



HAL
open science

Etude de la voie de biosynthèse de la galanthamine chez *Leucojum aestivum* L. : criblage phytochimique de quelques amaryllidaceae

Anna El Tahchy

► To cite this version:

Anna El Tahchy. Etude de la voie de biosynthèse de la galanthamine chez *Leucojum aestivum* L. : criblage phytochimique de quelques amaryllidaceae. Autre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2010. Français. NNT : 2010NAN10072 . tel-01748647

HAL Id: tel-01748647

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748647v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Faculté des Sciences

École Doctorale S.E.S.A.M.E.S.

THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-Université

en Chimie

par

Anna El Tahchy

Étude de la voie de biosynthèse de la galanthamine chez *Leucojum aestivum* L. – Criblage phytochimique de quelques Amaryllidaceae

*The Study of galanthamine biosynthesis pathway in *Leucojum aestivum* L. –
Phytochemical screening of some Amaryllidaceae plants.*

Thèse dirigée par : Pr. D. Laurain-Mattar

Soutenue le 13 Octobre 2010, devant le jury composé de :

Rapporteurs : Dr. Roger Lteif, Université Saint Joseph, Beyrouth
Pr. François Tillequin, Université de Paris V

Examineurs : Dr. Yves Chapleur, Université Henri Poincaré, Nancy
Dr. Catherine Guillou, ICSN CNRS, Gif-sur-Yvette
Dr. Alain Hehn, ENSAIA-INPL-INRA, Nancy
Pr. Richard Maroun, Université Saint Joseph, Beyrouth
Dr. Agata Ptak, Université d'Agriculture, Cracovie
Pr. Dominique Laurain-Mattar, Université Henri Poincaré, Nancy

Invité : Pr. Toufic Rizk, Université Saint Joseph, Beyrouth

À ma famille, Ramzy, Aida, Youmna et Elie, en témoignage de ma profonde gratitude,

Au feu de mes grands-parents, et À ma grand-mère,

À Katie et mes chers cousins,

À Billy, et À tous les amis.

Remerciements

Les présents travaux ont été réalisés au groupe SUCRES de l'UMR 7565 – CNRS UHP Nancy-1.

Je tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Ensuite, je tiens à remercier Monsieur le Dr. Yves Chapleur, directeur du groupe SUCRES, qui m'a donné l'occasion de vivre cette expérience en m'accueillant au sein de son laboratoire.

Mes plus grandes gratitudes vont également à Madame le Professeur Dominique Laurain-Mattar, ma directrice de thèse, pour m'avoir prise en main, et m'a transmis avec passion ses connaissances et avec qui j'ai partagé mes lots de joies et de peines quotidiennes. Ses encouragements, ses conseils et son attention m'ont permis de mener ces études doctorales dans les meilleures conditions.

Je suis tout particulièrement reconnaissante au Professeur Max Henry, pour tous ses conseils relatifs au projet et à la recherche en général, et pour tous les bons moments partagés au cours de ces années.

Messieurs Roger Lteif, Professeur associé à la faculté des sciences à l'Université Saint Joseph-Beyrouth, et François Tillequin, Professeur à l'Université Paris Descartes et chef de service de Pharmacognosie et Chimie des Substances Naturelles, qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, et je les en remercie, de même que pour leur participation au Jury, et je leur en suis très reconnaissante.

Les travaux présentés n'auraient probablement pu aboutir sans la collaboration des chercheurs, Messieurs le Professeur Frédéric Bourgaud, le Dr. Alain Hehn, du laboratoire Agronomie et Environnement UMR 1121-INPL-INRA-ENSAIA; le Dr. Michel Boisbrun, le Dr. Jean-Pierre Jolie et le Dr. Françoise Chrétien du groupe SUCRES; le Dr. Agata Ptak de l'Université de Cracovie; et le Dr. Catherine Guillou de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN).

Mes plus grands remerciements vont à Monsieur l'ingénieur François Dupire pour la compétence, la gentillesse et la patience qu'il a manifestées à mon égard durant cette thèse, pour tous les conseils et les analyses chromatographiques qu'il a bien voulu me fournir.

Je remercie vivement tous les anciens et actuels stagiaires et thésards, surtout Céline, Ismael, Charlotte, Tsvetelina, Tanya, Fany, Simon et Sakina, avec qui nous avons travaillé dans la bonne humeur et qui ont effectué une partie des manipulations lors de leur stage de BTS, SIR, Master et ERASMUS, et aux autres membres du laboratoire et chercheurs étrangers de passage, avec qui nous avons beaucoup échangé.

Je passe ensuite une dédicace spéciale à tous les jeunes gens que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant ces quelques années à Nancy, à savoir les frères Chadi, Jihad et Edward Ghaoui, Rana El Zein, Nicole El Zoghbi et Père Sayed Marroun. Un grand bonjour à la famille Mattar, à Salem Hannoun, et à mes très chers cousins Elias et Mario Tahchi pour leurs encouragements et le soutien sans faille qu'ils ont su m'apporter durant mon séjour en France.

Pour l'encouragement et l'assistance aussi bien matérielle que morale qui m'ont permis de faire cette thèse dans de bonnes conditions, je remercie chaudement Mr. Hussein Machmouchi et sa compagnie New Nouvelle Pharm qui a financé une bonne partie de mes études.

Je tiens à remercier chaleureusement Dr. Bilél Nefzi (Billy) pour son humour, son soutien, sa patience, sa tolérance, sa sollicitude et pour tous les moments magiques et les aventures que nous avons partagés.

J'adresse un grand merci à toute ma famille qui a toujours été présente lorsque j'en ai eu besoin, en particulier à ma sœur, à mon frère, à mon père et à ma mère.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2,4-D : acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique

ACC : L'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC)

AChE : Enzyme acétylcholinestérase

ANA : L'acide naphthalène acétique

BAP : 6-benzylaminopurine (ou benzyladénine)

BME : β -mercaptoéthanol

BSA : Boeuf sérum albumine

ChanB : Canal B de la lampe UV (280 nm)

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

CLHP-UV : CLHP couplée à un détecteur UV

CoA : Coenzyme A

CYP : Cytochrome P450

D3ISO : Isovanilline deutérée

D3MN : 4'-O-méthylnorbelladine deutérée

EDTA : Ethylène diamine tétraacétate

eV : electron-Volt

GCMS : Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

GD3 : Galanthamine deutérée

HPTLC-MS : Chromatographie sur couche mince couplée à la spectrométrie de masse, High
Pressure Thin Layer Chromatography coupled to Mass Spectrometry

Inh : Inhibition

LCMS : Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse

LD2 : Lycorine deutérée

LDD : Limite de détection

MeJa : Méthyljasmonate

MeOH : Méthanol

MF : Matière Fraîche

MS : Matière Sèche

MS30 : Milieu Murashige & Skoog additionné de 30 g/L de saccharose

MS60 : Milieu Murashige & Skoog additionné de 60 g/L de saccharose

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

R_F : Facteur de rétention

STS : Thiosulfate d'argent (Silver Thiosulfate)

SAM : S-adenosyl méthionine

TEAA : Tampon d'acétate de triéthylammonium

TEG : Tétraéthylèneglycol

Tr : Temps de rétention

U : Ultrasons

UHQ : Ultra Haute Qualité

UV : Ultra Violet

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	1
OBJECTIFS	5
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
A - MALADIE D'ALZHEIMER ET TRAITEMENTS	8
1. Traitements de la maladie d'Alzheimer	10
a. Les traitements des troubles psychocomportementaux :	10
b. Les traitements des troubles cognitifs :	10
2. Médicaments d'origine naturelle utilisés dans le traitement de la maladie d'Alzheimer	11
B - LA FAMILLE DES AMARYLLIDACEAE	13
1. <i>Lycoris</i> :	14
2. <i>Galanthus</i> :	15
3. <i>Leucojum</i> :	15
4. <i>Narcissus</i> :	16
5. <i>Pancreatum</i> :	19
C - LES ALCALOÏDES	20
1. Définition des alcaloïdes	20
2. Classification des alcaloïdes	20
3. Les alcaloïdes des Amaryllidaceae.....	22
a. La lycorine :	22
b. La galanthamine :	22
4. Intérêt des alcaloïdes en thérapeutique.....	24
D - ACTIVATION DU METABOLISME ALCALOÏDIQUE EN CULTURE <i>IN VITRO</i>	25
1. Obtention des alcaloïdes par les cultures <i>in vitro</i>	25
2. La culture <i>in vitro</i>	26
a. Influence des constituants de base du milieu de culture.....	29
i. Les sels minéraux	29
ii. Les régulateurs de croissance	30
iii. Le saccharose.....	31
b. Influence de l'éthylène.....	32
c. Activation du métabolisme alcaloïdique par élicitation	34
E - VOIE DE BIOSYNTHESE DES ALCALOÏDES DES AMARYLLIDACEAE.....	36
1. Modes de couplage intramoléculaire de la 4'-O-méthyl-norbelladine	36
2. L'utilisation des précurseurs de biosynthèse	40
3. Rôle et localisation des enzymes et des Cytochromes P450 dans la synthèse des alcaloïdes des Amaryllidaceae	42
MATERIELS ET METHODES	46
1. Obtention du matériel chimique	47
a. Obtention de l'isovanilline-d ₃ et de la 4'-O-méthyl-d ₃ -norbelladine	47
b. Obtention de la galanthamine deutérée et de la déméthyl-narwédine native.....	47
2. Obtention du matériel végétal.....	48
3. La culture <i>in vitro</i> des Amaryllidaceae.....	50
a. Préparation et stérilisation des explants	50
b. Mise en culture des explants	51
c. Composition des milieux de culture.....	52
d. Stérilisation et préparation des milieux de culture et du matériel expérimental	53
e. Optimisation du milieu de culture.....	53
f. Ajout du saccharose et des phytorégulateurs.....	55
g. Ajout des précurseurs, inhibiteurs ou capteurs de l'éthylène aux cultures <i>in vitro</i> de <i>L. aestivum</i>	56
h. Ajout du méthyljasmonate aux cultures de cals et de bulbilles <i>in vitro</i> de <i>L. aestivum</i>	56
i. Ajout de la 4'-O-méthyl-d ₃ -norbelladine aux cultures de cals de <i>L. aestivum</i>	57
j. Ajout des précurseurs deutérés aux cultures <i>in vitro</i> de bulbes de <i>L. aestivum</i>	57
4. Etude phytochimique et dosage des alcaloïdes des tissus <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> d'Amaryllidaceae..	58
a. Méthode d'extraction des alcaloïdes des Amaryllidaceae.....	58
b. Analyses des alcaloïdes par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	59
c. Analyses des alcaloïdes par chromatographie liquide à haute résolution couplée à la spectrométrie de masse électrospray (LC/ESI-MS et LC/ESI-HRMS)	61
d. Analyses des alcaloïdes par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GCMS).....	62
e. Chromatographie sur couche mince couplée à la spectrométrie de masse (TLC-MS).....	64

5.	Test enzymatique et mesure du pourcentage d'inhibition de l'AcHe.....	65
6.	Extraction des microsomes des plantes d'Amaryllidaceae.....	67
RESULTATS ET DISCUSSION		68
CHAPITRE I.		
MISES AU POINT ET VALIDATION DES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES		69
A -	CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLEE A L'UV (HPLC-UV)	69
1.	Choix de la phase mobile et du gradient d'éluion pour la méthode HPLC	69
2.	Validation du dosage par HPLC.....	71
a.	Proportionnalité et exactitude de la méthode	72
b.	Limite de détection et de quantification	73
B -	CHROMATOGRAPHIES COUPLEES A LA SPECTROMETRIE DE MASSE	74
1.	Caractéristiques et validation du programme d'analyses LCMS.....	76
a.	Proportionnalité et exactitude de la méthode	76
b.	Limite de détection et de quantification	77
2.	Caractéristiques et validation du programme d'analyses GCMS	79
a.	Proportionnalité et exactitude de la méthode	79
b.	Limite de détection et de quantification	80
c.	Criblage et identification des alcaloïdes.....	80
3.	HPTLC-MS Chromatographie sur couche mince couplée à la spectrométrie de masse	85
C -	CONCLUSION DU CHAPITRE	87
CHAPITRE II.		
EFFET DU SACCHAROSE ET DES PHYTOREGULATEURS SUR L'ORGANOGENESE ET LE METABOLISME DES ALCALOÏDES		89
A -	OPTIMISATION DU MILIEU DE CULTURE DE <i>N. PSEUDONARCISSUS</i> POUR L'INDUCTION D'UNE ORGANOGENESE	89
1.	Plan d'expérience	89
2.	Choix de quatre facteurs influençant l'organogenèse.....	90
a.	Les deux phytorégulateurs utilisés (2,4-D et BAP).....	92
b.	Saccharose et charbon.....	92
3.	Évaluation des réponses : survie, callogenèse et organogenèse	93
a.	Taux de survie.....	93
b.	Taux de callogenèse.....	93
c.	Taux d'organogenèse	94
4.	Conclusion partielle	97
B -	INFLUENCES DU SACCHAROSE ET DES PHYTOREGULATEURS SUR LE METABOLISME DES ALCALOÏDES DES AMARYLLIDACEAE	98
1.	Influence sur la diversité des alcaloïdes	99
a.	Effet du saccharose	99
b.	Effet des phytorégulateurs	101
2.	Influence sur l'accumulation de la galanthamine et sur l'activité biologique	103
a.	Analyses des extraits de <i>G. elwesii</i>	103
b.	Analyses des extraits de <i>N. pseudonarcissus</i>	105
c.	Analyses des extraits de <i>L. aestivum</i>	107
3.	Conclusion partielle	108
C -	CONCLUSION DU CHAPITRE	110
CHAPITRE III.		
INDUCTION DE LA SYNTHESE ALCALOÏDIQUE PAR DES AGENTS EXOGENES		112
A -	EFFET DE L'AJOUT DU PRECURSEUR, INHIBITEUR ET CAPTEUR D'ETHYLENE	112
1.	Impact sur la morphogenèse des tissus <i>in vitro</i>	113
2.	Impact sur la diversité des alcaloïdes	117
3.	Impact sur l'accumulation de la galanthamine et de la lycorine	120
4.	Conclusion partielle	124
B -	EFFET DE L'AJOUT DU METHYLJASMONATE (MeJA) SUR L'ELICITATION DE LA BIOSYNTHESE	125
1.	Mise en place de l'expérience	126
2.	Application du MeJa aux cultures de cals	129
a.	Mesure de l'accumulation de la galanthamine et de la lycorine par HPLC.....	129
b.	Mesure de l'accumulation de la galanthamine et de la lycorine par LCMS	131
c.	Comparaison des deux méthodes d'analyses	132
d.	Conclusion partielle	133

3.	Application du MeJa aux cultures de bulbilles <i>in vitro</i>	134
a.	Mesure de l'accumulation de la galanthamine et de la lycorine par HPLC.....	134
b.	Mesure de l'accumulation de la galanthamine et de la lycorine par LCMS	136
c.	Comparaison des deux méthodes d'analyses	138
d.	Conclusion partielle	140
C-	CONCLUSION DU CHAPITRE	142
CHAPITRE IV.		
BIOTRANSFORMATION DES PRECURSEURS DEUTERES		
A -	SYNTHESE DES PRECURSEURS DEUTERES	144
B -	EFFET DE L'AJOUT DE LA 4'-O-METHYL-D₃-NORBELLADINE AUX SUSPENSIONS CELLULAIRES DE <i>L. AESTIVUM</i>	145
1.	Impact de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine sur la croissance des suspensions cellulaires	147
2.	Incorporation de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes .	148
a.	Analyses des extraits par HPLC :	149
b.	Analyses des extraits par GCMS :	150
c.	Analyses des extraits par LC-HRMS :	153
3.	Incidence de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine sur les teneurs en galanthamine et en lycorine.	154
4.	Conclusion partielle	155
C -	EFFET DE L'AJOUT DE LA 4'-O-METHYL-D₃-NORBELLADINE AUX CULTURES DE BULBILLES <i>IN VITRO</i> DE <i>L. AESTIVUM</i>	156
1.	Impact de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine sur la croissance des bulbilles <i>in vitro</i>	158
2.	Incorporation de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes .	160
3.	Incidence de l'ajout de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine sur les teneurs en galanthamine et en lycorine.	165
a.	Suivi de la diffusion de la 4'-O-méthyl-d ₃ -norbelladine	165
b.	Métabolisation de la 4'-O-méthyl-d ₃ -norbelladine en galanthamine et lycorine deutérées	167
c.	Influence de l'ajout de la 4'-O-méthyl-d ₃ -norbelladine sur l'accumulation de la galanthamine et de la lycorine natives.....	171
4.	Conclusion partielle	174
D -	EFFET DE L'AJOUT DE L'ISOVANILLINE-D₃ (3-HYDROXY-4-METHOXY-D₃-BENZALDEHYDE) AUX CULTURES DE BULBILLES <i>IN VITRO</i> DE <i>L. AESTIVUM</i>	176
1.	Impact de l'isovanilline-d₃ (D3ISO) sur la croissance des bulbilles <i>in vitro</i>	177
2.	Incorporation de l'isovanilline-d₃ dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes	179
3.	Incidence de l'ajout de l'isovanilline-d₃ sur les teneurs en galanthamine et en lycorine	183
4.	Conclusion partielle	185
E -	CONCLUSION DU CHAPITRE	186
CHAPITRE V.		
IDENTIFICATION D'UNE ENZYME CLE INTERVENANT DANS LA VOIE DE BIOSYNTHESE DE LA GALANTHAMINE		
A -	MISE EN PLACE DU PROTOCOLE D'EXTRACTION DES MICROSOMES	189
B -	MISE EN PLACE DU PROTOCOLE D'INCUBATION AVEC LE NADPH	191
C -	RESULTATS DE LA METABOLISATION DU PRECURSEUR PAR LES MICROSOMES	192
D -	CONCLUSION DU CHAPITRE	203
CHAPITRE VI.		
ÉTUDE PHYTOCHIMIQUE DES ALCALOÏDES DE QUELQUES AMARYLLIDACEAE PROVENANT DU LIBAN		
A -	ANALYSES PAR HPTLC	205
B -	ANALYSES PAR GCMS :	209
C -	CONCLUSION DU CHAPITRE	216
CONCLUSION GENERALE		
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		
ANNEXES		
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES		

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Mode d'action de la galanthamine : Inhibition de l'AChE, modulation allostérique des récepteurs nicotiniques et correction du déficit cholinergique.	9
Figure 2 : Structure chimique du donépézil.	10
Figure 3 : Structure chimique de l'hupérezine A.	11
Figure 4 : Répartition mondiale des plantes Amaryllidaceae.	14
Figure 5: a) <i>Lycoris chinensis</i> b) <i>Lycoris radiata</i> , c) <i>Galanthus elwesii</i> , d) <i>Leucojum aestivum</i> , e) <i>Leucojum vernum</i> (récoltée à la forêt de Deuille, Meurthe et Moselle, France), f) <i>Narcissus pseudonarcissus</i> , g) <i>Narcissus poeticus</i> « double », h) <i>Pancratium maritimum</i> , i) graines de <i>Pancratium maritimum</i>	18
Figure 6: Le <i>Pancratium</i> , un motif fréquent des murs peints, fresques et timbres. a) Fresques de la période minoène ; b) Photo des fresques prise à Europa park (Rust Allemagne) ; c) Timbre oblitéré à Nantes le 12 septembre 1992.	19
Figure 7: Biosynthèse des alcaloïdes (Tadeusz Aniszewski, 2007).	21
Figure 8 : Voie de biosynthèse des alcaloïdes chez <i>Narcissus</i> (Amaryllidaceae) d'après Bastida et Viladomat (2002).	23
Figure 9 : Structure du méthyljasmonate (MeJa).	35
Figure 10 : Biosynthèse de la <i>O</i> -méthylnorbelladine chez les Amaryllidaceae (Richter G, 1993).	37
Figure 11 : Voie de biosynthèse des alcaloïdes chez <i>Narcissus</i> (Amaryllidaceae) d'après Bastida et Viladomat (2002) (Lopez <i>et al.</i> , 2002).	39
Figure 12: Voie de biosynthèse de la galanthamine selon Tadeusz Aniszewski (Tadeusz Aniszewski, 2007).	43
Figure 13 : Voie de biosynthèse de la galanthamine chez <i>L. aestivum</i> d'après Eichhorn <i>et al.</i> , 1998, et Tadeusz Aniszewski, 2007.	45
Figure 14 : Bulbes de <i>Leucojum aestivum</i> L. achetés dans le commerce (Graines Baumaux, Nancy).	48
Figure 15 : Bulbes des espèces d'Amaryllidaceae provenant du Liban. a) <i>Pancratium maritimum</i> récoltée à la plage de Jyeh au Chouf; b) <i>Narcissus poeticus</i> récoltée à Barty (à 500 m d'altitude à l'Est de Saïda, capitale du Sud) ; c) <i>Narcissus tazetta</i> récoltée à la réserve de Tyr (Liban Sud).	49
Figure 16 : Carte du Liban avec en rouge, les régions où les espèces d'Amaryllidaceae ont été récoltées.	49
Figure 17 : Séparation des parties centrales les moins différenciées, cibles pour la culture <i>in vitro</i> des tissus d'Amaryllidaceae.	50
Figure 18 : Etapes de stérilisation des explants. a) Contact pendant 30 s avec l'éthanol 70 % ; b-c) Agitation pendant 10 min dans une solution de Domestos [®] /eau distillée (50 mL/250 mL).	51
Figure 19 : a) Rinçage par 3 bains successifs d'eau stérile ; b) Mise en culture des explants (3-5 mm) sur milieu solide.	52

