  
10 et la Courbe b le taux de caféoyl-putrescine. La  
Courbe c représente la variation du taux d'amines  
conjuguées (caféoyl-putrescine + caféoyl-spermidine) dans  
le sommet des plants de tabac traités, auxquels a été  
ajouté un inhibiteur de l'ODC, 65 jours après le semis. La  
15 Courbe e représente l'accumulation exponentielle d'amines  
conjuguées dans les sommets des plants de tabac témoins,  
on observe l'apparition du complexe floral (point B). On a  
figuré en abscisse le nombre de jours après le semis et en  
ordonnée les concentrations en amines conjuguées exprimées  
20 en  $\mu$  Mol.GFW<sup>-1</sup>.

L'inhibiteur mis en oeuvre est la DFMO ou DL- $\alpha$ -  
difluorométhylornithine et est utilisé à une concentration  
de  $2 \times 10^{-3}$ M ; la putrescine est utilisée à une  
concentration de  $2 \times 10^{-3}$ M. Le traitement est entrepris  
25 65 jours après le semis et il consiste en des arrosages des  
plants traités, dans les conditions suivantes : 3 x 120 ml,  
la première semaine ; les semaines suivantes : 2 x 120 ml.  
Les témoins sont arrosés par de l'eau de même nature que  
celle utilisée pour réaliser les solutions de traitement.  
30 Les arrosages complémentaires sont effectués avec de la  
solution de COYC et LESAINTE.

## REVENDICATIONS

1. Composition de traitement de plants obtenus par culture cellulaire in vitro de matériel végétal, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une amine propre à se conjuguer in situ avec un phénol, notamment avec un acide hydroxycinnamique, associée à un véhicule de traitement approprié.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend de la putrescine associée à un véhicule de traitement approprié.

3. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend de la spermidine associée à un véhicule de traitement approprié.

4. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend de la spermine associée à un véhicule de traitement approprié.

5. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend de la cadavérine associée à un véhicule de traitement approprié.

6. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend de la tyramine associée à un véhicule de traitement approprié.

7. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend de la putrescine et de la tyramine, associées à un véhicule de traitement approprié.

8. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend de la spermidine et de la tyramine associées à un véhicule de traitement approprié.

9. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend de la putrescine, de la spermidine et de la tyramine associées à un véhicule de traitement approprié.

10. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend de la spermidine, de la

tyramine et de la phényléthylamine associées à un véhicule de traitement approprié.

5 11. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend une, deux ou trois des amines susdites, ainsi qu'un acide hydroxycinnamique, associés à un véhicule de traitement approprié.

12. Composition selon la revendication 11, caractérisée en ce que l'acide hydroxycinnamique est l'acide caféique.

10 13. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que le véhicule de traitement approprié est constitué par de l'eau dans laquelle les constituants actifs sont dissous pour former une solution de traitement.

15 14. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que le véhicule de traitement approprié est constitué par un système de libération progressive des constituants actifs qu'il contient, pris dans le groupe qui comprend notamment les liposomes et systèmes similaires.

20 15. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisée en ce que l'amine ou chacune des amines est présente dans la composition à une concentration de l'ordre de  $10^{-5}M$  à  $10^{-3}M$  (concentration finale).

25 16. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisée en ce qu'elle est en outre associée à un inhibiteur d'au moins l'une des enzymes qui commandent la biosynthèse de la putrescine.

30 17. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins l'une des enzymes propres à favoriser la biosynthèse d'au moins l'une des amines susceptibles de se conjuguer in situ à un acide hydroxycinnamique.

35 18. Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une enzyme choi-

sie dans le groupe qui comprend l'ornithine-décarboxylase, la SAM-décarboxylase, la spermidine-synthétase et l'arginine-décarboxylase.

19. Procédé de traitement de plants obtenus par  
5 culture cellulaire in vitro, qui comprend une première phase de culture cellulaire de matériel végétal, laquelle comprend elle-même une première étape de mise en culture dans un milieu favorisant la caulogénèse et une deuxième  
10 étape de mise en culture dans un milieu favorisant la rhizogénèse, et une deuxième phase d'acclimatation et de repiquage des petits plants obtenus à l'issue de la première phase, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend une troisième phase qui consiste à traiter les  
15 plants repiqués par une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 18.

20. Procédé de traitement selon la revendication 19, caractérisé en ce que les plants repiqués sont traités par une composition comprenant au moins une amine apte à se conjuguer in situ avec un acide  
20 hydroxycinnamique, éventuellement au moins un acide hydroxycinnamique, associé(s) à un véhicule de traitement approprié.