Figure 20: Protocole d'extraction méthanolique des alcaloïdes à partir des plantes <i>in vivo</i> , ou des cultures <i>in vitro</i> et de leur milieu de culture.	59
Figure 21 : Appareil HPTLC semi-automatique (CAMAG Linomat 5) et Interface de couplage à la spectrométrie de masse « CAMAG TLC-MS Interface ».....	64
Figure 22: Le test Ellman établi pour mesurer le pouvoir inhibiteur des alcaloïdes vis-à-vis de l'AChE.	66
Figure 23: Variation de la concentration du solvant B (acétonitrile pur + 30 % du solvant A) durant 26 min d'analyse par HPLC.....	70
Figure 24 : Chromatogramme HPLC montrant la séparation des étalons de lycorine (Tr = 6,9 min), galanthamine (Tr = 14,5 min), et 4'-O-méthyl-d ₃ -norbelleadine (D3MN) (Tr = 11 min). 71	
Figure 25: Courbes d'étalons de la galanthamine, de la lycorine et de la 4'-O-méthyl-d ₃ -norbelleadine (D3MN), obtenues par HPLC.	72
Figure 26: Eléments constitutifs d'un spectromètre de masse.	74
Figure 27 : Représentation graphique de la mesure de résolution à 50 % de vallée.....	75
Figure 28: Calibration de la colonne LCMS et courbes étalons de la galanthamine, de la lycorine et de la 4'-O-méthyl-d ₃ -norbelleadine (D3MN).	77
Figure 29 : Spectres de masse de la galanthamine ([M+H] ⁺ , m/z = 288,1568), de la lycorine ([M+H] ⁺ , m/z = 288,1203) et de la 4'-O-méthyl-d ₃ -norbelleadine ([M+H] ⁺ , m/z = 277,1634) obtenus par LCMS en mode d'ionisation positif.	78
Figure 30: Courbes de calibration en GCMS de la galanthamine (Tr = 22,7 min.) et de la lycorine (Tr = 26,3 min.) en mode semi-quantitatif.....	79
Figure 31: Courbes de calibration en GCMS de la galanthamine (Tr = 22,7 min) et de la lycorine (Tr = 26,3 min) en mode SIM.	80
Figure 32 : Chromatogramme GCMS des étalons de galanthamine (Tr = 22,80 min) et de lycorine (Tr = 26,35 min).....	81
Figure 33 : Spectres de masse de la galanthamine standard (286(100) ; 287(83), 216 (31)) identifiée dans la librairie NIST08.LIB, et par GCMS en mode « full scan ».	82
Figure 34 : Spectres de masse de la lycorine standard (226(100) ; 227 (80), 287(27)), identifiée dans la librairie NIST08.LIB, et par GCMS en mode « full scan ».	83
Figure 35 : Chromatogramme et spectre de masse GCMS de la 4'-O-méthyl-d ₃ -norbelleadine (140(100) ; 169 (32)).....	84
Figure 36 : Différents types de développements cellulaires obtenus après 5 mois de culture d'explants de <i>Narcissus</i>	94
Figure 37 : Bulbilles <i>in vitro</i> des trois espèces d'Amaryllidaceae: a) <i>Leucojum aestivum</i> , b) <i>Narcissus pseudonarcissus</i> , c) <i>Galanthus elwesii</i>	98
Figure 38 : Pouvoirs inhibiteurs de l'AChE des extraits des bulbes <i>in vivo</i> des Amaryllidaceae.....	104
Figure 39 : Pourcentages d'accumulation de la galanthamine et d'activité antiAChE dans les extraits <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> de <i>G. elwesii</i> . A : en fonction des différentes concentrations de saccharose ajoutées au milieu de culture MSA ; B : en fonction des régulateurs de croissance ajoutés au milieu de culture MSB.	104

Figure 40 : Pourcentages d'accumulation de la galanthamine et d'activité antiAChE dans les extraits <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> de <i>N. pseudonarcissus</i> . A : en fonction des différentes concentrations de saccharose ajoutées au milieu de culture MSA ; B : en fonction des régulateurs de croissance ajoutés au milieu de culture MSB.	105
Figure 41 : Chromatogrammes GCMS des extraits de bulbes <i>in vivo</i> de <i>N. pseudonarcissus</i> (A) et de tissus <i>in vitro</i> (B) cultivés sur MSA + 30 g/L de saccharose. Trisphéridine (1); Crinine (2); Anhydrolycorine (3); Galanthamine (4); Narwédine (5) et Déméthylmarithidine (6)....	106
Figure 42 : Pourcentages d'accumulation de la galanthamine et d'activité antiAChE dans les extraits <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> de <i>L. aestivum</i> . A : en fonction des différentes concentrations de saccharose ajoutées au milieu de culture MSA ; B : en fonction des régulateurs de croissance ajoutés au milieu de culture MSB.	107
Figure 43 : Les cals de <i>L. aestivum</i> cultivés en présence de: a) 25 µM piclorame + 0,5 µM BAP (contrôle), <i>bar</i> = 2 cm ; b), c) 25 µM piclorame + 0,5 µM BAP, KMnO ₄ , <i>bar</i> = 1,5 cm ; d) 25 µM piclorame + 0,5 µM BAP + 10 µM AgNO ₃ , <i>bar</i> = 2 cm ; e) 25 µM piclorame + 0,5 µM BAP + 10 µM STS, <i>bar</i> = 2 cm ; f) 25 µM piclorame + 0,5 µM BAP + 10 µM ACC, <i>bar</i> = 1 cm.....	116
Figure 44: Chromatogrammes obtenus par analyses GCMS des extraits de : (a) bulbes <i>in vivo</i> de <i>Leucojum aestivum</i> ; (b) cals cultivés en présence du KMnO ₄ ; (c) cals contrôles. Les numéros des pics correspondent aux alcaloïdes : 1: Trisphéridine, 2: Galanthamine, 3: Narwédine, 4: Crinine, 5: Déméthylmarithidine, 6: Anhydrolycorine, 7: Lycorine.....	120
Figure 45 : Évolution du pourcentage de la galanthamine en fonction du temps de culture et de l'ajout des agents exogènes (ACC, STS, AgNO ₃ , KMnO ₄).....	123
Figure 46 : Structure du méthyljasmonate (MeJa).	125
Figure 47: Préparation des incubations des cals embryogènes de <i>Leucojum aestivum</i> avec différentes concentrations de MeJa (0, 50, 100, 150, 200 et 300 µM).....	126
Figure 48: Protocole d'incubation du MeJa dans les cals de <i>Leucojum aestivum</i>	127
Figure 49: Préparation des incubations des bulbilles <i>in vitro</i> de <i>Leucojum aestivum</i> avec différentes concentrations de MeJa.	127
Figure 50: Protocole d'incubation du MeJa chez les bulbilles <i>in vitro</i> de <i>Leucojum aestivum</i>	128
Figure 51 : Dosages par HPLC des teneurs en galanthamine (A) et en lycorine (B) dans les extraits des cals <i>in vitro</i> incubés avec différentes concentrations de MeJa.	130
Figure 52 : Pourcentages de galanthamine et de lycorine dans les extraits (A et C) et les milieux de culture <i>in vitro</i> de cals (B et D) de <i>Leucojum aestivum</i> analysés par LCMS.....	131
Figure 53 : Pourcentages de la galanthamine (A) et de la lycorine (B) obtenus par HPLC, dans les extraits de bulbilles <i>in vitro</i> traités pendant 10 h avec différentes concentrations de MeJa (0, 50, 100 et 150 µM).	135
Figure 54 : Pourcentages de la galanthamine (AB) et de la lycorine (CD) obtenus par LCMS, dans les extraits et les milieux de culture des bulbilles <i>in vitro</i> , incubés pendant 10 h avec différentes concentrations de MeJa.	136
Figure 55 : Chromatogrammes obtenus par HPLC de la galanthamine (Tr = 15,1 min) et d'un extrait de bulbilles <i>in vitro</i> de <i>L. aestivum</i> incubé pendant 10 h avec 150 µM de MeJa.	138

Figure 56 : Chromatogrammes obtenus par LCMS d'un extrait de bulbilles <i>in vitro</i> de <i>L. aestivum</i> incubé pendant 10 h avec 150 µM de MeJa. a) Spectre de masse de la lycorine (Tr = 23,5 min ; m/z = 288,1254 [M+H] ⁺) ; b) spectre de masse de la galanthamine (Tr = 32,9 min ; m/z = 288,1546 [M+H] ⁺) ; c) spectre de masse du méthyljasmonate (Tr = 35,4 min ; m/z = 225,1515 [M+H] ⁺).....	139
Figure 57 : Synthèse de l'isovanilline-d ₃ et de la 4'-O-méthyl-d ₃ -norbelleadine. Réactifs et conditions: (i) CD ₃ I, K ₂ CO ₃ ; (ii) Tyramine, tamis moléculaire; (iii) NaBH ₄ ; (iv) HCl.....	144
Figure 58: Cals embryogènes de <i>Leucojum aestivum</i> initiés sur milieu MS30 + 25 µM piclorame + 0,5 µM BAP.....	145
Figure 59 : Protocole expérimental de l'ajout de la 4'-O-méthyl-d ₃ -norbelleadine aux cultures <i>in vitro</i> de cals de <i>L. aestivum</i>	146
Figure 60: Effet de l'ajout de la 4'-O-méthyl-d ₃ -norbelleadine sur la croissance des suspensions cellulaires de <i>Leucojum aestivum</i> L. après 14 et 28 jours de culture.....	147
Figure 61 : Chromatogrammes des extraits de cals et de leur milieu de culture après 14 et 28 jours de culture en présence du précurseur deutéré (D3MN : Tr = 11 min).	149
Figure 62 : Chromatogramme par GCMS d'un extrait des suspensions cellulaires (A) et du milieu de culture (B) incubés pendant 28 jours en présence de 0,07.10 ⁻³ g/L D3MN. 1 : Anhydrolycorine-d ₃ (Tr = 23,21 min, m/z = 253,10 [M+]) ; 2 : Crinine (Tr = 24,14 min, m/z = 271,15 [M+]).....	151
Figure 63: Chromatogramme et spectre de masse par GCMS de la 4'-O-méthyl-d ₃ -norbelleadine standard (Tr = 24,5 min ; m/z = 140 [M+]).....	152
Figure 64 : Chromatogrammes et spectres de masse de la 4'-O-méthyl-d ₃ -norbelleadine (Tr = 31,1 min ; m/z = 140,07 [M+H] ⁺) détectée dans les suspensions cellulaires (A) et dans le milieu de culture (B) incubés pendant 28 jours en présence de 0,07.10 ⁻³ g/L D3MN.....	153
Figure 65: Cultures <i>in vitro</i> de bulbilles de <i>L. aestivum</i> . a-b) bulbilles <i>in vitro</i> de <i>Leucojum aestivum</i> . c) Ensemble des incubations des bulbilles avec le précurseur deutéré maintenus sous agitation orbitale (150 rpm).	156
Figure 66 : Des cultures témoins et trois répétitions pour chaque concentration de précurseur deutéré.	157
Figure 67: Protocole expérimental de l'ajout de la 4'-O-méthyl-d ₃ -norbelleadine aux cultures <i>in vitro</i> de bulbilles de <i>L. aestivum</i>	157
Figure 68: Effet de l'ajout de 4'-O-méthyl-d ₃ -norbelleadine sur la croissance des bulbilles <i>in vitro</i> de <i>Leucojum aestivum</i> L., après 15, 30 et 40 jours de culture avec 0,05 ; 0,1 et 0,2 g/L de D3MN.....	158
Figure 69 : Alcaloïdes deutérés après ajout de la 4'-O-méthyl-d ₃ -norbelleadine dans le milieu de culture.....	164
Figure 70: Suivi de la diffusion du D3MN du milieu de culture (A) dans les tissus <i>in vitro</i> (B) durant 40 jours de culture.....	166
Figure 71 : Spectres de masse de la galanthamine native (A) et deutérée (B) obtenus en LC-HRMS en mode positif [M+H] ⁺ et [M+Na] ⁺	168
Figure 72 : Pourcentages de galanthamine et de lycorine deutérées dans les extraits de bulbilles <i>in vitro</i> et de leur milieu de culture en fonction des concentrations de D3MN.....	169

Figure 73 : Pourcentages de galanthamine et de lycorine natives détectées dans les extraits de bulbilles <i>in vitro</i> et de leur milieu de culture en fonction des concentrations de D3MN.....	172
Figure 74 : Protocole expérimental de l'ajout de l'isovanilline deutérée aux cultures <i>in vitro</i> de bulbilles de <i>L. aestivum</i>	176
Figure 75 : Effet de l'ajout de l'isovanilline-d ₃ (D3ISO) sur la croissance des bulbilles <i>in vitro</i> de <i>Leucojum aestivum</i> L., après 15, 30 et 40 jours de culture avec 0,05 ; 0,1 et 0,2 g/L de D3ISO.....	177
Figure 76: Aspects des bulbilles <i>in vitro</i> cultivés pendant 40 jours de culture en absence d'isovanilline-d ₃ (D3ISO) et en présence de 0,2 g/L de D3ISO.	178
Figure 77 : Pourcentages de la galanthamine et de la lycorine natives dans les extraits de bulbilles <i>in vitro</i> et de leur milieu de culture en fonction des concentrations diverses de D3ISO.....	184
Figure 78 : Voie de biosynthèse de la galanthamine chez <i>L. aestivum</i> d'après Eichhorn <i>et al.</i> , 1998, et Tadeusz Aniszewski, 2007.	188
Figure 79 : Chromatogrammes correspondant aux pics du D3MN détectés dans les échantillons analysés en LCMS.	197
Figure 80 : Migration sur plaque TLC des solutions d'incubation des microsomes avec le précurseur deutéré, en présence et en l'absence du NADPH. a) Révélation par le Dragendorff, b) lecture sous lumière fluorescente à 254 nm, c) lecture sous lumière UV à 365 nm, d) taches analysées en LCMS après le couplage avec l'interface CAMAG. 1 : Ajout du NADPH, 2 : absence de NADPH, 3 : microsomes contrôles. (U) : Exposition aux ultrasons.	200
Figure 81 : Réaction chimique de la transformation de la <i>N</i> -déméthylnarwédine en norgalanthamine (base de données KEGG, réaction R08442).....	202
Figure 82 : Voie de biosynthèse de la galanthamine. 2.1.1. : Enzymes méthyltransférases, 1.1.1. : Enzymes oxydoréductases dépendantes du NADPH. (Base de données KEGG, réaction R08442).....	202
Figure 83 : a) Bulbe <i>in vivo</i> de <i>P. maritimum</i> lyophilisé. b) Tiges <i>in vivo</i> de <i>N. poeticus</i> lyophilisées. c) Graines de <i>P. maritimum</i> . d) Bulbes de <i>P. maritimum</i> broyés. e) Tiges de <i>N. poeticus</i> broyées.	204
Figure 84 : Tubes Falcon contenant des broyats des différents organes de <i>Pancratium maritimum</i> et 10 mL de méthanol.	205
Figure 85 : Plaques de silice sur lesquelles ont été déposés les extraits d'organes de <i>P. maritimum</i> , A : Révélation par le réactif de Dragendorff ; B : Observation sous lampe UV (365 nm) après les deux migrations successives décrites par Ingkaninan <i>et al.</i> , 2000.	206
Figure 86 : Plaques de silice sur lesquelles ont été déposés les extraits d'organes de <i>N. tazetta</i> et <i>N. poeticus</i> , A : Révélation par le réactif de Dragendorff ; B : Observation sous lampe UV (365 nm) après les deux migrations successives décrites par Ingkaninan <i>et al.</i> , 2000.	207
Figure 87 : Chromatogrammes, par GCMS, des extraits alcaloïdiques des différentes parties de <i>P. maritimum</i>	211

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Matrice de Doehlert pour les quatre variables (saccharose, BAP, 2,4-D et charbon), incluant quatre expériences au centre du domaine (n° 21 à 24).....	54
Tableau 2: Gradient d'élution LCMS adapté à la séparation des alcaloïdes des Amaryllidaceae.....	61
Tableau 3 : Quelques alcaloïdes criblés par GCMS et répertoriés dans la littérature.	63
Tableau 4: Gradient d'élution HPLC adapté à la séparation des alcaloïdes des Amaryllidaceae.	70
Tableau 5 : Les aires des pics obtenus lors d'injection de 0,2 g/L de chacun des standards. ..	73
Tableau 6 : Estimations des ratios en fonction des 4 facteurs (saccharose, BAP, 2,4-D et charbon). Équations du type $Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j$	95
Tableau 7: Criblage par GCMS des extraits de culture <i>in vitro</i> d'Amaryllidaceae cultivés sur le milieu basal (MSA) additionné de différentes concentrations de saccharose (30, 60, 90, et 120 g/L).	100
Tableau 8: Criblage par GCMS des extraits de culture <i>in vitro</i> d'Amaryllidaceae cultivés sur le milieu basal (MSB) additionné de différents types de phytorégulateurs (2,4-D; ANA et piclorame).....	102
Tableau 9: Bulbes <i>in vivo</i> et cultures <i>in vitro</i> de <i>Leucojum aestivum</i> établies en présence du précurseur (ACC), d'inhibiteurs (STS et AgNO ₃) ou du capteur (KMnO ₄) d'éthylène.	112
Tableau 10: Effets de l'ajout du précurseur (ACC), des inhibiteurs (STS et AgNO ₃) et d'un capteur d'éthylène (KMnO ₄) sur la formation des cals embryogènes chez les cultures <i>in vitro</i> de <i>L. aestivum</i>	113
Tableau 11: Effets de l'ajout du précurseur (ACC), des inhibiteurs (STS et AgNO ₃) et d'un capteur d'éthylène (KMnO ₄) sur la formation des embryons somatiques chez les cultures <i>in vitro</i> de <i>L. aestivum</i>	115
Tableau 12: Production d'éthylène par les cals et les embryons somatiques de <i>L. aestivum</i> , mesurée après 4 semaines de culture.....	115
Tableau 13: Alcaloïdes identifiés par GCMS en mode "full scan", dans les bulbes <i>in vivo</i> et les cals <i>in vitro</i> de <i>Leucojum aestivum</i> obtenus dans les différentes conditions de culture... ..	118
Tableau 14: Pourcentages de galanthamine et de lycorine dans les extraits de bulbes <i>in vivo</i> et des cals <i>in vitro</i> de <i>Leucojum aestivum</i> après 6 semaines de culture (LDD = 2.10 ⁻⁴ %).	121
Tableau 15: Effets de l'éthylène sur l'accumulation de la galanthamine dans les bulbes <i>in vivo</i> et les cals <i>in vitro</i> de <i>L. aestivum</i> après 4 mois de culture.	122
Tableau 16 : Concentrations en galanthamine et en lyocrine natives et deutérées mesurées en LC-HRMS dans les extraits des suspensions cellulaires de <i>L. aestivum</i>	154
Tableau 17 : Criblage par GCMS des alcaloïdes natifs et deutérés dans les extraits de bulbilles <i>in vitro</i> et de leur milieu de culture. D3MN : 4'-O-méthyl-d ₃ -norbelleadine, NAR : narwédine, GAL : galanthamine, LYC : lycorine, CRI : crinine, TRIS : trispériidine, MAR : marithidine. (+/- : présence ou absence d'alcaloïdes natifs ; D2/D3 : présence d'alcaloïdes deutérés avec 2 ou 3 atomes de deutérium).	162
Tableau 18 : Criblage par GCMS des alcaloïdes natifs et deutérés dans les extraits de bulbilles <i>in vitro</i> et de leur milieu de culture incubés en présence de l'isovanilline-d ₃ (D3ISO). NAR :	

narwédine, GAL : galanthamine, LYC : lycorine, CRI : crinine, TRIS : trisphéridine, MAR : marithidine. (+/- : présence ou absence d'alcaloïdes natifs ; D2/D3 : présence d'alcaloïdes deutérés avec 2 ou 3 atomes de deutérium)..... 180

Tableau 19 : Criblage par GCMS des alcaloïdes natifs et deutérés détectés dans les solutions d'incubation des microsomes selon plusieurs paramètres (Temps d'incubation, pH, et présence et absence du NADPH). GAL : galanthamine, LYC : lycorine, CRI : crinine, TRIS : trisphéridine, MAR : marithidine, D3MN : 4'-O-méthyl-d₃-norbelleadine. (+/- : présence ou absence d'alcaloïdes natifs ; D2/D3 : présence d'alcaloïdes deutérés avec 2 ou 3 atomes de deutérium). 193

Tableau 20 : Pourcentages relatifs du D3MN dans les solutions d'incubation en présence et en absence du NADPH. 196

Tableau 21 : Identification par TLC-MS des taches correspondant aux alcaloïdes natifs et deutérés. GAL : galanthamine, LYC : lycorine, GD3 : galanthamine deutérée, LD2 : lycorine deutérée, D3MN : précurseur deutéré, N-DMNV : N-déméthylnarwédine. +/- : absence ou présence des alcaloïdes natifs, LDD : limite de détection, (U) : traitements aux ultrasons... 198

Tableau 22: Résultats du criblage par GCMS des alcaloïdes dans les différents organes chez *Pancreatium maritimum*. + : présence de l'alcaloïde, - : absence de l'alcaloïde dans l'échantillon, (temps de rétention ; bibliothèque et pourcentage de similitude), NIST : Librairie NIST08, GAL : Base de données rapportées dans la littérature..... 212

Tableau 23 : Résultats du criblage par GCMS des alcaloïdes dans les différents organes chez *Narcissus tazetta* et *Narcissus poeticus*. + : présence de l'alcaloïde, - : absence de l'alcaloïde dans l'échantillon, (temps de rétention ; bibliothèque et pourcentage de similitude), NIST : NIST08, GAL : Base de données rapportées dans la littérature..... 214

Introduction

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative complexe qui se caractérise par une perte progressive et irréversible des fonctions mentales, de la mémoire, des fonctions de mémorisation de nouvelles informations suivies d'une détérioration des fonctions de la pensée et de l'élocution ainsi qu'un changement du comportement. Cette maladie est en relation avec un déficit du cerveau en neurotransmetteurs surtout cholinergiques. Les acétylcholinestérasiques en constituent donc le principal traitement. Les recherches se sont tournées vers les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE) inhibant cette dernière, et augmentant ainsi la demi-vie de l'acétylcholine.

La galanthamine, un alcaloïde isoquinoléique, est un des représentants de cette classe d'inhibiteurs. Auparavant, la galanthamine fut utilisée contre la myopathie, les phénomènes de paralysie infantile (poliomyélite), comme antagoniste de relaxants musculaires lors d'interventions chirurgicales (Turova et Sapozhnikova, 1982). Récemment, l'utilisation de bromhydrate de galanthamine a été validée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer pour les formes modérées (Maelicke *et al.*, 2001). Elle est commercialisée en France depuis 2001 sous le nom de Razaine[®] pour lutter contre ce problème de santé public que représente la maladie d'Alzheimer (8 à 16 mg/j).

Aujourd'hui, la galanthamine est utilisée pour le traitement de cette maladie dans le monde entier (Razaine[®], Nivaline[®]). Pour les besoins de l'industrie pharmaceutique, cet alcaloïde est extrait à partir de bulbes de la famille des Amaryllidaceae : la nivéole d'été (*Leucojum aestivum*), le perce neige (*Galanthus nivalis*), et les narcisses (*Narcissus sp.*) ou obtenu par synthèse chimique. Ces deux méthodes d'obtention de la galanthamine présentent des inconvénients. Les faibles teneurs de cet alcaloïde dans les plantes (2 % de la matière sèche au maximum) entraînent des coûts élevés pour la molécule d'origine naturelle (évaluée en 1994 à 50 000 dollars le Kilogramme). Quant à la synthèse chimique, la stéréosélectivité requise pour obtenir la forme naturelle (S,R,S galanthamine), et le faible rendement de production sont à l'origine des coûts élevés (Diop MF, 2007). Cette dernière requiert de très nombreuses étapes, la difficulté principale résidant dans le respect de la configuration des centres d'asymétrie.

Bien que les plantes constituent des ressources renouvelables, quelques espèces sont de plus en plus difficiles à obtenir, en raison d'une demande croissante. La destruction de leurs habitats naturels et les difficultés techniques de culture ont conduit à une réduction du nombre et de la diversité des plantes disponibles (Sato *et al.*, 2001).

Pour de nombreuses substances naturelles, une alternative de production par synthèse chimique est possible. Toutefois, dans certains cas, le coût élevé de ce type de production et la pollution qui l'accompagne ont conduit, pour certains produits chimiques, au développement de nouveaux types de production qui font appel aux biotechnologies. Les cultures cellulaires et d'organes de plantes, du fait de leur totipotence, offrent une alternative pour la production *in vitro* de métabolites secondaires d'intérêt (Verpoorte *et al.*, 1991). La culture *in vitro* présente aussi l'avantage que les métabolites d'intérêt sont obtenus dans un environnement contrôlé, indépendant des changements climatiques, des conditions du sol et des conditions géopolitiques des pays producteurs des plantes.

Pour améliorer le rendement de ces procédés biotechnologiques, de nombreuses stratégies ont été mises en œuvre : la modification de la composition des milieux de culture, en particulier au niveau de l'apport des régulateurs de croissance, l'élicitation, l'application des agents exogènes et l'ajout de précurseurs de biosynthèse. Ces stratégies ont permis une productivité, par les cultures de cellules ou de tissus, économiquement rentable pour certains composés, en particulier les molécules à haute valeur ajoutée (Verpoorte *et al.*, 1999). On peut citer l'exemple du paclitaxel, substance antitumorale produite à partir de cultures cellulaires de *Taxus chinensis* (Kingston DGI, 2005).

Concernant la galanthamine, face à la demande croissante du marché pharmaceutique liée au vieillissement de la population, l'approvisionnement en cet alcaloïde devient un problème majeur. La production de galanthamine par la culture de tissus *in vitro* pourrait constituer une alternative intéressante pour obtenir ce composé à haute valeur ajoutée. Plusieurs travaux ont rapporté la propagation de bulbes (tels que les genres *Galanthus* et *Narcissus*), mais peu de choses sont connues sur la voie de biosynthèse et l'accumulation de métabolites secondaires dans les bulbilles *in vitro* (Codina C, 2002).

Le travail que nous présentons ici s'inscrit dans le cadre de la production de molécules d'intérêt thérapeutique par une approche biotechnologique. Cette thématique constitue un nouvel axe de recherche développé par le Pr. D. LAURAIN-MATTAR, suite à son intégration au sein du groupe SUCRES dirigé par le Dr. Yves CHAPLEUR, à l'Université Henri Poincaré de Nancy-1. Les recherches ont porté sur des plantes appartenant à la famille des Amaryllidaceae, qui sont des sources d'extraction de la galanthamine. Ces plantes sont : *Narcissus pseudonarcissus*, *Narcissus tazetta*, *Narcissus poeticus*, *Leucojum aestivum*, *Leucojum vernum*, *Galanthus elwesii*, *Pancratium maritimum* et *Pancratium tortuosum*. Ce travail a consisté à étudier l'effet de plusieurs facteurs exogènes sur l'accumulation et la

diversité des alcaloïdes dans des tissus *in vitro* de ces Amaryllidaceae en utilisant des méthodes chromatographiques liquide, gazeuse ou sur couche mince et couplées à la spectrométrie de masse (HPLC, LCMS, GCMS, et HPTLC-MS). Nous présentons ensuite, l'étude de la voie de biosynthèse des alcaloïdes chez *L. aestivum* en suivant la biotransformation de précurseurs alcaloïdiques marqués au deutérium, et leur métabolisation qui permet d'envisager l'étude des enzymes intervenant dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes. *L. aestivum* est la seule espèce cultivée actuellement, et dont l'habitat naturel est en voie de disparition. Enfin, nous présentons le criblage phytochimique des espèces citées ci-dessus et provenant de diverses régions du monde, notamment, la France, le Soudan et le Liban.

Objectifs

Le projet comporte trois objectifs :

-Le premier vise à améliorer l'accumulation de la galanthamine chez des Amaryllidaceae par le biais des biotechnologies. Il s'agit de concevoir un mode de production de la galanthamine par un procédé faisant appel à la culture *in vitro* susceptible de constituer un mode alternatif de production contrôlée de la galanthamine. Comme les procédés biotechnologiques faisant appel aux cellules indifférenciées permettent rarement une production compatible avec une exploitation industrielle (Laurain-Mattar D, 2008), d'autres stratégies ont été développées. La première vise à initier différentes cultures *in vitro* présentant divers stades de différenciation suite à l'apport de phytorégulateurs exogènes dans le milieu de culture. La seconde stratégie vise à ajouter aux milieux de culture des agents exogènes, inhibiteurs ou précurseurs de l'éthylène, et des éliciteurs de synthèse des métabolites secondaires comme le méthyljasmonate. Ces deux stratégies ont pour objectif d'induire un état de différenciation nécessaire et suffisant pour déclencher la synthèse et l'accumulation des alcaloïdes chez les Amaryllidaceae.

-Le second objectif est de rechercher, par criblage phytochimique *via* les techniques chromatographiques (HPLC, LCMS, HPTLC-MS et GCMS), de nouveaux alcaloïdes inhibiteurs de l'AChE et présents dans différents organes *in vivo*, et dans des bulbilles *in vitro* de différentes plantes appartenant aux Amaryllidaceae (*Narcissus pseudonarcissus*, *Narcissus tazetta*, *Narcissus poeticus*, *Leucojum aestivum*, *Leucojum vernalis*, *Galanthus elwesii*, *Pancreatum maritimum*, *Pancreatum tortuosum*).

-Le troisième objectif porte sur l'étude de la voie de biosynthèse des alcaloïdes chez *L. aestivum*, en vue de réaliser une synthèse biosynthétique de la galanthamine. Il s'agit de suivre la biotransformation, dans les cultures de bulbilles *in vitro* de *L. aestivum*, de précurseurs marqués au deutérium et d'identifier une enzyme clé intervenant dans cette voie de biosynthèse.

Après une étude bibliographique portant sur la maladie d'Alzheimer, les plantes de la famille des Amaryllidaceae et la voie de biosynthèse de ses alcaloïdes, nous présenterons les matériels et méthodes utilisés. Nous discuterons par la suite l'ensemble de nos résultats obtenus. Nous terminerons par une conclusion générale, dans laquelle nous tenterons de résumer nos objectifs atteints, les axes forts de ce travail et la suite à leur donner.

Synthèse Bibliographique

A - Maladie d'Alzheimer et traitements

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative complexe qui touche exclusivement l'espèce humaine. Elle se caractérise par une perte progressive et irréversible des fonctions mentales, de la mémoire, des fonctions de mémorisation de nouvelles informations suivies d'une détérioration des fonctions de la pensée et de l'élocution ainsi qu'un changement du comportement (Charbier PE, 2009). C'est la principale cause de démence chez les personnes âgées.

En 2001, plus de 24 millions de personnes souffraient de la démence dans le monde entier ; 26,6 millions en 2006 et 30 millions en 2010. Ce nombre devrait doubler tous les 20 ans jusqu'à atteindre 85 millions en 2050 en raison de l'augmentation de l'espérance de vie (Ferri *et al.*, 2005 ; Daniel C, 2010). La maladie d'Alzheimer constitue donc un important problème de santé publique.

C'est en 1907 que le neuro-pathologiste allemand Aloïs Alzheimer a décrit pour la première fois la maladie qui porte son nom. Il s'agit d'une démence d'évolution progressive, caractérisée histologiquement par la présence de plaques séniles et d'une dégénérescence neuro-fibrillaire. Anatomiquement, la maladie d'Alzheimer est caractérisée par une atrophie de l'écorce cérébrale localisée surtout aux régions pariéto-temporo-occipitales, des lésions de l'hippocampe et des ventricules cérébraux. Cliniquement elle se caractérise par une démence massive avec de gros troubles de la mémoire, une désorientation temporo-spaciale, une aphasie, une apraxie, une agnosie, une hypertonie extrapyramidale et des crises d'épilepsie.

Cependant, l'objectif thérapeutique qui serait de modifier l'évolutivité de la maladie d'Alzheimer, de retarder son délai d'apparition ou encore de la prévenir ou de la guérir est encore loin d'être atteint. Pour répondre à ce besoin, de nombreuses recherches sont actuellement en cours dans les laboratoires académiques et industriels.

De nouvelles stratégies médicamenteuses sont envisagées à partir des cibles thérapeutiques identifiées. Les médicaments qui sont les seuls actuellement disponibles pour les malades atteints de la maladie d'Alzheimer sont des médicaments qui traitent les symptômes (Birks J, 2006). La tacrine, qui fut le premier développé, le donépézil, la galanthamine et la rivastigmine sont les représentants les plus connus de cet axe de développement. Ce sont des acétylcholinestérasiques.

La maladie d'Alzheimer est en relation avec un déficit du cerveau en neurotransmetteurs surtout cholinergiques. Les acétylcholinéserasiques constituent, à l'heure actuelle, le principal traitement de cette pathologie.

La découverte de l'importance du déficit cholinergique dans la maladie d'Alzheimer a conduit à des essais visant à reproduire la démarche thérapeutique de la maladie de Parkinson. Mais dans le cas de la maladie d'Alzheimer, l'apport de précurseurs du neurotransmetteur en déficit (acétylcholine) s'est révélé inefficace. Les recherches se sont tournées vers les inhibiteurs de l'AChE. La figure 1 montre la synthèse et la dégradation de l'acétylcholine au niveau de ces neurones. Les inhibiteurs de l'AChE inhibent cette dernière et augmentent ainsi la demi-vie de l'acétylcholine.

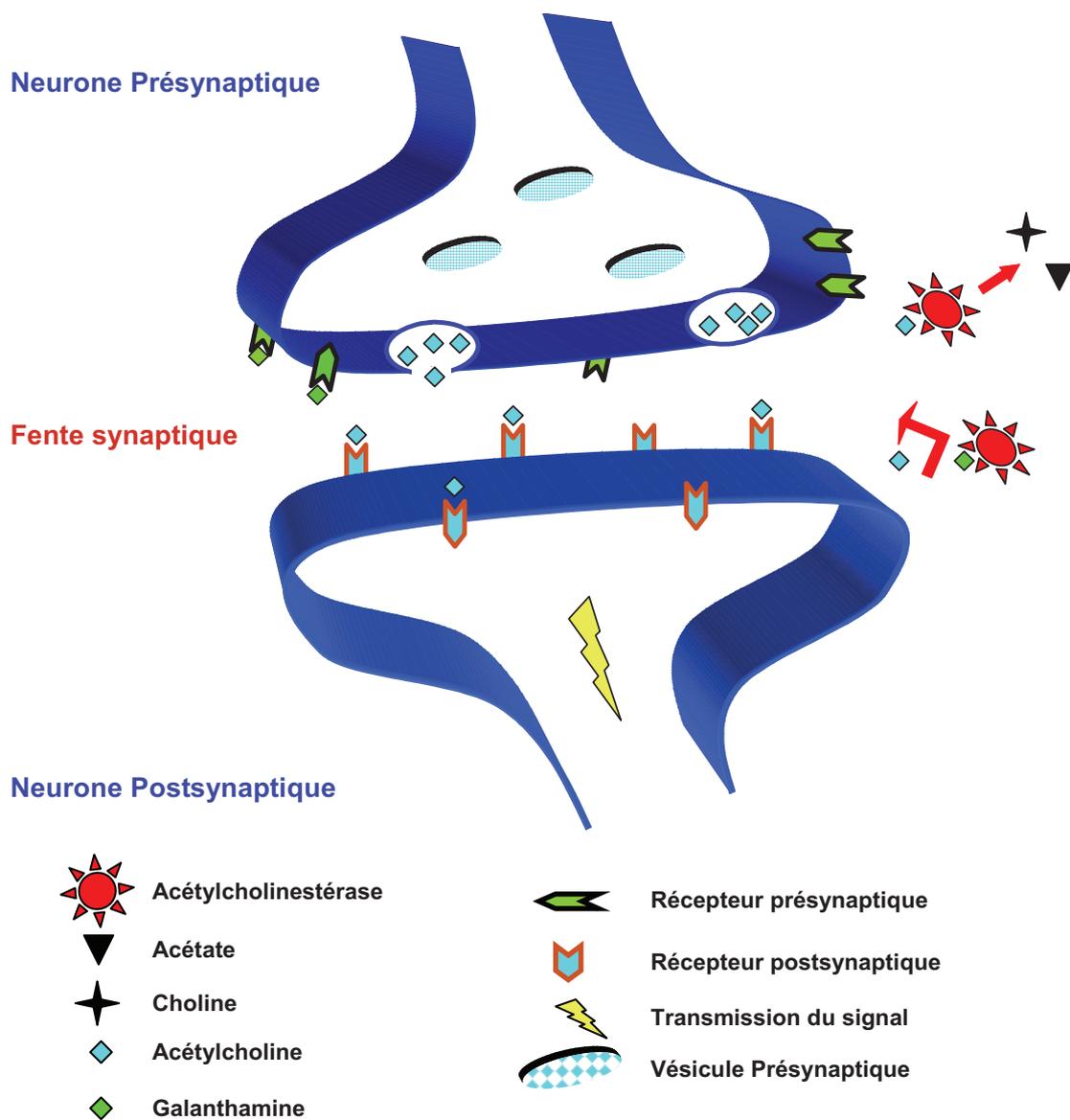


Figure 1: Mode d'action de la galanthamine : Inhibition de l'AChE, modulation allostérique des récepteurs nicotiniens et correction du déficit cholinergique.

1. Traitements de la maladie d'Alzheimer

Le traitement de la maladie d'Alzheimer est plurimodal, faisant appel à des stratégies médicamenteuses et non-médicamenteuses. Les médicaments cholinérgiques permettent d'améliorer les troubles cognitifs, mais aussi psychocomportementaux (Touchon et Portet, 2002). Il s'agit dans ce cas d'un traitement symptomatique regroupant :

a. Les traitements des troubles psychocomportementaux :

La solution n'est pas toujours médicamenteuse. Ces troubles peuvent être aigus ou subaigus : confusion, inversion du rythme nyctéméral, modification de l'activité psychomotrice, agressivité, hallucinations, en association avec une subite aggravation des troubles cognitifs. Ces troubles peuvent parfois être traités par des traitements, tels que des antidépresseurs ou des anxiolytiques.

b. Les traitements des troubles cognitifs :

En utilisant les antiglutaminergiques et les inhibiteurs de l'AChE :

- Les antiglutaminergiques : Il existe un seul médicament de cette classe avec un intérêt pour la maladie d'Alzheimer, la mémantine ou Ebixa[®]. Il s'agit d'un inhibiteur de faible affinité des récepteurs glutaminergiques de type *N*-méthyl-*D*-aspartate. Ce médicament est indiqué dans les formes modérées à sévères de la maladie, dans lesquelles il améliore les fonctions cognitives, les troubles psychocomportementaux, l'autonomie et l'impression clinique globale laissée par le patient.
- Les inhibiteurs de l'AChE : dont trois qui sont commercialisés, le donépézil (Aricept[®]) (Figure 2), la rivastigmine (Exelon[®]), et la galanthamine (Razaine[®], Nivaline[®]). Certains étant d'origine naturelle ou synthétique ; c'est notamment le cas de la galanthamine, qui peut être produite par synthèse chimique mais aussi extraite de bulbes d'Amaryllidaceae.