21. Procédé de traitement selon la revendication 19, caractérisé en ce que les plants repiqués sont  
25 traités par une composition comprenant au moins l'une des amines susdites, éventuellement au moins un acide hydroxycinnamique, un inhibiteur d'au moins l'une des enzymes qui sont aptes à intervenir dans la biosynthèse de l'une des amines susdites, associés à un véhicule de  
30 traitement approprié.

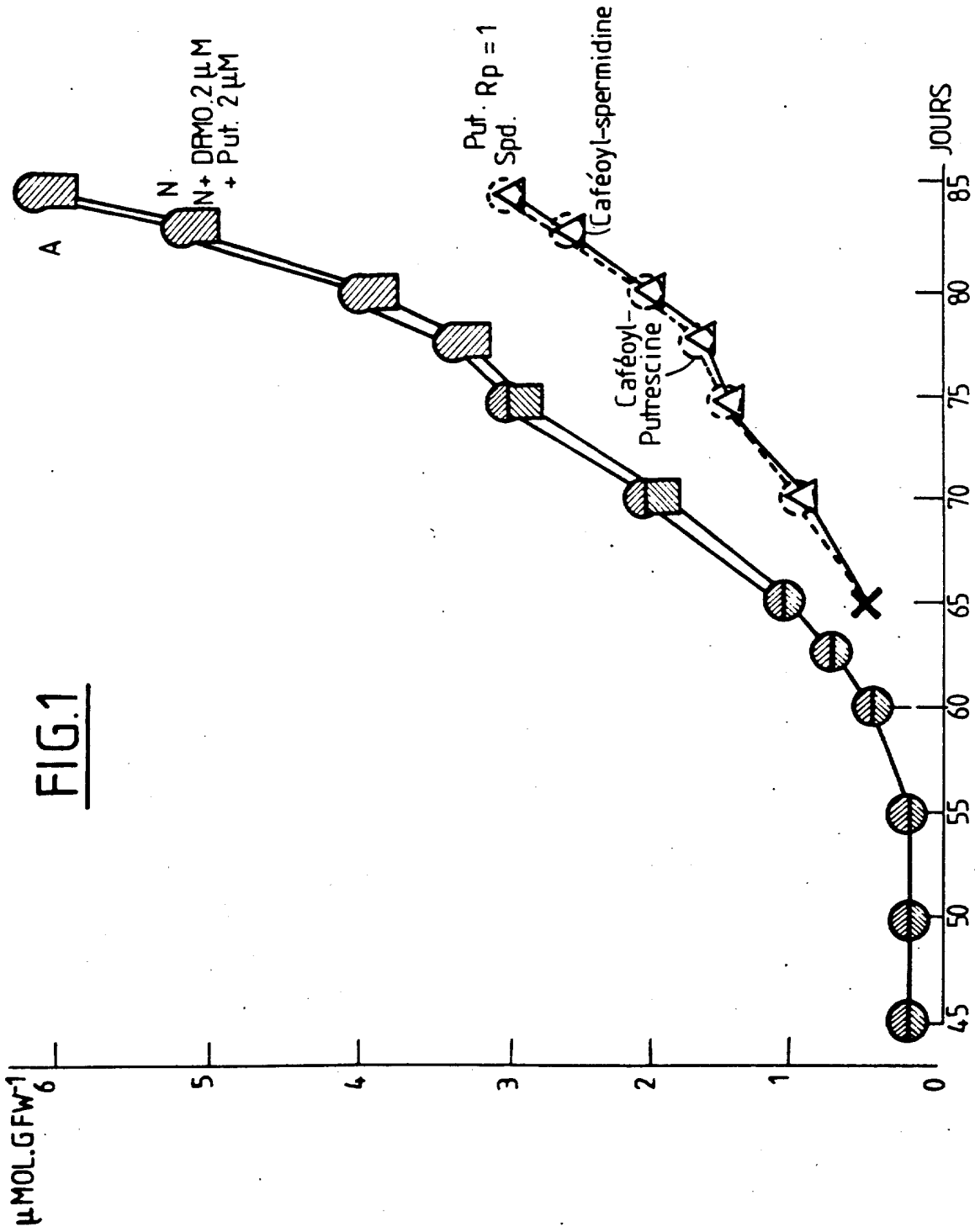
22. Procédé de traitement selon la revendication 21, caractérisé en ce que la troisième phase du traitement comprend un première étape de traitement par une composition comprenant au moins l'une des amines susdites  
35 et éventuellement au moins un acide hydroxycinnamique et une deuxième étape de traitement par une composition comls