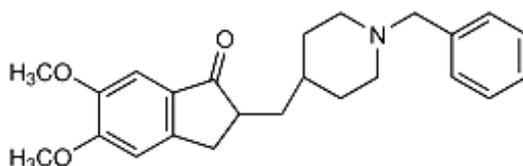


Figure 2 : Structure chimique du donépézil.

2. Médicaments d'origine naturelle utilisés dans le traitement de la maladie d'Alzheimer

Les plantes produisent une large variété de composés chimiques, chacune possède son ensemble spécifique de métabolites secondaires qui ne sont pas impliqués dans les processus métaboliques de base de la plante, mais sont impliqués dans l'interaction de l'organisme produisant avec son environnement (Harborne JB, 1999). Il existe environ 100 000 composés connus qui sont d'origine naturelle et extraits des plantes. Chaque année, ce nombre augmente d'environ 4 000 composés nouvellement découverts (Verpoorte *et al.*, 1999 ; Laurain-Mattar D, 2008).

De nombreuses plantes possèdent des activités potentiellement intéressantes dans la maladie d'Alzheimer. Non seulement pour leur activité inhibitrice de l'AChE, mais aussi par d'autres mécanismes qui jouent un rôle dans cette maladie.

Une approche ethnopharmacologique a permis d'identifier des inhibiteurs potentiels de l'AChE dans des dizaines de familles de plantes. Celles-ci ont été utilisées traditionnellement pour traiter des troubles cognitifs, incluant des maladies neurodégénératives et différents troubles neurologiques.

Ainsi, la physostigmine a été isolée de *Physostigma venenosum*, plante traditionnellement utilisée en Afrique comme poison. Cet inhibiteur de l'AChE réversible a montré des bénéfices cognitifs significatifs chez des patients atteints de la maladie. La structure de cet alcaloïde a permis le développement de la rivastigmine, inhibiteur de l'AChE actuellement commercialisé en France pour le traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer.

Des préparations à base d' *Huperzia serrata* ont été utilisées en médecine traditionnelle chinoise pour réduire des problèmes de mémoire. De cette plante a été isolée l'hupérezine A (Figure 3), un alcaloïde qui inhibe l'AChE *in vitro* et *in vivo*. De plus, cette molécule exerce une activité protectrice des neurones corticaux contre l'apoptose induite par les plaques β -amyloïdes *in vitro*. L'hupérezine A est utilisée en Chine chez des patients atteints de myasthénie ou de la maladie d'Alzheimer.

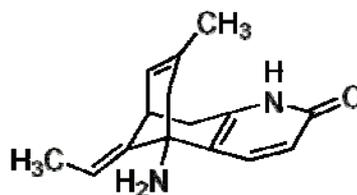


Figure 3 : Structure chimique de l'hupérezine A.

Beaucoup d'autres alcaloïdes ont des activités inhibitrices de l'AChE. Les alcaloïdes des Amaryllidaceae font partie des plus actifs. D'autres métabolites secondaires, telles que des terpènes, ont montré une activité similaire, mais relativement faible.

Enfin, d'autres effets intéressants pourraient être apportés par les plantes. Par exemple, les œstrogènes des traitements hormonaux substitutifs (THS) pour la prévention du développement de la maladie d'Alzheimer et le ralentissement de sa progression. Aussi, les phyto-œstrogènes ont montré une amélioration des fonctions cognitives chez les animaux et les Hommes. D'autres mécanismes d'action, tels que la stimulation des récepteurs nicotiques, présentent des effets bénéfiques. La nicotine seule régule ces récepteurs et augmente le relargage d'acétylcholine. De plus, elle inhibe la formation de plaque β -amyloïdes *in vitro*. Les agonistes nicotiques auraient donc un potentiel dans la prévention ou le traitement de la maladie.

De nombreuses molécules ont donc été testées dans la recherche sur cette maladie. Actuellement, seuls quatre principes actifs sont commercialisés en France pour traiter les troubles cognitifs de cette maladie. Parmi eux, la galanthamine est le dernier inhibiteur de l'AChE mis sur le marché. Cette molécule peut être synthétisée chimiquement, ou extraite de plantes telles que certaines Amaryllidaceae. Mais dans les deux cas, les coûts de production restent élevés.

Une dose quotidienne de bromhydrate de galanthamine est de 16 à 24 mg, en fonction du poids du patient (Blennow *et al.*, 2006). Il faut 50 kg par jour pour traiter environ un million de patients, soit 18 000 kg par an (Fulton et Benfield, 1996). La galanthamine, un alcaloïde isoquinoléique, est une molécule à haute valeur ajoutée, le coût de cet alcaloïde extrait de plantes est d'environ 50 000 \$ par kg (Marco-Contelles *et al.*, 2006). Pour les 18 000 kg mentionnés, environ 18 000 tonnes de bulbes doivent être extraites.

Face à la demande croissante du marché de l'industrie pharmaceutique, la source naturelle de galanthamine est insuffisante et il existe un risque d'extinction de certaines Amaryllidaceae de leurs habitats naturels notamment en Europe de l'Est. Par conséquent, l'offre de cet alcaloïde est actuellement un problème majeur. L'approche biotechnologique semble une alternative intéressante pour la production de galanthamine, mais peu d'études ont été effectuées dans ce domaine. Jusqu'à présent, le laboratoire s'était intéressé aux cultures *in vitro* de certains genres comme, *Leucojum*, *Galanthus* et *Narcissus* pour la synthèse et l'accumulation de galanthamine, et plus généralement d'alcaloïdes des Amaryllidaceae.

B - La famille des Amaryllidaceae

La famille des Amaryllidaceae correspond à une famille de plantes monocotylédones. Elle comprend plus de 800 espèces réparties en 60 genres dont *Galanthus* (perce-neige), *Leucojum* (nivéole), *Narcissus* (narcisses) et *Pancratium* (narcisse de mer, lis de mer, lis mathiole, pancaïis). Ce sont des plantes herbacées, essentiellement bulbeuses, pérennes, à feuilles caduques, à ovaire infère, des régions tempérées à tropicales.

Les Amaryllidaceae ont des racines charnues, habituellement persistantes durant la période de repos, et contractiles (certains bulbes s'enfoncent profondément dans le sol). Ce sont des plantes herbacées vivaces à bulbe tunique. Les feuilles, souvent rubanées, parfois pétiolées, à nervures parallèles, naissent toutes du bulbe qu'elles forment par leurs parties basales engainantes épaissies. Bulbe peu marqué chez *Clivia*, *Cryptostephanus*, certains *Scadoxus*, Pamianthe. Périodiquement le bourgeon apical du bulbe devient bourgeon floral, c'est un méristème axillaire qui permet alors la poursuite du développement du bulbe. La hampe florale, issue du bulbe, est dépourvue de feuille. A son sommet quelques bractées membraneuses (parfois persistantes et colorées) protègent les boutons floraux. Les fleurs sont disposées en cymes condensées donnant une fausse ombelle (cyme umbelliforme). Elles sont nombreuses à solitaires, trimères, régulières à zygomorphes, hermaphrodites. Le périanthe est composé de 3 + 3 tépales rarement libres (*Galanthus*), souvent partiellement soudés en tube et pouvant aussi former une couronne ou parapérigone (*Narcissus*, *Placea*). Les six étamines (dédoublées jusqu'à 18 à 42 - chez *Gethyllis*) sont libres, ou adnées au tube ou au style ou encore réunies par les filets élargis soudés entre eux formant une couronne staminale ou "para-androécium" (*Panocratium*). L'ovaire est adhérent (infère), à trois loges, prolongé d'un style souvent long et d'un stigmate en tête ou trifide. La pollinisation se fait par les insectes, les oiseaux (fleurs tubulaires pendantes d'Afrique australe et des Andes) ou les chauve-souris (*Hippeastrum calyptatum*). Le fruit est généralement une capsule déhiscente, parfois une baie (*Haemanthus*). Les graines sont noires ou non, sèches ou charnues et alors parfois sans dormance (tribu *Amaryllideae*).

La famille est principalement présente dans les régions sub-tropicales d'Afrique, d'Asie et d'Amérique mais aussi dans les pays du pourtour méditerranéen et de l'Europe de l'Est (Figure 4). Chaque aire géographique possède ses lignées d'Amaryllidacées : En Afrique australe, probable berceau de la famille, croissent les tribus *Amaryllideae*, *Haemantheae* et *Cyrtantheae* ; en Asie les tribus *Calostemmateae* et *Lycorideae*. Cette dernière forme une

branche eurasiennne de la famille avec les tribus méditerranéennes *Galantheae*, *Pancratieae* et *Narcisseae*.

En Amérique croit une branche américaine composée du rameau hippeastroïde, tribus *Hippeastreae* et *Griffinieae*, et du rameau tétraploïde andin, tribus *Eustephieae*, *Stenomessaeae*, *Eucharideae*, *Clinantheae* et *Hymenocallideae*. Certains genres, tels *Crinum* et *Pancratium* aux graines véhiculées par les océans, ont conquis de vastes régions du monde.

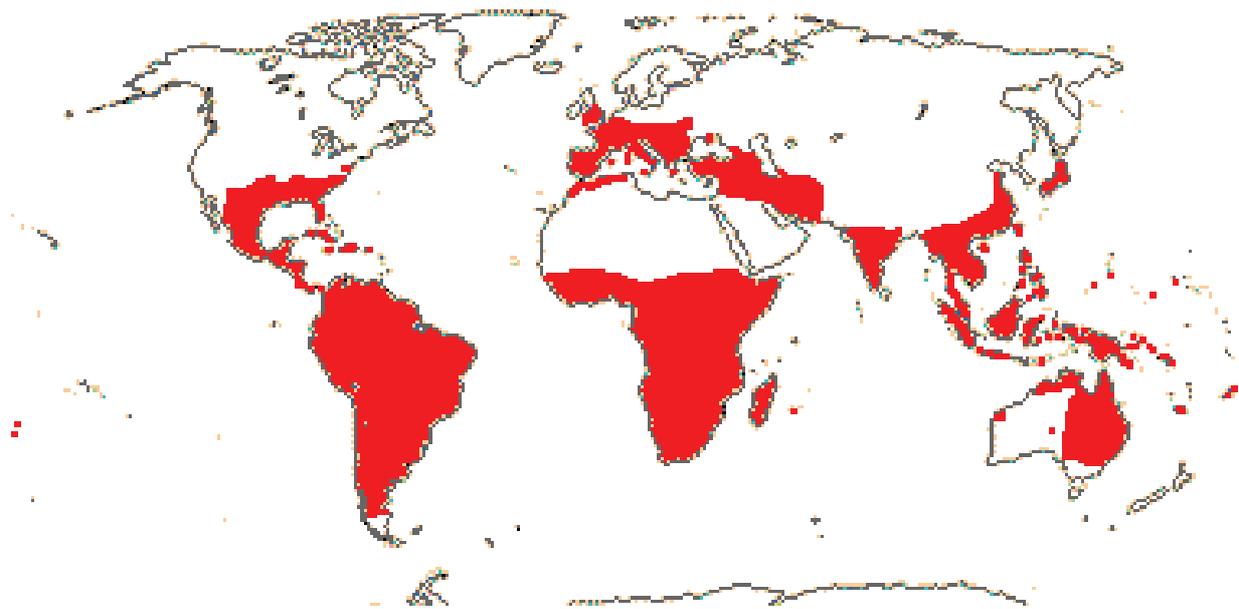


Figure 4 : Répartition mondiale des plantes Amaryllidaceae.

Parmi les genres les plus connus et les plus riches en galanthamine, on trouve :

1. ***Lycoris*** : Dans leur pays d'origine (Chine, Corée et Japon), leur habitat naturel est du type sous-bois de caducs ou persistants, avec un climat continental aux étés chauds et humides. Il existe approximativement 20 espèces et le genre est divisé comme suit:

- Sous-genre *Symanthus*: avec des fleurs en forme de trompette; le feuillage émerge en fin d'hiver, donc plus rustique (*L. incarnata*, *sanguinea*, *sprengeri*, *squamigera*, *chinensis* (Figure 5a)), mais recevant rarement assez de froid pour fleurir dans les régions les plus méridionales.

- Sous-genre *Lycoris*: fleurs étalées en forme "d'araignée" (semblables aux nélines); les feuilles sortent à l'automne (*L. aurea*, *albiflora*, *radiata* (Figure 5b)) et ils sont moins rustiques. Pour bien fleurir, ces espèces n'ont pas besoin d'une période de froid et seront mieux adaptées aux régions méridionales.

2. *Galanthus* : *G. nivalis* croît des rives de la mer Noire jusqu'aux Pyrénées, étant la plus occidentale mais aussi la plus septentrionale. C'est le genre qui possède la plus vaste aire de répartition.

Une majorité d'espèces est originaire du Caucase : *G. alpinus*, *G. angustifolius*, *G. krasnovii*, *G. lagodechianus*, *G. platyphyllus*, *G. rizehensis*, *G. woronowii* et *G. transcausicus*. Cette dernière s'étend à l'Est jusqu'au Sud-Est de la mer Caspienne en Iran, limite orientale du genre. Bon nombre d'autres espèces poussent plus au Sud, en Turquie, *G. koenenianus* au Nord, *G. trojanus* au Nord-Ouest, *G. cilicicus* et *G. peshmenii* au Sud. *G. fosteri* se rencontre depuis le Nord de la Turquie jusqu'au Liban et peut-être en Israël. Certaines espèces s'étendent sur la Turquie, les Balkans et la Crimée : *G. elwesii* (Figure 5c), *G. gracilis* et *G. plicatus*. *G. ikariae* est limité aux îles de la mer Égée. *G. reginae-olgae* se rencontre du Péloponnèse au Sud de la Bosnie ainsi qu'en Sicile (Davis AP, 1999).

3. *Leucojum* : Le nom *Leucojum* est une latinisation du grec « λευκοίον » ou fleur blanche parfumée. *Leucojum* est un genre botanique qui regroupe certaines nivéoles (Figure 5d-e). Deux d'entre elles, indigènes mais rares dans nos régions, sont assez souvent cultivées : la nivéole d'été, *Leucojum aestivum* (Figure 5d), et la nivéole de printemps, *Leucojum vernalum* (Figure 5e). *Leucojum* est très voisin de *Galanthus*. Chez les *Galanthus*, les trois tépales internes généralement échancrés, sont plus petits que les externes et présentent une ou deux tâches vertes (guides de nectar). Chez les *Leucojum*, en revanche, les six tépales ont la même longueur. Les deux nivéoles à feuilles rubanées *L. vernalum* et *L. aestivum* sont rustiques et ont une vaste répartition dans les lieux frais d'Europe et du Moyen-Orient.

On rencontre six espèces de nivéoles en France, dont quatre en France continentale : la plus commune, bien que n'existant que dans la partie Nord-Est du territoire est la nivéole de printemps (*Leucojum vernalum*) que l'on observe en fleur dès la mi-février (Figure 5e). La hampe florale triangulaire et la floraison précoce la distingue de la nivéole d'été (*Leucojum aestivum*), beaucoup plus rare, dans les fossés et lieux humides ; et de la nivéole de Nice, *Acis nicaeensis* (anciennement *Leucojum nicaeense*), rencontrées uniquement dans quelques stations limitées à la Riviera niçoise (Beausoleil, le mont des Mules). La quatrième espèce de France continentale, la nivéole de Fabre, *Acis fabrei* (anciennement *Leucojum fabrei*) n'existe que sur le versant Sud du Mont Ventoux (Vaucluse), où seules trois localités sont connues.

Deux autres espèces sont présentes en Corse : *Acis rosea* (anciennement *Leucojum roseum*) et *Acis longifolia* (anciennement *Leucojum longifolium*).

Seules la nivéole de printemps et la nivéole d'été font actuellement encore partie du genre *Leucojum sensu stricto*. Ce sont des espèces paneuropéennes. La nivéole de printemps, *Leucojum vernum* L., se rencontre depuis le Nord-Est de la France jusqu'en Europe orientale. La nivéole d'été, *Leucojum aestivum* L., se rencontre depuis l'Irlande du Nord jusqu'en Transcaucasie.

4. *Narcissus* : Le nom Narcisse est d'origine persane : il est lié à l'histoire de nargesse (l'oeil). En grec, il a été transposé en « νάρκισσος » ou fleur de narcisse, puis en latin *Narcissus* (Figure 5f-g). Dans la mythologie grecque, Narcisse était un des plus beaux hommes de Grèce, mais les dieux avaient décidé qu'il ne pourrait jamais regarder son reflet. La nymphe des sources Echo, tomba amoureuse de Narcisse. Elle fut rejetée par la vanité de Narcisse, et pour se venger, Echo demanda aux dieux de le punir. En châtement, ils firent en sorte que Narcisse vît son reflet et en tomba alors amoureux. Il resta alors figé, face à l'eau d'où émanait son reflet. Echo, prise de désespoir, se jeta du haut d'une montagne : c'est de là que viendrait le mot écho, et Narcisse fut transformé en plante. Cette plante porte son nom, à cause de l'inclinaison de ses fleurs en direction des points d'eau.

Les narcisses sont des plantes bulbeuses, à feuilles basales et à tiges creuses, portant de une à plusieurs fleurs. Les fleurs comportent six tépales pétaloïdes. Les étamines, au nombre de six, sont insérées dans une couronne ou paracorolle en coupe ou en trompette. Le fruit est une capsule trilobée contenant généralement de nombreuses graines. Il existe de nombreuses espèces et une multitude de variétés horticoles. Ce sont des plantes toxiques, qui, comme le perce-neige, contiennent de la galanthamine. La floraison a lieu en mars ou avril, les fleurs étant de couleur blanche ou jaune selon les espèces. Quelques espèces toutefois, comme *Narcissus serotinus* et *Narcissus viridiflorus*, sont à floraison automnale.

Deux espèces de *Narcissus* sont particulièrement rustiques : *N. pseudonarcissus* (Figure 5f) et *N. poeticus* (Figure 5g) et sont à l'origine de plusieurs milliers d'hybrides horticoles. Ce genre renferme de nombreuses espèces à grande variabilité, conduisant à décrire une infinité de sous espèces, variétés et formes qui ne sont pas considérées au même rang par tous les auteurs.



a

b



c



d



e



f

g



h

i

Figure 5: a) *Lycoris chinensis* b) *Lycoris radiata*, c) *Galanthus elwesii*, d) *Leucojum aestivum*, e) *Leucojum vernum* (récoltée à la forêt de Deuille, Meurthe et Moselle, France), f) *Narcissus pseudonarcissus*, g) *Narcissus poeticus* « double », h) *Pancratium maritimum*, i) graines de *Pancratium maritimum*.

5. ***Pancratium*** : Ce sont des plantes herbacées vivaces (Figure 5h), à fleurs blanches parfumées que l'on rencontre le long des côtes méditerranéennes, aux îles Canaries et dans les régions tropicales d'Afrique et d'Asie. Le nom de *Pancratium* est un mot latin signifiant «pancrace» ou sport de combat très violent, lui-même emprunté au grec «παγκράτιον» (pankrátion). En grec ancien, le mot «παγκράτιον» désignait deux choses : l'art martial du pancrace et une plante maritime à bulbe, peut être par allusion aux nombreuses propriétés médicinales de cette plante (Couplan François, 2000).

Les graines (Figure 5i) transportées par la mer ont permis au genre de coloniser les régions côtières de la Méditerranée, de l'Atlantique et de l'Océan indien. Les grosses graines noires flottantes (Figure 5i) peuvent être transportées par les grandes marées avant de s'échouer et de fonder de nouvelles colonies. Elles germent sur le sable des dunes où les racines contractiles maintiennent enfoncé le bulbe de la plante.

Si les plantes peuvent être consommées par différentes espèces animales, elles sont toxiques pour l'homme en raison de la présence de différents alcaloïdes comme la pancratistatine. *Pancratium tenuifolium* est utilisé dans différentes ethnies du Botswana comme psychotrope, *Pancratium maritimum* est utilisé comme fongicide externe (Figure 5h) (Couplan François, 2000). Ces plantes ont été cultivées dès l'antiquité autour de la Méditerranée et on les retrouve sur des fresques crétoises préclassiques et des timbres (Figure 6a-b). Le timbre (Figure 6c), émis en 1992, fait partie d'une série "Nature de France - Plantes des marais" attirant l'attention sur les zones humides, espaces naturels parmi les plus menacés.

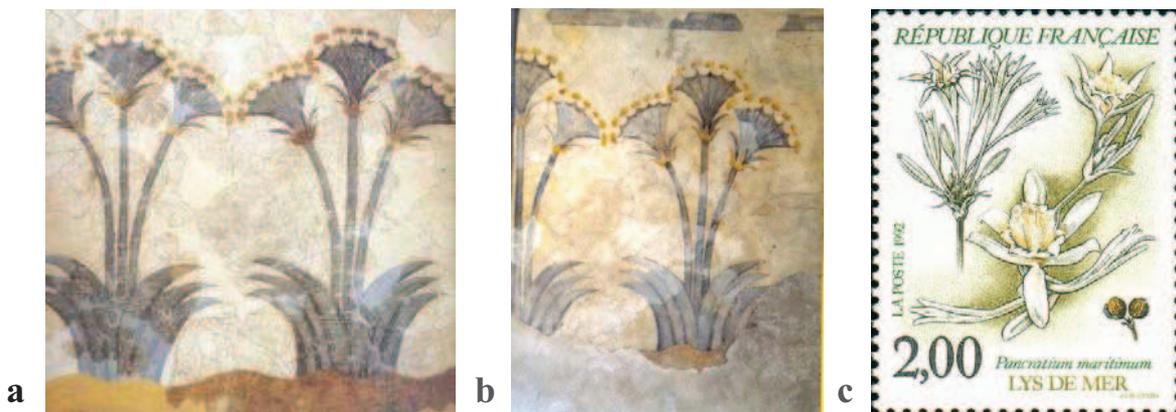


Figure 6: Le *Pancratium*, un motif fréquent des murs peints, fresques et timbres. a) Fresques de la période minoène ; b) Photo des fresques prise à Europa park (Rust Allemagne) ; c) Timbre oblitéré à Nantes le 12 septembre 1992.

C - Les alcaloïdes

1. Définition des alcaloïdes

Les alcaloïdes forment un vaste groupe de métabolites secondaires. Il existe plusieurs définitions des alcaloïdes. Cette définition comporte les points essentiels suivants :

- Un alcaloïde est un composé organique d'origine naturelle,
- azoté,
- plus ou moins basique,
- de distribution restreinte,
- et doué, à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées.

Ils sont généralement synthétisés dans les tissus périphériques des plantes, puis sont stockés dans des compartiments tels que les vacuoles. La régulation de la synthèse de ces alcaloïdes, qui peut s'exercer au niveau de l'expression enzymatique, est dépendante du stade de différenciation. Leur rôle dans les plantes est assez peu connu. Certains pourraient intervenir dans les relations de défense plantes-prédateurs.

2. Classification des alcaloïdes

Ils se présentent fréquemment sous forme de sels, mais certains se produisent également en combinaison avec des sucres, et d'autres apparaissent sous forme d'amides ou esters. Les alcaloïdes peuvent aussi être des sels quaternaires ou d'oxyde d'amine tertiaire (Pelletier SW, 1983). Ils peuvent être classés en fonction de leur structure chimique, de leurs activités biologiques et écologiques ou de leur voie de biosynthèse. Les voies métaboliques sont généralement propres à un groupe taxonomique (espèce, famille, ...) et peuvent en constituer des éléments descriptifs caractéristiques. Les Amaryllidaceae se distinguent ainsi de la famille des Alliaceae par la présence d'alcaloïdes dérivés de la phénylalanine et de la tyrosine (Figure 7).

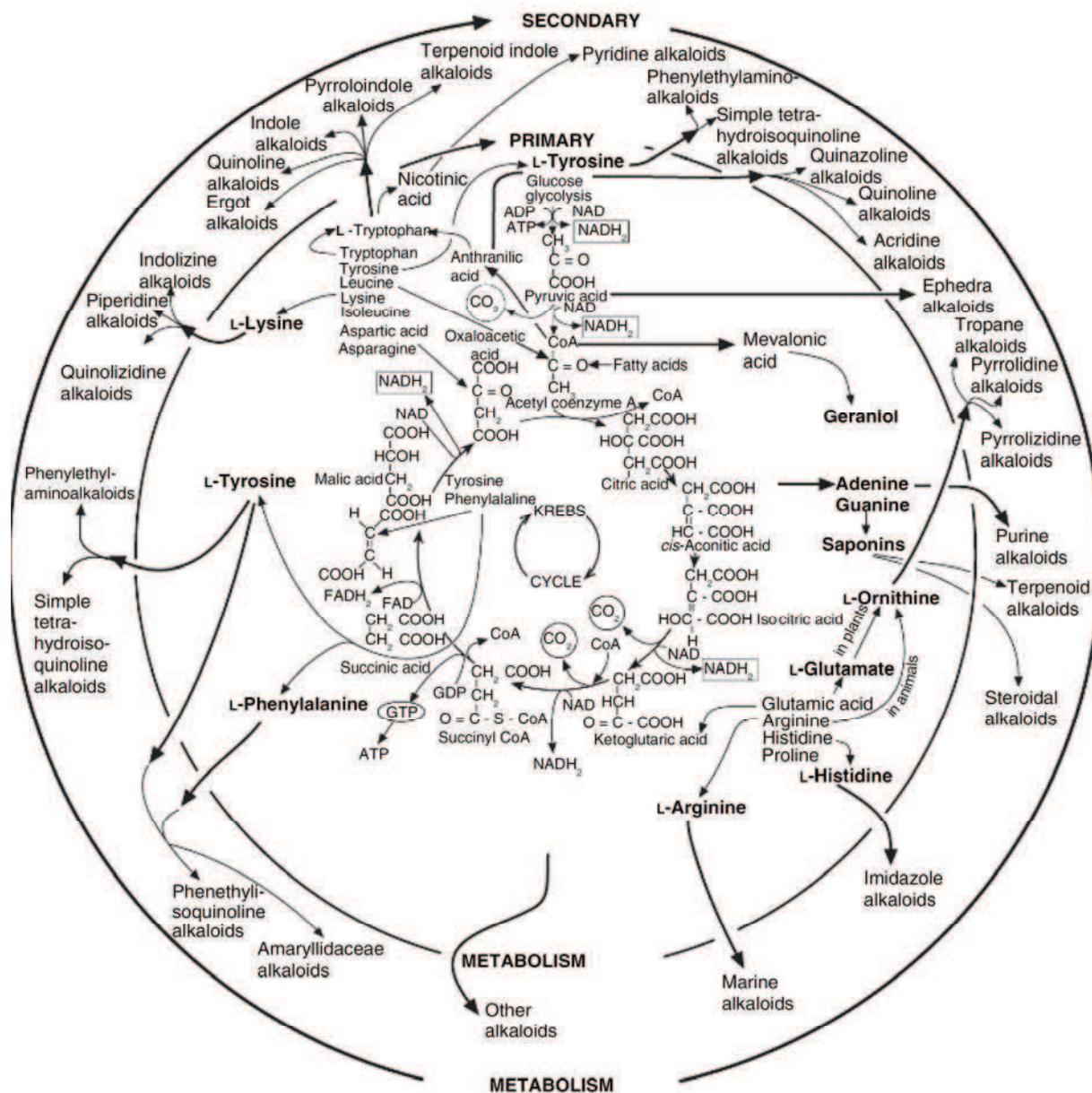


Figure 7: Biosynthèse des alcaloïdes (Tadeusz Aniszewski, 2007).

3. Les alcaloïdes des Amaryllidaceae

Les alcaloïdes des Amaryllidaceae (Figure 8) sont répartis en 6 groupes principaux (Berkov *et al.*, 2005 ; Berkov *et al.*, 2004) :

- type **Galanthamine** (galanthamine, *nor*-galanthamine, *épi*-galanthamine, *nor*-lycoramine, *N*-formylgalanthamine, *N*-formylnorgalanthamine, narvédine, *0*-méthylleucotamine)
- type **Lycorine** (lycorine, *O*-acétylcaranine, *O*-acétylpluviine, pluviine)
- type **Lycorénine** (galvésine)
- type **Tazettine** (tazettine)
- type **Crinane** (crinine, haemanthamine, marithidine, buphanisine, déméthylmarathidine)
- type **Phénanthridine** (trisphéridine).

Actuellement, une vingtaine d'alcaloïdes isoquinoléiques a été identifiée chez les Amaryllidaceae dans la plante entière et dans des cultures *in vitro* (Berkov *et al.*, 2005). Parmi ces alcaloïdes on trouve:

a. La lycorine : (Figure 8), c'est un alcaloïde isolé du genre *Lycoris* des Amaryllidaceae. Elle possède des effets biologiques divers, entre autres, antipaludiques (Sener *et al.*, 2003), antiviraux (Hwang *et al.*, 2008), antitumoraux (Weniger *et al.*, 1995), et antiinflammatoires (Mikami *et al.*, 1999). Elle inhibe la biosynthèse de l'acide ascorbique (Hoffman *et al.*, 1966). Cet alcaloïde induit l'apoptose des cellules HeLa du col de l'utérus et des cellules leucémiques humaines *via* une voie mitochondriale intrinsèque. En Russie on l'utilise comme expectorant pour le traitement aigu et chronique des processus inflammatoires dans les maladies de poumons et les maladies bronchiales (Abdullaeva *et al.*, 1978 ; Shakirov *et al.*, 1996).

b. La galanthamine : (Figure 8), c'est un alcaloïde isoquinoléique de type dibenzofurane. Il a été extrait de nombreuses espèces de la famille des Amaryllidaceae. Actuellement cet alcaloïde est isolé de *Leucojum aestivum*, et a été introduit cliniquement pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, en raison de son pouvoir inhibiteur réversible de l'AChE (Heinrich *et al.*, 2004). Le nom chimique de la galanthamine est (4a*S*, 6*R*, 8a*S*)-4a, 5, 9, 9, 10, 11, 12-hexahydro-3-méthoxy-11-méthyl-6*H*-benzofuro [3a, 3, 2*ef*] [2] benzazépin-6-ol. C'est une molécule tétracyclique qui possède trois centres asymétriques. La galanthamine est une poudre blanche. L'alcaloïde base et son sel de bromhydrate, utilisé en thérapeutique, sont lévogyres. La synthèse chimique est difficile à réaliser à cause du couplage oxydatif intramoléculaire *para-ortho* des groupements phénoliques qui requiert des facteurs bloquants du couplage *para-para* qui se réalise plus facilement.

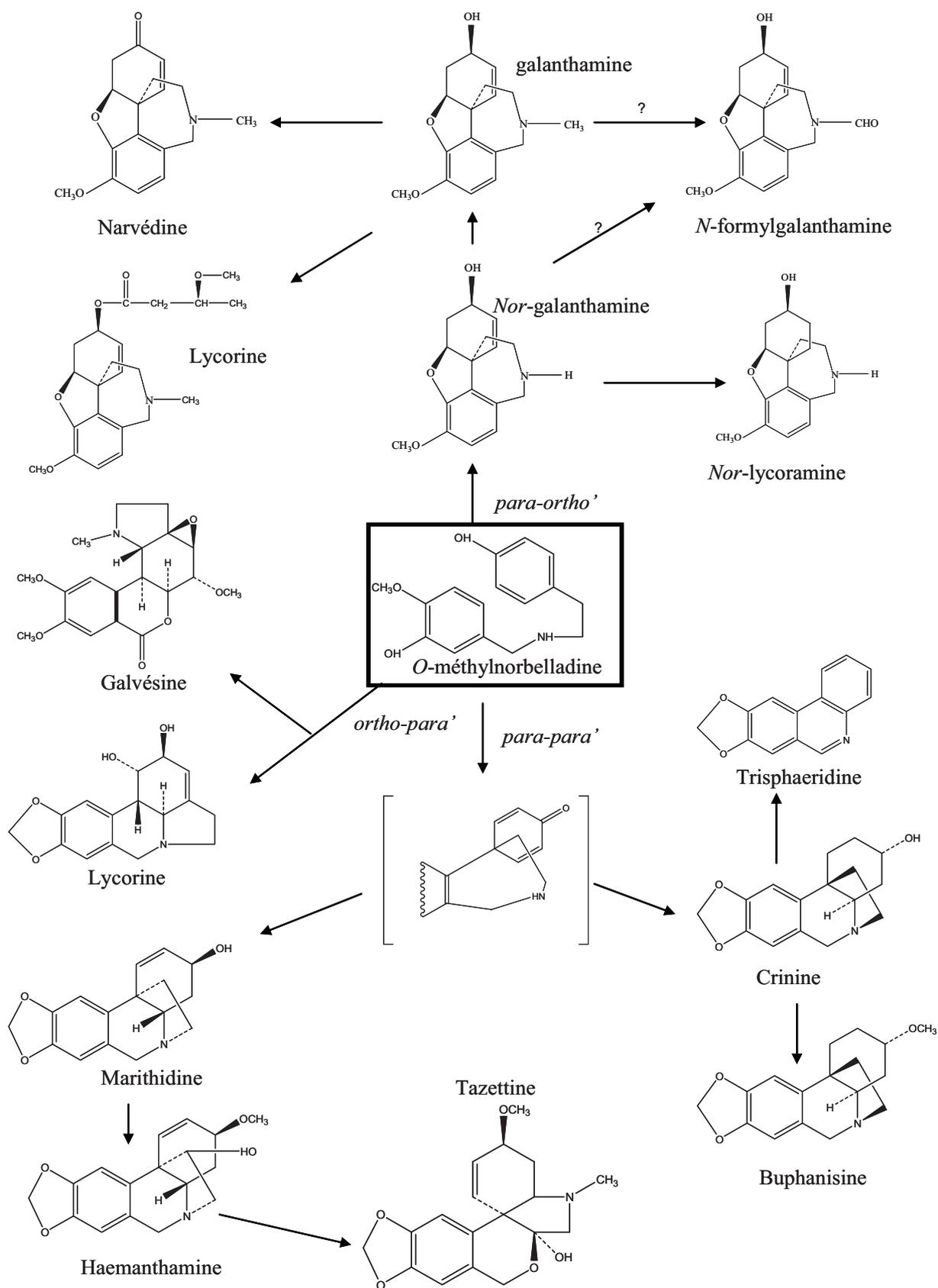


Figure 8 : Voie de biosynthèse des alcaloïdes chez *Narcissus* (Amaryllidaceae) d'après Bastida et Viladomat (2002).

4. Intérêt des alcaloïdes en thérapeutique

Les alcaloïdes constituent l'un des principaux groupes de constituants de plantes utilisés en thérapeutique.

Dans les années 1950, l'industrie pharmaceutique avait peu d'intérêt pour les extraits de plantes utilisés comme de nouveaux médicaments parce que la plupart d'entre eux peuvent être produits par synthèse chimique. L'introduction de la vinblastine et de la vincristine dans la chimiothérapie du cancer a stimulé l'intérêt pour les plantes pour la découverte de nouveaux médicaments. Les méthodes de dépistage à haut débit pour l'évaluation d'un grand nombre d'extraits de plantes contenant des composés biologiquement actifs ont été mises au point. Au cours des 50 dernières années, l'introduction de nouveaux médicaments d'origine naturelle (vinblastine, vincristine, taxol, l'artémisinine, galanthamine) ou hémisynthétique (vindésine, vinorelbine, artéméther, artésunate de sodium et atracurium), est à noter dans l'arsenal pharmaceutique (Phillipson DJ, 2007). Aujourd'hui, il existe plus de 8 000 composés naturels et leurs dérivés reconnus comme étant des alcaloïdes (Figure 7). Chaque année, au moins 100 nouvelles molécules sont découvertes par des scientifiques du monde entier. La moitié des 25 produits pharmaceutiques les plus vendus en 1991, est d'origine naturelle. Ces médicaments comprennent, en particulier, les inhibiteurs de l'AChE. Environ 25 % du nombre total de médicaments utilisés en thérapeutique sont des produits d'origine végétale, entre autres, l'atropine, la codéine, et la morphine (Tadeusz Aniszewski, 2007). Plusieurs alcaloïdes isoquinoléiques ont été identifiés chez les plantes de la famille des Amaryllidaceae. Les Amaryllidaceae sont connues pour leur richesse en alcaloïdes qui possèdent des activités biologiques variées. Par exemple la galanthamine, découverte dans le genre *Galanthus* dans les années 1950, est un médicament utilisé dans le monde entier pour le traitement palliatif de la maladie d'Alzheimer (Berkov *et al.*, 2005 ; Berkov *et al.*, 2004 ; Sener *et al.*, 2003 ; Eichhorn *et al.*, 1998 ; Diop *et al.*, 2006, Diop *et al.*, 2007 ; Ptak *et al.*, 2009). Récemment, 53 alcaloïdes ont été identifiés dans le genre *Pancratium*, la plupart d'entre eux sont doués d'activité anticancéreuse. Par exemple, la lycorine, la pseudolycorine, la 9-norpulviine, l'ungéremine, l'hippeastrine, la tazettine, l'haemanthamine, la 11-hydroxyvittatine, la 9-déméthylmarithidine, la buphanisine, et la narciclasine induisent l'apoptose et inhibent la prolifération des cellules (Cedrón *et al.*, 2010). Cependant, parmi les alcaloïdes identifiés chez *Narcissus*, seuls la galanthamine et des alcaloïdes de type lycorine (pseudolycorine, assoanine, oxoassoanine) ont montré une activité inhibitrice de l'AChE (Lopez *et al.*, 2002 ; Elgorashi *et al.*, 2004).

D - Activation du métabolisme alcaloïdique en culture *in vitro*

1. Obtention des alcaloïdes par les cultures *in vitro*

En raison de leurs activités biologiques multiples, les alcaloïdes sont des molécules à haute valeur ajoutée. De ce fait, les enjeux économiques sont importants pour certains d'entre eux. La compréhension des mécanismes de production de ces molécules est d'une importance capitale. La synthèse chimique de certains alcaloïdes pose des problèmes. Dans de nombreux cas, la production par synthèse chimique n'est pas possible ou n'est pas économiquement rentable. Par exemple, il est difficile de reproduire la stéréochimie de la galanthamine, ce qui entraîne des coûts de fabrication élevés. L'obtention de la galanthamine par synthèse chimique requiert de très nombreuses étapes. La difficulté de cette dernière réside dans le respect de la configuration des centres d'asymétrie (Guillou *et al.*, 2001). La production par culture de tissus végétaux est économiquement faisable pour certains composés (Verpoorte *et al.*, 2002), et représente une méthode alternative pour l'obtention de ces composés à haute valeur ajoutée.

Pour la production à grande échelle des métabolites secondaires d'intérêt, on trouve plusieurs modes de cultures :

- Les cultures végétales sur sol en champs ou en serre ; ce dernier est un espace confiné qui permet de contrôler le climat et l'alimentation des végétaux. Actuellement, la majorité des molécules d'intérêt pharmaceutique et synthétisées par les plantes, sont extraites directement de la plante entière cultivée dans les conditions citées ci-dessus. C'est le cas par exemple du Datura, de la Belladone, du Pavot, ...