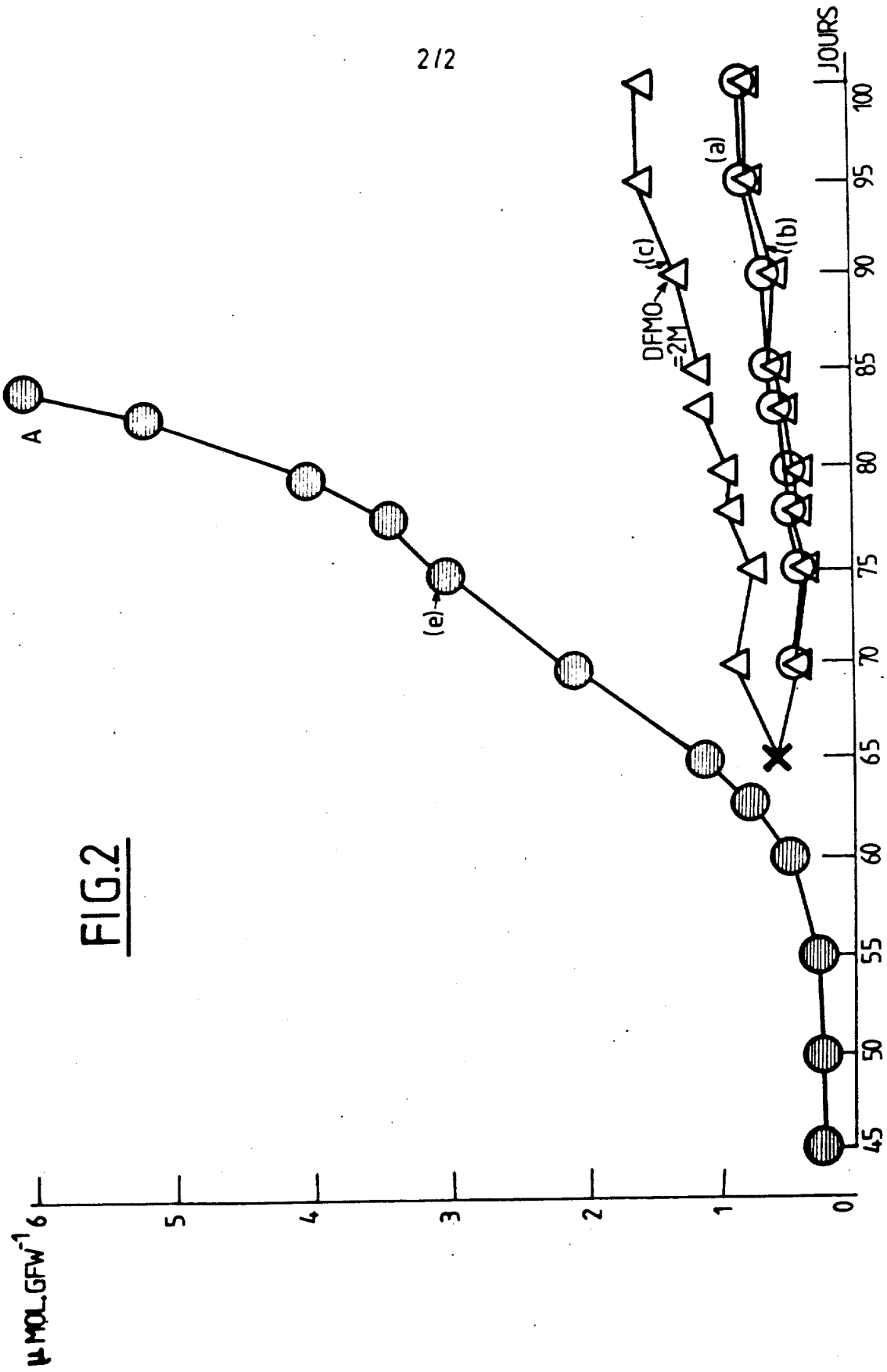
prenant au moins un inhibiteur de l'une des enzymes qui interviennent dans la biosynthèse de l'une des amines susdites.

23. Procédé de traitement selon la revendication 19, caractérisé en ce que la troisième phase de celui-ci comprend le traitement des plants repiqués par une composition comprenant au moins l'une des amines susdites, éventuellement au moins un acide hydroxycinnamique, au moins l'une des enzymes qui sont aptes à intervenir dans la biosynthèse de l'une desdites amines, au moins un inhibiteur de l'une desdites enzymes, associés à un véhicule approprié.

24. Procédé de traitement selon la revendication 23, caractérisé en ce que l'inhibiteur ou les inhibiteurs des enzymes susdites se trouvent dans une composition séparée qui est appliquée dans une deuxième étape de la troisième phase du traitement.

25. Plantes caractérisées en ce qu'elles sont obtenues en mettant en oeuvre le procédé de traitement selon l'une quelconque des revendications 19 à 24, à l'aide de la composition de traitement selon l'une quelconque des revendications 1 à 18.





**FIG. 2**