- Les cultures végétales hors sol ou sans sol se définissent comme des cultures de végétaux effectuant leur cycle complet de production sans que leur système racinaire ait été en contact avec leur environnement naturel, le sol. Ce genre de culture existe sous deux formes :

- Les cultures hydroponiques : où les racines de la plante sont en contact avec la solution nutritive, avec un accès à l'oxygène par bullage d'air dans le milieu liquide. Le procédé dans « Plantes à Traire » appartient à la culture hydroponique avec une excrétion des molécules d'intérêt, *via* les racines, dans la solution nutritive à l'aide ou non de traitement physique ou chimique (Gontier *et al.*, 2002).

- Les cultures aéropoiques : les racines sont alimentées par nébulisation de la solution nutritive dans une enceinte close (Ritter *et al.*, 2001). L'atmosphère du milieu de culture où se trouvent les racines est saturée par un brouillard nutritif qui se dépose sur les racines puis ruisselle sur ces dernières en assurant l'alimentation hydrique et minérale. Bien entendu, le système assure une excellente aération.
- Les cultures *in vitro* consistent en une multiplication *in vitro* des plantes entières ou des cultures cellulaires. La culture *in vitro* de cellules végétales ou de tissus végétaux différenciés permet de contrôler une large gamme de paramètres contrairement à une culture en serre ou en champ ouvert. Elle permet en outre une culture axénique grâce au maintien de la stérilité des cultures *in vitro*. La recherche sur le métabolisme des plantes est ainsi facilitée et la mise au point de procédés industriels en bioréacteurs visant des hauts rendements en métabolites secondaires devient théoriquement possible.

2. La culture *in vitro*

Les premiers pas de la culture *in vitro* proprement dite sont dus à un allemand, G. HABERLANDT, en 1902 (Krikorian *et al.*, 1969). Il obtint ainsi, sur un milieu de Knop amélioré (Annexe 1), la survie durant plusieurs mois de petits amas cellulaires (poils staminaux ou glanduleux ou des fragments d'épiderme). Mais il n'y avait pas de multiplication cellulaire, et finalement, l'équipe d'HABERLANDT resta sur un échec. Ce furent les cultures de tissus animaux qui prirent le relais, et en 1912 Alexis CARREL réussissait la culture indéfinie de cellules de cœur d'embryon de poulet par repiquages successifs.

Il fallut attendre 1922 pour que de nouveaux espoirs apparaissent pour la culture de tissus végétaux.

W.J. ROBLINS aux Etats-Unis et W. KOTT en Allemagne, s'adressant aux pointes de racines (quelques millimètres), réussissent à les maintenir en survie près de six mois et à obtenir des fragments qui passèrent de quelques millimètres à 5 ou 6 centimètres de long, mais cessèrent de croître et les cultures furent perdues (Augé *et al.*, 1989).

À partir de 1934, la culture *in vitro* de cellules ou de tissus de plantes a fait des progrès spectaculaires.

Toute cellule végétale vivante, quelle que soit sa « spécialisation », du moment qu'elle est vivante et possède un noyau, est capable de reproduire la plante entière d'où elle provient.

C'est la totipotence que la cellule animale ne possède pas et c'est une différence fondamentale. C'est à cette capacité remarquable de la cellule végétale que la culture *in vitro* doit toute son extension. Tout individu du règne végétal peut être cultivé *in vitro* ; il n'y a pas d'exception.

Il est aujourd'hui possible de pratiquer la reproduction végétative en conditions artificielles pour un nombre sans cesse croissant d'espèces à travers la culture *in vitro*. Le concept de multiplication *in vitro* des plantes comprend un ensemble de technologies (micropropagation, embryogenèse somatique, germination *in vitro*,...) qui consiste à cultiver un fragment d'organe de la plante dans un milieu approprié de façon à ce que ce fragment puisse régénérer une plante entière. Le fragment peut être un morceau de limbe, de tige, ou un bourgeon. Cette méthode de culture a démarré dès 1934, avec la découverte d'une auxine, l'acide indole acétique (Kornienko et Evidente, 2008).

La culture *in vitro* végétale correspond à une culture d'explants de plantes, sur un milieu synthétique, dans des conditions stériles, dans un environnement contrôlé et dans un espace réduit.

La mise au point de cultures *in vitro* peut être établie à partir :

- de cellules méristématiques (cellules non différenciées, juvéniles),
- de tous types de tissus sans cellule méristématique (dédiﬀérenciation-rediﬀérenciation). L'enchaînement des mitoses donne une callogenèse, une organogenèse ou une embryogenèse somatique.

Les avantages des cultures *in vitro* sont nombreux. D'une part, ce mode de culture constitue un écosystème où les facteurs biotiques ont disparu (asepsie), ce qui résulte en une miniaturisation des plantes, permettant d'obtenir des différences physiologiques, avec peu de synthèse de vitamines et pas ou peu de photosynthèse. D'autre part, les cultures *in vitro* permettent l'étude de la morphogenèse, la multiplication végétative ou micropropagation, la multiplication clonale (à l'identique) d'un génotype sélectionné, l'embryogenèse somatique, le micro-bouturage par simple enracinement sur milieu de culture augmentant ainsi la rapidité et la fiabilité du processus de croissance.

La multiplication végétative présente plusieurs avantages sur les méthodes conventionnelles de propagation. Ces techniques rendent possible la multiplication d'espèces dont les semences sont rares. La technologie *in vitro* permet d'obtenir des plantes présentant les mêmes qualités phytochimiques et des taux de multiplication largement supérieurs aux

techniques traditionnelles. Elle permet aussi une production qui peut être échelonnée toute l'année.

Grâce aux cultures *in vitro*, l'obtention et la culture d'embryons des hybrides interspécifiques, l'obtention d'haploïdes, la production de plantes génétiquement modifiées par transgénèse, et enfin, la production de métabolites secondaires ont pu être réalisées.

Les biotechnologies connaissent un essor formidable depuis une vingtaine d'années, tant leur développement semble prometteur pour la production rentable de molécules complexes ou pour la découverte de nouveaux principes actifs à haute valeur ajoutée. Ces techniques utilisent la machinerie cellulaire performante de microorganismes pour synthétiser des produits chimiques. Si la culture en bioréacteurs de levures et de bactéries a prouvé son efficacité pour de nombreux procédés industriels, l'utilisation de cellules de plantes à l'échelle industrielle reste très marginale. Le seul exemple porte sur la culture des cals et des suspensions cellulaires produisant du paclitaxel et différents taxanes. Les cultures ont été établies à partir d'écorces, de jeunes tiges et d'aiguilles de différentes espèces de *Taxus* (Tabata H, 2004).

Chez *L. aestivum* L., les travaux de Berkov *et al.*, 2005, ont montré que pratiquement tous les alcaloïdes identifiés sont retrouvés au niveau des feuilles de la plante entière. Cependant, certains alcaloïdes, en particulier la galanthamine et la *nor*-galanthamine sont accumulés majoritairement au niveau des bulbes (Heinrich *et al.*, 2004). Il est à noter que les racines renferment également de la galanthamine, de la *nor*-galanthamine et de la lycorine. Par contre, de nombreux travaux rapportent l'accumulation d'alcaloïdes dans des cultures cellulaires, à l'échelle du laboratoire (Freyssinet *et al.*, 1993). La galanthamine est retrouvée au niveau des cultures *in vitro* de *Leucojum aestivum* L., majoritairement au niveau des bulbilles et des tiges feuillées. Elle est aussi détectée au niveau des cals qui sont des tissus indifférenciés (Diop *et al.*, 2006 ; Pavlov *et al.*, 2007 ; Ptak *et al.*, 2009). On remarque la présence d'alcaloïdes nouveaux dans les cultures *in vitro*. En effet, la déméthylmarithidine est retrouvée au niveau des bulbilles et des tiges feuillées *in vitro*, alors qu'elle est absente *in vivo* dans la plante entière.

Quelque soit la technique utilisée, la culture *in vitro* requiert des conditions très précises de milieu et d'environnement. Les conditions peuvent changer en cours de culture, ce qui rend la maîtrise de ces techniques, plus délicate. Le changement des conditions externes de culture *in vitro* affecte fortement le métabolisme des alcaloïdes d'une part (Mantell et Smith, 1983),

et la régénération des embryons somatiques d'autre part (Malik M, 2008). Différents paramètres peuvent être modifiés en vue d'augmenter l'accumulation des alcaloïdes *in vitro*. La modification de la composition du milieu de culture, l'ajout des précurseurs de la voie de biosynthèse des alcaloïdes, l'ajout d'éliciteurs et des changements de facteurs environnementaux ont une influence sur la biosynthèse des alcaloïdes par des cultures *in vitro* (Tadeusz Aniszewski, 2007).

a. Influence des constituants de base du milieu de culture

Un milieu de culture se définit par ses qualités chimiques (sels minéraux, substances organiques, régulateurs de croissance, et produits naturels complexes) et par ses qualités physiques (solide, liquide, et pH). En ce qui concerne l'environnement des cultures, les facteurs principaux sont la température et la lumière. L'humidité relative sera négligée puisqu'elle est souvent voisine de 100 % dans les récipients de culture.

La composition du milieu de culture peut varier en changeant la combinaison des composants suivants : saccharose et autres sources de carbone, azote, phosphore et phytorégulateurs (Gontier *et al.*, 2002 ; Ritter *et al.*, 2001, Zhou et Wu, 2006 ; Debnath *et al.*, 2006 ; Pasquali *et al.*, 2006 ; Huang SY, 2005 ; Bartholomeusz *et al.*, 2005 ; Kurz et Constabel, 1985 ; Collin HA, 1987 ; Sauerwein et Shimomura, 1991). Chez les Amaryllidaceae, quelques travaux ont rapporté que l'accumulation de la galanthamine dans les tissus *in vitro* dépend de plusieurs facteurs et conditions de culture (Sellès *et al.*, 1997 ; Colque *et al.*, 2004 ; Diop *et al.*, 2006 ; Diop *et al.*, 2007 ; Ptak *et al.*, 2009 ; Georgiev *et al.*, 2009 ; Berkov *et al.*, 2009).

i. Les sels minéraux

En 1962, Murashige et Skoog mettent au point un milieu (MS) constitué de macro éléments, de micro éléments, de vitamines, de Fer chélaté, de saccharose, d'auxines et de cytokinines, milieu liquide ou solidifié par un gélifiant (Murashige et Skoog, 1962). Récemment, quelques travaux, rapportés chez les Amaryllidaceae, ont identifié certains facteurs qui peuvent améliorer non seulement la croissance tissulaire, mais aussi la synthèse des alcaloïdes (Sellès *et al.*, 1997 ; Berkov *et al.*, 2009 ; Georgiev *et al.*, 2009).

En 2009, Georgiev *et al.* ont mis au point un plan d'expérience permettant d'optimiser le milieu de culture des tissus de *Leucojum aestivum* (Georgiev *et al.*, 2009). L'effet commun des nutriments NH_4^+ , NO_3^- , KH_2PO_4 et du saccharose a été étudié sur la biosynthèse de la galanthamine chez cette espèce. Un milieu MS modifié a été établi avec 4,50 g/L KNO_3 ; 0,89 g/L NH_4NO_3 ; 1,25 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,10 g/L KH_2PO_4 et 60 g/L de saccharose. Ce milieu modifié a permis une meilleure accumulation en galanthamine (0,05 à 2,5 % MS) dans les tissus de *Leucojum aestivum* (Georgiev *et al.*, 2009).

ii. Les régulateurs de croissance

Le processus de régénération de la plante est sous le contrôle de substances particulières, les régulateurs de croissance, aussi appelées phytorégulateurs. Les régulateurs de croissance ont une action stimulante sur le métabolisme cellulaire et sont physiologiques chez les végétaux. Il en existe d'autres, synthétisés par l'homme, dont les formules chimiques sont voisines ou différentes des substances naturelles mais qui présentent une activité physiologique similaire. On classe toutes ces substances (endogènes et de synthèse) dans la catégorie des régulateurs de croissance.

Dans la plante, ces régulateurs sont responsables de multiples phénomènes. C'est ainsi que les auxines agissent sur l'élongation cellulaire, et exercent une action rhizogène, ils possèdent aussi d'autres rôles qui ne se limitent pas à ce phénomène. Les cytokinines, favorisent le développement des bourgeons. Donc en incorporant des doses adéquates d'auxines et de cytokinines, on favorise la formation des bourgeons à partir des méristèmes axillaires ou le développement des parties secondaires.

Schématiquement, on peut admettre, selon Skoog, que le comportement physiologique d'un explant mis en culture dépend du rapport auxine/cytokinine:

- Un rapport auxine/cytokinine élevé va engendrer la différenciation de racines (rhizogénèse).
- Un rapport auxine/cytokinine faible permet à l'explant d'évoluer vers une fonction caulogène (formation de bourgeons et de tiges).
- Un rapport égal à 1 ne va pas entraîner de différenciation mais la formation de cal. On aura donc un comportement callogène.

Sage *et al.*, ont montré que le nombre d'embryons somatiques le plus élevé, est obtenu en cultivant les explants de *Narcissus* sur un milieu additionné de fortes concentrations d'auxines (5 et 10 μM d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D)) plutôt qu'une faible concentration (0,5 μM). Une augmentation du rendement a aussi été observée en combinant l'auxine 2,4-D avec une cytokinine (benzylaminopurine (BAP)) (Sage *et al.*, 2000). L'ajout du 2,4-D au milieu de culture de *L. aestivum* a engendré une augmentation du taux de croissance des tissus (Stanilova *et al.*, 2010). D'autres études ont montré que la capacité des explants de *L. aestivum* à former des embryons somatiques est améliorée en présence de 25 μM de piclorame et 0,5 μM BAP (Ptak *et al.*, 2009). D'autre part, l'équipe de Sellès *et al.* a démontré que le transfert des cultures de *Narcissus confusus* sur un milieu solide MS pauvre en auxine (4,52 μM de 2,4-D) et riche en cytokinine (22,2 μM de BAP) stimule la croissance globale et la formation des bulbes (Sellès *et al.*, 1997).

En 2010, Stanilova et ses collaborateurs ont rapporté que la concentration de la galanthamine est plus élevée dans les tissus de *L. aestivum* cultivés sur un milieu renfermant l'auxine ANA (l'acide naphthalène acétique) (Stanilova *et al.*, 2010).

iii. Le saccharose

Le saccharose représente la principale source de carbone dans les milieux de culture de cellules et d'organes végétaux. L'ajout du saccharose au milieu de culture de *Narcissus* (Staikidou *et al.*, 2005 ; Chow *et al.*, 1992) et de *leucojum aestivum* (Berkov *et al.*, 2009 ; Ptak *et al.*, 2007) améliore le développement des bulbes. En 1984, Merillon *et al.*, ont montré que le saccharose peut influencer le métabolisme des alcaloïdes dans les cultures cellulaires de *Catharanthus roseus* (Merillon *et al.*, 1984). En 1997, l'équipe de Sellès *et al.*, ont optimisé un milieu de culture conduisant au meilleur taux de croissance des bulbes *in vitro* de *Narcissus*. La concentration la plus élevée de galanthamine a été observée grâce à l'ajout de 60 g/L et de 90 à 180 g/L de saccharose aux milieux de culture des tissus *in vitro* de *Narcissus confusus* (Sellès *et al.*, 1997). Récemment, l'équipe de Ptak en 2007, et l'équipe de Georgiev en 2009, ont respectivement rapporté que la formation des bulbes *in vitro*, et l'accumulation de galanthamine sont améliorées en cultivant *Leucojum aestivum* sur un milieu enrichi avec 60 g/L de saccharose (Ptak *et al.*, 2007 ; Georgiev *et al.*, 2009).

b. Influence de l'éthylène

L'activation du métabolisme secondaire de la plante est considérée comme étant une réponse à un stress. La production de métabolites secondaires est souvent augmentée lorsque les cellules de la plante ou les racines transformées sont soumises à des produits chimiques qui miment l'attaque d'un pathogène (Al Balkhi, 2008).

L'éthylène (composé gazeux) a été reconnu comme régulateur de croissance quand les moyens de dosage ont permis de le détecter dans les organes végétaux. Il peut avoir une action stimulante ou inhibitrice sur le métabolisme cellulaire.

L'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) est le précurseur direct de l'éthylène, synthétisé par l'ACC synthase, et converti en éthylène par l'ACC oxydase (Adam *et al.*, 1979). Quant à l'éthylène, c'est un phytorégulateur volatile intervenant dans de nombreux processus physiologiques chez les plantes. L'éthylène, tout comme l'acide abscissique, est considéré comme une hormone de stress. En particulier, c'est un phytorégulateur essentiel à la régulation de la réaction des plantes aux perturbations de l'environnement telles que les inondations, la sécheresse, les attaques de pathogènes. Il est aussi produit par les plantes suite à un stress environnemental, un cisaillement ou encore à un traitement d'auxines (Mujib et Šamaj, 2005). L'éthylène joue un rôle critique dans l'activation des défenses des plantes contre différents stress biotiques. Son accumulation est souvent très difficile à contrôler. Pour cela, son rôle physiologique dans les plantes n'est pas très clair. Mais, *in vitro*, il présente une influence importante sur de nombreux aspects de la morphogénèse, comme l'induction des racines et des tiges, et la formation des embryons somatiques (Ptak *et al.*, 2009).

Dans le but de mieux comprendre son rôle physiologique, son étude est souvent associée à l'ajout, aux milieux de culture, des précurseurs [ACC (acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique)], des inhibiteurs de l'éthylène [AgNO_3 , STS (thiosulfate d'argent), CoCl_2], ou aussi en utilisant un capteur d'éthylène [KMnO_4] (Santos *et al.*, 1997 ; Ma *et al.*, 1998 ; De Klerk *et al.*, 1999). Par exemple, l'éthylène produit par les cultures de *Brassica oleraceae* var. *gemmifera* inhibe l'embryogénèse, et l' AgNO_3 ajouté au milieu de culture augmente la production des embryons somatiques (Biddington *et al.*, 1988). Un même effet a été observé dans les cultures de cals de maïs (Ducan *et al.*, 1987). En 2003, Chen et Chang ont observé, dans les cultures de feuilles d'*Oncidium*, un retard de l'embryogénèse directe en présence de faibles concentrations du précurseur de l'éthylène ACC (5 et 10 μM). Par contre, suite à

l'ajout des concentrations plus élevées (20 et 50 μM) la formation d'embryons a été accélérée (Chen et Chang, 2003).

L'éthylène peut aussi stimuler ou inhiber la synthèse des métabolites secondaires. Le traitement avec l'éthylène ou son précurseur a montré une augmentation du contenu des produits dérivés de la shikonine dans les cultures de *Lithospermum erythrorhizon* (Touno *et al.*, 2005). L'ajout de l'éthylène aux suspensions cellulaires stimule l'accumulation des alcaloïdes indoliques chez *Catharanthus roseus* (Yahia *et al.*, 1998), des ginsenosides chez *Panax ginseng* (Bae *et al.*, 2006) et des isoflavones chez *Pueraria tuberosa* (Goyal *et al.*, 2008). Zhang et Wu en 2003, et Tabata en 2004, ont montré que la production des taxanes par les suspensions cellulaires de *Taxus sp.*, est fortement induite suite à l'ajout du STS (Zhang *et al.*, 2003 ; Tabata H, 2004).

Un effet du STS stimulateur de l'accumulation du diterpénoïde tanshinone a été aussi observé dans les cultures *in vitro* des racines de *Salvina miltiorrhiza* (Zhang *et al.*, 2004). L'incorporation des inhibiteurs de l'éthylène (CoCl_2 et NiCl_2) dans les suspensions cellulaires de *Vaccinum pahalae*, réduit l'accumulation de l'éthylène, et augmente l'accumulation des métabolites. Alors que l'application exogène de l'éthéphon (Ethrel, acide 2-chloroéthylphosphonique, $\text{C}_2\text{H}_6\text{ClO}_3\text{P}$), précurseur de la sécrétion d'éthylène, réduit significativement la production des métabolites secondaires (Shibli *et al.*, 1997).

Il est clair donc, que l'accumulation de l'éthylène peut être contrôlée dans les cultures *in vitro* suite à l'ajout des précurseurs, inhibiteurs ou absorbants d'éthylène. Néanmoins, son rôle dans les tissus *in vitro* demeure toujours ambigu. Il est donc intéressant d'étudier l'influence de tous ces composés sur la formation des embryons et la synthèse des alcaloïdes d'intérêt chez les Amaryllidaceae.

c. Activation du métabolisme alcaloïdique par élicitation

L'ajout d'éliciteurs aux milieux de culture des tissus *in vitro*, a déjà été connu dans les années 1980 et 1990 (Funka *et al.*, 1987 ; DiCosmo *et al.*, 1987 ; Tyler *et al.*, 1988 ; Nef *et al.*, 1991 ; Holden et Yeoman, 1994). Par exemple, l'ajout d'éliciteurs (acide malique, alginate de sodium) a montré une stimulation de la synthèse de la berbérine chez *Thalictrum rugosum* (Funka *et al.*, 1987).

L'élicitation désigne l'action de mimer une attaque d'un pathogène sur une cellule de plante. Elle consiste à induire une augmentation de la synthèse de certains métabolites secondaires par des cellules végétales, lors de certains stress tels que l'infection des tissus végétaux par un pathogène, le cisaillement, le froid ou les rayonnements UV (Zabetakis *et al.*, 1999 ; Longemann *et al.*, 2000). L'acide jasmonique est une molécule synthétisée par les cellules de plantes en réponse à ce genre de stress (Doares *et al.*, 1995). L'accumulation simultanée d'acide jasmonique endogène et de métabolites secondaires suite à une élicitation a été montrée dans des cellules de *Papaver somniferum* (Mueller *et al.*, 1993) et du riz (Nojiri *et al.*, 1996). Ainsi, l'acide jasmonique est un messager secondaire dans la cascade de signalisation de la réponse de la plante à un stress. Le délai nécessaire pour la mise en place d'élicitation est de quelques heures à quelques jours (Al Balkhi, 2008). Elle se traduit au final par la synthèse de protéines ou de métabolites secondaires à action biocide ou impliqués dans le renforcement des parois des cellules végétales. Par exemple, l'accumulation du placitaxel chez les plantes de *Taxus* est une réponse biologique de la plante contre des stimuli externes spécifiques. Tabata a montré en 2004, que la biosynthèse du placitaxel, est induite suite à l'ajout du méthyljasmonate (MeJa) aux suspensions cellulaires du *T. baccata*. Le placitaxel est actuellement produit avec des quantités importantes (295 mg/L) excédant une valeur de 2 billions de dollars chaque année (Tabata H, 2004).

Le MeJa (C₁₃H₂₀O₃) (Figure 9) est une phytohormone de nature gazeuse qui appartient à des dérivés de la cyclopentanone dont la biosynthèse se fait à partir de l'acide linoléique. Le nom dérive du jasmin (*Jasminum grandiflorum*) dont le composant principal de l'huile est le méthyljasmonate. Plusieurs travaux de recherche ont prouvé la capacité de cet ester à éliciter la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques chez le *Datura stramonium* (Zabetakis *et al.*, 1999 ; Al Balkhi, 2008), et des alcaloïdes des Amaryllidaceae chez *Narcissus confusus* (Colque *et al.*, 2004). D'autres ont montré le pouvoir inducteur du MeJa sur la production de nombreux métabolites secondaires que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, et dont certains jouent le rôle de composés de défense pour la plante. Etant une phytohormone, cette molécule peut produire

des effets très diverses chez les plantes supérieures comme par exemple, une inhibition de la croissance en longueur des plantules et des racines, la germination des graines et du pollen et l'initiation des boutons floraux. A l'inverse, le MeJa favorise la production d'éthylène, accélère la sénescence et la chute des feuilles, induit la formation des tubercules et provoque la fermeture des stomates. Cet effet inducteur est souvent précédé d'une activation de l'expression des gènes ou de la synthèse d'enzymes, parmi lesquelles on trouve la phénylalanine ammonialyase (APL), la 4-coumarate-CoA ligase (4CL), la chalcone synthase (CHS), la dihydroflavonol-4-reductase (DFR), la phénol oxydase (PPO), la berceptol méthyl transférase (BMT), la tyrosine/dopa décarboxylase (TYDC) (Dittrich *et al.*, 1992 ; Gundlach *et al.*, 1992 ; Mizukami *et al.*, 1993 ; Tamari *et al.*, 1995 ; Ignatov *et al.*, 1996 ; Al Balkhi, 2008).

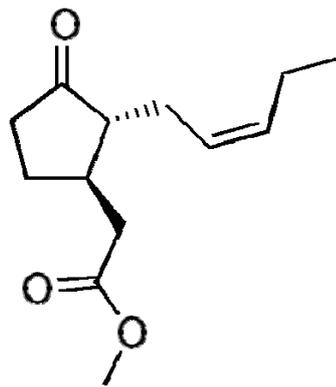


Figure 9 : Structure du méthyljasmonate (MeJa).

E - Voie de biosynthèse des alcaloïdes des Amaryllidaceae

1. Modes de couplage intramoléculaire de la 4'-O-méthylnorbelladine

La biosynthèse des alcaloïdes des Amaryllidaceae est assez complexe et peu de travaux ont été rapportés dans la littérature. Dans ses grandes lignes, elle découle d'un couplage oxydatif intramoléculaire qui intervient sur un précurseur du type $C_6C_2-N-C_1C_6$: la *O*-méthylnorbelladine. Selon que ce couplage est *para-ortho'*, *ortho-para'* ou *para-para'*, on distingue les différents types d'alcaloïdes: type Galanthamine, type Lycorine, type Lycorénine, type Tazettine, type Crinane et type Phénanthridine.

L'unité $N-C_6C_2$ est directement issue de la L-tyrosine alors que l'unité C_1C_6 trouve son origine dans la L-phénylalanine (Figure 10). Cette dernière est transformée en acide cinnamique puis hydroxylée et conduit à l'acide caféique. Après élimination de deux carbones, le 3,4-dihydroxybenzaldéhyde formé se condense avec la tyramine pour former la norbelladine puis la *O*-méthylnorbelladine sur laquelle interviendront les couplages oxydatifs précités.

Les travaux de Bastida et Viladomat (2002) chez *Narcissus*, ont permis d'établir une voie de biosynthèse des alcaloïdes chez les Amaryllidaceae (Lopez *et al.*, 2002) (Figure 10) à partir de leur précurseur commun : la *O*-méthylnorbelladine. Le couplage *para-ortho'* conduit à la *nor*-galanthamine, le couplage *ortho-para'* conduit à la galvésine et à la lycorine. Le couplage *para-para'* donne un composé intermédiaire qui conduit à la crinine ou à la marithidine. La méthylation de la *nor*-galanthamine conduit à la formation de la galanthamine. La narwédine est obtenue suite à la réaction d'oxydation intervenant sur la galanthamine.

Plusieurs travaux ont été menés auparavant, portant sur la biosynthèse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae (Barton et Cohen, 1957 ; Bernfeld P, 1963 ; Barton *et al.*, 1963 ; Eichhorn *et al.*, 1998 ; Herbert RB, 2001 ; Kornienko et Evidente, 2008). Barton et Cohen, 1957; Barton *et al.*, 1963 ont rapportés que tous les alcaloïdes des Amaryllidaceae sont considérés comme des dérivés d'un seul précurseur commun, la 4'-*O*-méthylnorbelladine, *via* un couplage intramoléculaire oxydo-phénolique (Barton et Cohen, 1957 ; Barton *et al.*, 1963). Il existe trois groupes différents d'alcaloïdes d'Amaryllidaceae qui sont biosynthétisés du même précurseur selon trois modes de couplage intramoléculaire oxydo-phénolique (Herbert RB, 2001 ; Kornienko et Evidente, 2008).

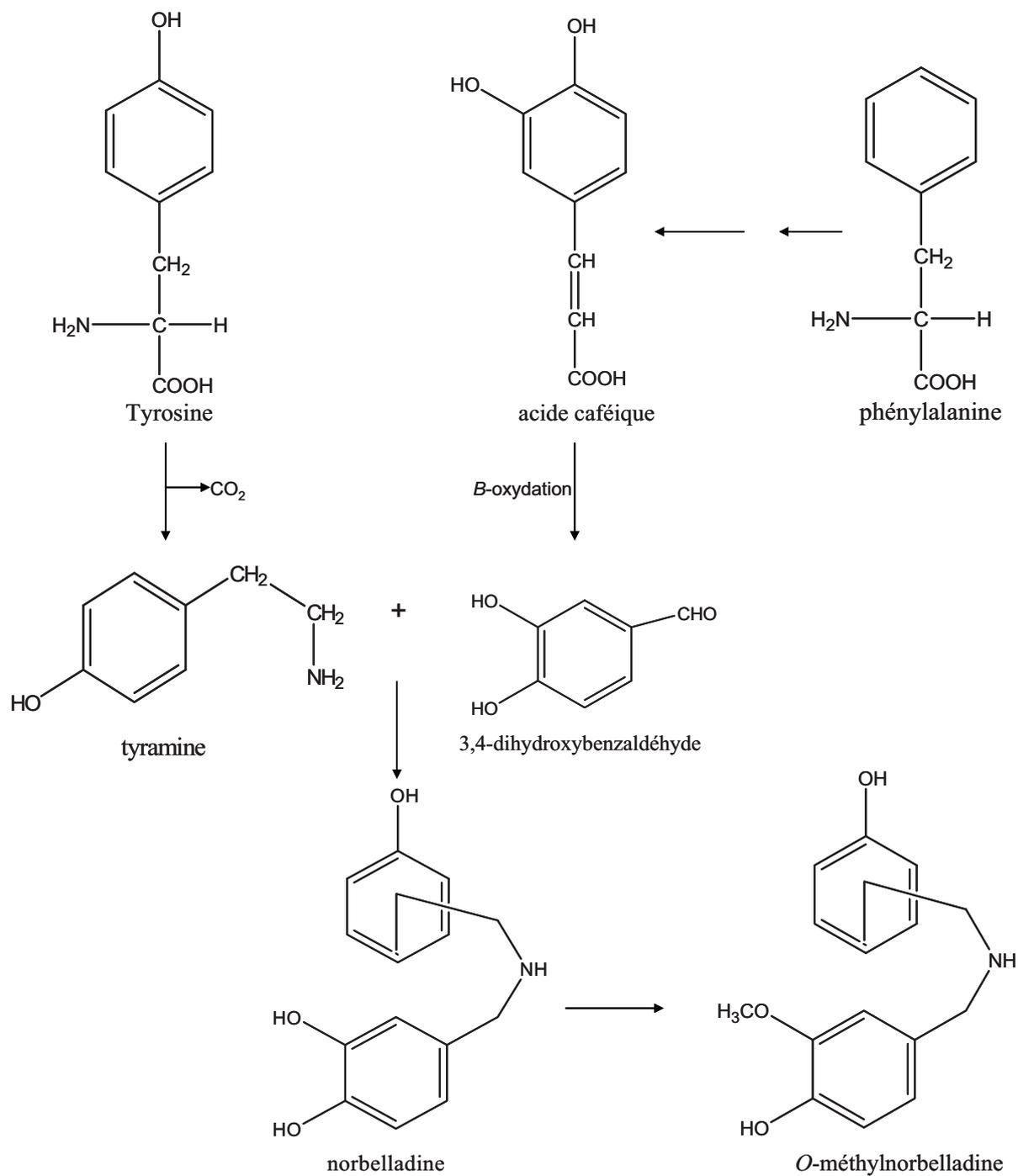


Figure 10 : Biosynthèse de la *O*-méthylnorbelladine chez les Amaryllidaceae (Richter G, 1993).

Le couplage oxydatif *para-ortho* donne lieu à une diénone qui se cyclise spontanément en déméthylnarwedine, qui grâce à une réduction stéréosélective se transforme en déméthylgalanthamine. Ensuite, la galanthamine est directement obtenue par *N*-méthylation de la déméthylgalanthamine. Alors que la narwédine, existe en équilibre avec la galanthamine, en raison d'une réaction de catalyse oxydoreductase réversible (Eichhorn *et al.*, 1998) (Figure 11).

Le couplage *Para-Para* résulte en une autre diénone qui en fonction du site d'addition de l'azote, donne lieu aux dérivés de marithidine et de crinine.

Enfin, un couplage *ortho-para*, conduit à la lycorine.

L'équipe d'Eichhorn a mis au point un autre modèle de biosynthèse de la galanthamine chez *L. aestivum* à l'aide de travaux basés sur la radioactivité de ces précurseurs. Ces travaux ont permis d'affirmer clairement, que la 4'-*O*-méthylnorbelladine était le précurseur commun de tous les alcaloïdes des Amaryllidaceae (Eichhorn *et al.*, 1998).

Néanmoins, la voie de biosynthèse de la galanthamine ainsi que les autres alcaloïdes des Amaryllidaceae, n'est pas très bien connue, surtout chez *Leucojum aestivum*. Lopez a établi le dernier schéma décrivant la synthèse de la galanthamine (Lopez *et al.*, 1998) (Figure 11).

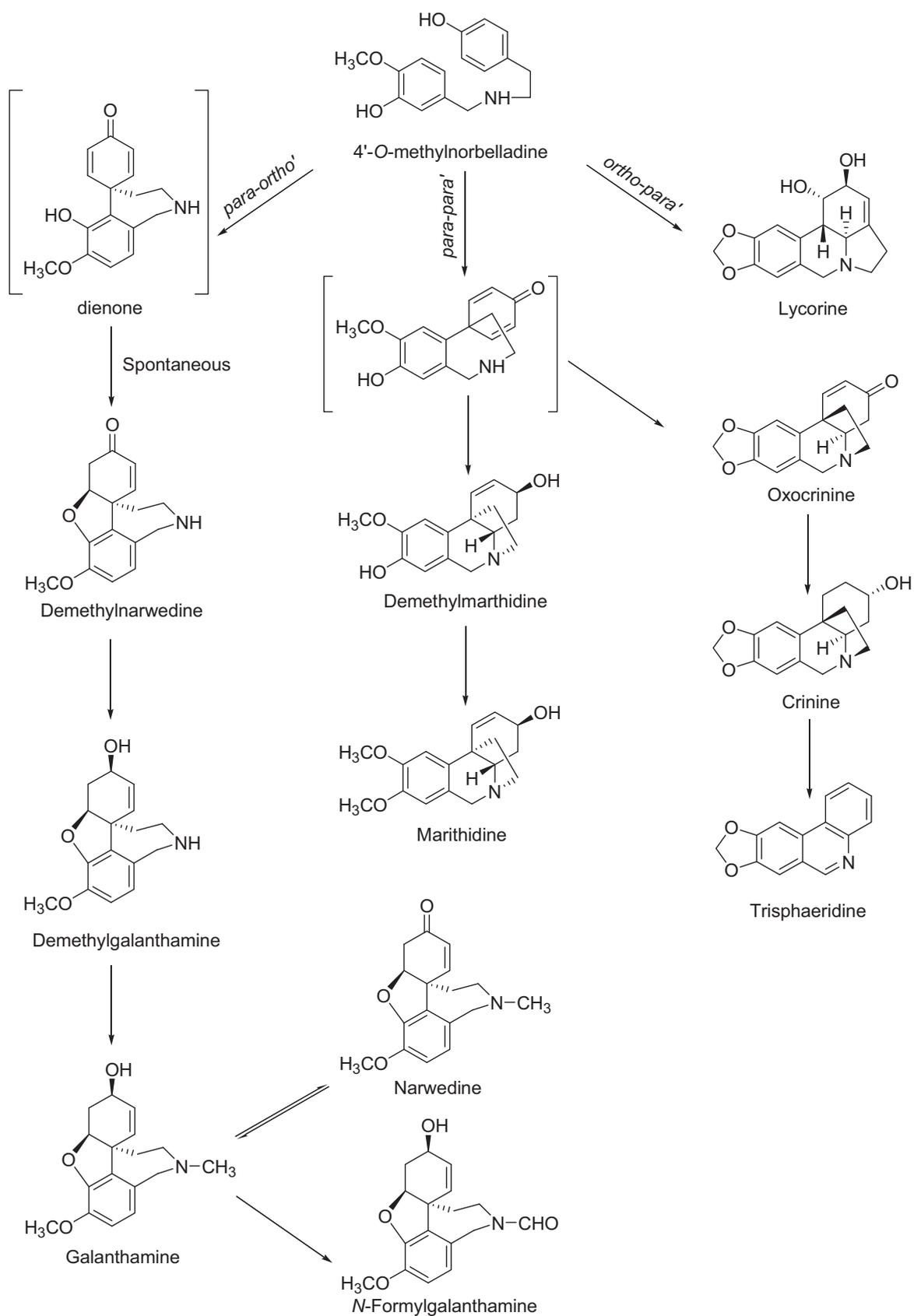


Figure 11 : Voie de biosynthèse des alcaloïdes chez *Narcissus* (Amaryllidaceae) d'après Bastida et Viladomat (2002) (Lopez *et al.*, 2002).

2. L'utilisation des précurseurs de biosynthèse

Quelque soient les nouvelles techniques qui apparaissent sur le flux, la recherche de nouveaux médicaments cliniques pour le traitement des maladies demeure toujours inévitable (Phillipson DJ, 2007). L'étude de la biosynthèse de ces alcaloïdes est donc indispensable pour envisager leur production par des procédés biotechnologiques.

La synthèse de la galanthamine a été réalisée pour la première fois en 1962 par Barton et ses collaborateurs. L'étape clé de ce procédé étant la cyclisation oxydative du phénol dont le rendement est seulement de 0,5 % (Barton et Kirby, 1962). De nombreuses équipes ont cherché à améliorer les rendements de ce procédé de synthèse pour permettre son utilisation à l'échelle industrielle; ainsi l'équipe de Czollner a obtenu un rendement de 45 à 50 % et l'équipe de Krikorian des rendements de 60 % (Czollner *et al.*, 1998 ; Krikorian *et al.*, 2000). Toutefois, malgré l'augmentation de ces rendements, ces procédés restent difficiles à mettre en œuvre à l'échelle industrielle. Aussi, plusieurs équipes ont essayé de mettre au point des synthèses de la galanthamine, de ses analogues et dérivés par des voies non biomimétiques. L'équipe d'Ishizaki M. décrit une synthèse par réaction radicalaire de la lycoramine, alcaloïde de la famille de la galanthamine (Ishizaki *et al.*, 1993). Suite à une analyse rétrosynthétique de la lycoramine (1,2-dihydrogalanthamine), les auteurs montrent que le composé de structure (B) ne peut conduire qu'à la synthèse totale de la lycoramine, en 3 étapes avec un rendement global de 13 %. Cet intermédiaire ne permet donc pas d'accéder à la galanthamine. Cette dernière et ses dérivés, comme la lycoramine se caractérisent par la présence d'un carbone quaternaire spirannique dont la création s'est révélée être l'étape limitant dans la synthèse totale. Vu la complexité de la synthèse chimique totale de cette molécule, on s'intéresse alors à sa synthèse biomimétique chez les plantes Amaryllidaceae en introduisant dans le milieu de culture des précurseurs biogènes marqués.

L'utilisation d'un précurseur de biosynthèse a pour objectif de forcer la voie de biosynthèse en augmentant le flux global des précurseurs vers la molécule recherchée. L'addition dans les milieux de culture des précurseurs de biosynthèse stimule la production de métabolites. De nombreuses publications font état de résultats positifs obtenus par ces différentes voies (Boitel-Conti *et al.*, 1996).

Boitel et ses collaborateurs ont montré en 2000 que l'ajout de phénylalanine dans le milieu de culture des racines de *Datura innoxia* influence l'accumulation d'hyoscyamine en présence du Tween 20TM (monolaurate de polyoxyéthylènesorbitol) (Boitel-Conti *et al.*, 2000). Ensuite, Lanoue et ses collaborateurs en 2002 ont poursuivi les expériences sur l'incorporation de Phényl[1-¹³C]alanine dans la voie de biosynthèse (Lanoue *et al.*, 2002). Ils ont montré que cette dernière s'incorpore dans la voie sans modifier l'accumulation des alcaloïdes en aval de la phénylalanine. Ainsi, l'ajout d'un précurseur de biosynthèse est un moyen efficace de suivre les étapes métaboliques de la synthèse des métabolites secondaires qui nous intéressent et ceci sans créer des modifications majeures dans la voie de biosynthèse.

Les alcaloïdes des Amaryllidaceae, sont considérés comme des dérivés d'un seul précurseur commun, la 4'-*O*-méthylnorbelladine (Barton et Cohen, 1957 ; Barton *et al.*, 1963). Des investigations sur la synthèse des alcaloïdes des Amaryllidaceae ont été rapportées, en marquant le précurseur commun, la 4'-*O*-méthylnorbelladine, au ¹⁴C et en l'introduisant aux cultures d'organes de plantes d'Amaryllidaceae ; ou en utilisant le marquage du même précurseur par le ¹³C ou par ³H₃C et en l'appliquant aux cultures d'organes de *Leucojum aestivum* (Barton et Cohen, 1957 ; Eichhorn *et al.*, 1998).

Le marquage par le carbone 13 est coûteux, du point de vue industriel ou recherche. Par exemple 250 mg du produit marqué L-phénylalanine (1-¹³C) correspond à 264 euros (Sigma-Aldrich). L'accumulation des alcaloïdes suite à l'ajout de la phénylalanine marquée apporte peu d'intérêt pour l'industriel, vu que la synthèse par voie chimique de la galanthamine requiert une somme très proche et comparable aux frais dépensés par les biotechnologies utilisant les molécules marquées au carbone 13.

1 L de deutérium hydride coûte 166,5 euros, ce qui est très avantageux pour l'industriel et pour la recherche. L'ajout des précurseurs biogènes deutérés n'a jamais été étudié chez *Leucojum aestivum*. Le marquage au deutérium de la 4'-*O*-méthylnorbelladine, précurseur commun aux alcaloïdes des Amaryllidaceae, permettra d'une part de suivre sa biotransformation avec le temps, et d'autre part d'identifier, grâce à la chromatographie couplée à la masse, les alcaloïdes dérivés comme la galanthamine et la lycorine, et de tracer ainsi les différentes étapes de la biosynthèse des alcaloïdes.

3. Rôle et localisation des enzymes et des Cytochromes P450s dans la synthèse des alcaloïdes des Amaryllidaceae

Bien qu'aujourd'hui les voies de synthèse des alcaloïdes soient relativement bien étudiées en chimie organique, leur biosynthèse dans la nature reste toutefois ambiguë de point de vue biologique. A chaque instant, des milliers de réactions chimiques différentes ont lieu dans une cellule. Les réactions sont toutes imbriquées en chaînes et réseaux dans lesquels le produit de l'une sert de substrat à la suivante.

Chaque biomolécule de nature chimique dans les organismes vivants possède son propre processus de synthèse, de transformation, et de conversion. Par conséquent, la formation de l'anneau de la molécule d'alcaloïde, et le débit de l'atome d'azote dans cette molécule, est le point de base pour comprendre le métabolisme et la synthèse des alcaloïdes. En outre, la synthèse des alcaloïdes est compliquée par la capacité de l'acide aminé de synthétiser de nombreux alcaloïdes différents. La présentation des voies de synthèse de base des alcaloïdes révèle clairement la diversité et la complicité de ce processus dans la nature. En outre, le grand nombre, de différents modes et voies de synthèse, illustre le statut des alcaloïdes comme un phénomène de l'activité métabolique des organismes.

De nombreuses voies anaboliques du métabolisme primaire sont régies par des complexes enzymatiques catalysant une séquence complète de réactions, comme par exemple le complexe pyruvate deshydrogénase, les enzymes de la glycolyse ou la β -oxydation des acides gras (Ovadi et Srere, 1996). Les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse et la dégradation des alcaloïdes ne sont pas toutes connues.

Bien que le niveau technique de la recherche dans les principaux laboratoires soit très élevé, la recherche des synthèses et des structures chimiques n'est pas simple. C'est un travail très complexe et coûteux (Tadeusz Aniszewski, 2007). Actuellement, les analyses des structures chimiques pures sont insuffisantes pour expliquer la synthèse des alcaloïdes en profondeur. Les réactions exigent beaucoup d'énergie dérivée du cycle de Krebs et, généralement de l'activité enzymatique. Les études sur les alcaloïdes utilisent généralement des méthodes d'analyses chimiques pour comprendre la nature de la construction et la taxonomie de ces composés. Ces méthodes chimiques sont aussi associées à des analyses biologiques et semi-biologiques pour pouvoir décrire l'activité biologique, le rôle et le comportement de ces molécules.

Il est bien connu que, les produits naturels sont biosynthétisés suite à une chaîne de réactions qui, avec peu d'exceptions, sont catalysées par des enzymes (Dewick PM, 2002 ; Waller et Dermer, 1981). Cela est particulièrement important dans le cas des alcaloïdes - biologiquement très actifs, comme la galanthamine. En outre, Simpkins soutient que la synthèse d'alcaloïdes est réglementée par un mécanisme lié à la stratégie enzymatique et que l'activité spécifique des enzymes clés impliquées dans une voie métabolique pourrait s'attendre à être élevée. Par conséquent, cette stratégie semble être l'un des points fondamentaux dans l'analyse des alcaloïdes (Simpkins I, 2000).

Récemment, Tadeusz Aniszewski a rapporté en 2007, qu'à partir de la l-tyrosine, ou alternativement de la l-phénylalanine, il existe une seule voie de biosynthèse des alcaloïdes. Il s'agit de la voie de biosynthèse de la galanthamine (Figure 12) (Tadeusz Aniszewski, 2007). Cette voie regroupe aussi la synthèse de la tyramine, norbelladine, lycorine, crinine, *N*-déméthylarwédine et *N*-déméthylgalanthamine. Base de Schiff, réaction de réduction, couplage oxydatif, enzyme NADPH et activité *S*-adénosylméthionine (SAM) interviennent dans cette voie de biosynthèse. Selon Tadeusz Aniszewski, la 4'-*O*- méthylnorbelladine est issue de la norbelladine, grâce à l'activité de la SAM. Ensuite elle est transformée en lycorine, crinine, et suite au couplage oxydatif elle est transformée en *N*-déméthylarwédine, substrat de l'enzyme dépendante du NADPH. La *N*-déméthylgalanthamine est transformée par la SAM pour synthétiser la galanthamine (Tadeusz Aniszewski, 2007).

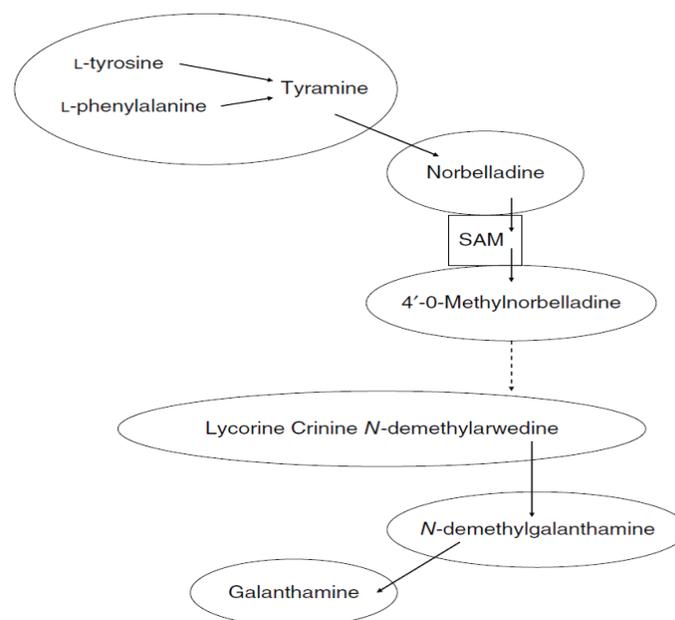


Figure 12: Voie de biosynthèse de la galanthamine selon Tadeusz Aniszewski (Tadeusz Aniszewski, 2007).

Pour comprendre la voie de biosynthèse des alcaloïdes et à terme produire ces molécules dans des système hétérologue, une étape clé va consister à identifier d'un point de vu moléculaire les gènes codant pour les enzymes catalysant chacune des étapes.

Des études récentes réalisées sur *Papaver somniferum* et *Coptis japonica*, ont permis de cloner des gènes codant pour des enzymes appartenant à la superfamille enzymatique des cytochromes P450s et intervenant dans la synthèse des alcaloïdes morphiniques. Des études réalisées *in vitro* ont mis en évidence que ces enzymes sont responsables du couplage phénolique transformant la *N*-méthylcoclaurine en berbamunine (CYP80A1), et la réticuline en corytuberine (CYP80G2) ou salutaridine (salutaridine synthase) (Ikezawa *et al.*, 2008 ; Gesell *et al.*, 2009). Cette réaction est chimiquement très proche du couplage phénolique transformant la 4'-*O*-méthylnorbelladine en diénone. Ces observations vont dans le sens d'une hypothèse émise par Eichhorn *et al.* en 1998. Cette hypothèse stipulait que l'étape clé de la formation de la galanthamine, qui était le couplage phénolique de la 4'-*O*-méthylnorbelladine pour donner une diénone (Figure 13), pouvait être catalysée par des Cytochromes P450s (Eichhorn *et al.*, 1998). Cette hypothèse a été formulée était basée sur les travaux menés par Zenk en 1989 et Kutchan en 1995 sur la biosynthèse des alcaloïdes morphiniques. En effet, ces auteurs ont montré que le couplage intramoléculaire *para-ortho'* de la (R)-réticuline conduisant à la salutaridine diénone est catalysé par une enzyme à Cytochrome P450, la salutaridine synthétase (Zenk MH, 1989 ; Kutchan TM, 1995).

L'étape de formation de la diénone à partir de la 4'-*O*-méthylnorbelladine représente un objectif primordial à atteindre afin de pouvoir réaliser une synthèse biomimétique de la galanthamine. Il est très important de comprendre cette réaction clé et de rechercher la ou les enzymes impliquées dans la transformation du précurseur commun en diénone.

Des modèles de biologie moléculaire peuvent être construits pour la biosynthèse de chaque alcaloïde. La recherche sur les alcaloïdes dans le domaine de la biologie moléculaire est très révélatrice. Elle peut contribuer à des résultats qui pourront servir à la construction des modèles biogénétiques des alcaloïdes. Aujourd'hui, seuls quelques gènes du métabolisme des alcaloïdes sont connus.

Avant d'initier la recherche des gènes codants pour des cytochromes P450s potentiellement impliqués dans la voie de biosynthèse de la galanthamine chez *Leucojum* et *Narcissus*, les deux plantes modèles du laboratoire, nous avons initié des expérimentations

préliminaires. Les cytochromes P450s sont majoritairement des enzymes membranaires associées étroitement avec le réticulum endoplasmique. Une première étape va donc consister à vérifier que la métabolisation de la Norbelladine peut être réalisée en présence de microsomes préparés à partir de bulbes de *Leucojum*. Lorsque cette étape aura été caractérisée, nous vérifierons l'implication des cytochromes P450s dans la réaction en inhibant la réaction avec des inhibiteurs spécifiques de ces enzymes. Enfin, dans une troisième étape, nous initierons la recherche du ou des gènes par des approches de biologie moléculaire basées sur la PCR et la présence de séquences consensus conservées chez cette superfamille d'enzyme.

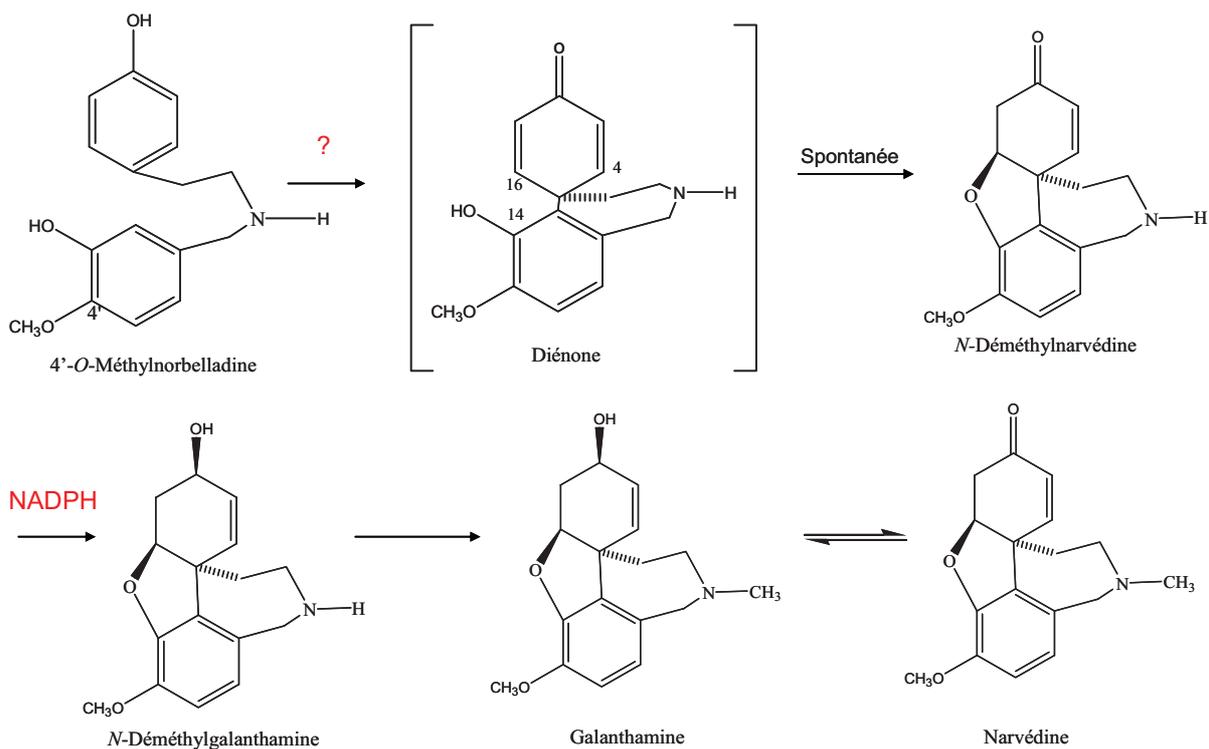


Figure 13 : Voie de biosynthèse de la galanthamine chez *L. aestivum* d'après Eichhorn *et al.*, 1998, et Tadeusz Aniszewski, 2007.

Matériels et Méthodes

1. Obtention du matériel chimique

Les précurseurs (acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC)), les inhibiteurs d'éthylène (thiosulfate d'argent (STS) et nitrate d'argent (AgNO₃)), les capteurs d'éthylène (permanganate de potassium (KMnO₄)), le méthyljasmonate (MeJa, 95 % de pureté), le méthanol d'extraction (MeOH), l'acétonitrile (qualité HPLC, 99 % de pureté), les témoins de galanthamine et de lycorine (99 % de pureté), les auxines et les cytokinines proviennent de Sigma-Aldrich. Le tampon d'acétate Triéthylammonium (TEAA) provient de Fluka Biochemika.

a. Obtention de l'isovanilline-d₃ et de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelleadine

La procédure générale de synthèse comprend d'abord une purification des solvants. Les points de fusion sont mesurés à l'aide d'un appareil Reichert Kofler. Les spectres infrarouges sont enregistrés par un spectromètre Perkin-Elmer spectrum 1000 FT-IR. Les spectres RMN ¹H et ¹³C sont enregistrés par un spectromètre AC250 Bruker 250 MHz et 62.9 MHz respectivement. Les analyses MS du 3-hydroxy-4-methoxy-d₃-benzaldéhyde sont réalisées en mode CI (Chemical Ionisation) à l'aide de l'appareil QP2010 Shimadzu. Les analyses MS de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelleadine sont effectuées en mode ES (electrospray) par un appareil micotoF_QTM (Bruker Daltonics). Thermofinnigan FlashEA 1112 a servi pour les analyses élémentaires au service commun de microanalyse-Nancy. Les essais chromatographiques sont réalisés sur Gel Silica SI60 (63-200 μm – Merck). Les étapes de la synthèse des précurseurs deutérés seront décrites dans la partie résultats et discussion.

b. Obtention de la galanthamine deutérée et de la déméthylnarwédine native

La galanthamine deutérée et la déméthylnarwédine ont été synthétisées par le Dr. Catherine Guillou à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN), GIF SUR YVETTE. La synthèse est réalisée selon le protocole décrit par Rouleau *et al.*, 2008.

2. Obtention du matériel végétal

Les bulbes de *L. aestivum* (N° 911371), *Galanthus elwesii* (N° 20100274), et *Narcissus pseudonarcissus* « Carlton » (N° 820570) ont été achetés dans le commerce (Graines Baumaux, Nancy) (Figure 14). Les espèces ont été enregistrées et déposées à l'herbier du Jardin Botanique du Montet à Vandoeuvre-Lès-Nancy.



Figure 14 : Bulbes de *Leucojum aestivum* L. achetés dans le commerce (Graines Baumaux, Nancy).

Les espèces *Pancratium maritimum* (Figure 15a), et *Narcissus poeticus* (Figure 15b), ont été récoltées au Liban en février 2010, respectivement à Jyeh et à Barty (Figure 16). L'espèce *Narcissus tazetta* (Figure 15c), a été récoltée à la réserve de Tyr (Figure 16) par le Dr. Magda Abou Dagher-Kharrat (Faculté des Sciences-Université Saint Joseph-Beyrouth). L'espèce *Pancratium tortuosum*, a été récoltée au Soudan par le Dr. Sakina Yagi. L'identification des espèces a été vérifiée par le Pr. Max Henry au groupe SUCRES.



Figure 15 : Bulbes des espèces d'Amaryllidaceae provenant du Liban. a) *Pancratium maritimum* récoltée à la plage de Jyeh au Chouf; b) *Narcissus poeticus* récoltée à Barty (à 500 m d'altitude à l'Est de Saïda, capitale du Sud) ; c) *Narcissus tazetta* récoltée à la réserve de Tyr (Liban Sud).



Figure 16 : Carte du Liban avec en rouge, les régions où les espèces d'Amaryllidaceae ont été récoltées.

3. La culture *in vitro* des Amaryllidaceae

a. Préparation et stérilisation des explants

Les cultures *in vitro* ont été initiées à partir de bulbes de *Leucojum aestivum*, *Galanthus elwesii*, et *Narcissus pseudonarcissus* qui sont disponibles uniquement du mois de Septembre au mois de Novembre. Ce matériel est donc disponible pendant une courte période de l'année.

Les Bulbes *in vivo* achetés dans le commerce ou récoltés dans la nature sont conservés à 4 °C, et ont servi pour initier les cultures *in vitro*. Chaque bulbe aura deux utilisations distinctes :

- La partie la plus interne (Figure 17), constituée essentiellement des tissus les plus jeunes et les moins organisés, a servi à l'établissement des cultures de tissus *in vitro*.
- Le reste du bulbe (Figure 17) est récupéré, et conservé au congélateur (- 20 °C) dans un sachet en papier, portant le même code que la première partie destinée aux cultures *in vitro*. Cette partie a servi ultérieurement à l'analyse phytochimique des bulbes *in vivo*, afin de pouvoir toujours comparer le contenu en alcaloïde initial dans le bulbe *in vivo*, et celui des tissus *in vitro* dont ils sont issus.



Figure 17 : Séparation des parties centrales les moins différenciées, cibles pour la culture *in vitro* des tissus d'Amaryllidaceae.

Avant la mise en culture, les explants doivent subir un protocole de stérilisation (Figure 18). Nous avons suivi le protocole mis au point par Diop *et al.*, 2006. Après avoir enlevé l'écorce, les feuilles fines, s'agissant de la partie la plus centrale et la moins différenciée du bulbe, sont retirées avec précaution et mises à tremper dans de l'eau stérile afin d'éviter leur dessèchement. Ensuite elles sont immergées dans de l'éthanol 70 % pendant environ 30 secondes, puis dans une solution de Domestos[®]/eau distillée (50 mL/250 mL) pendant environ 10 minutes sous agitation à 150 rpm.

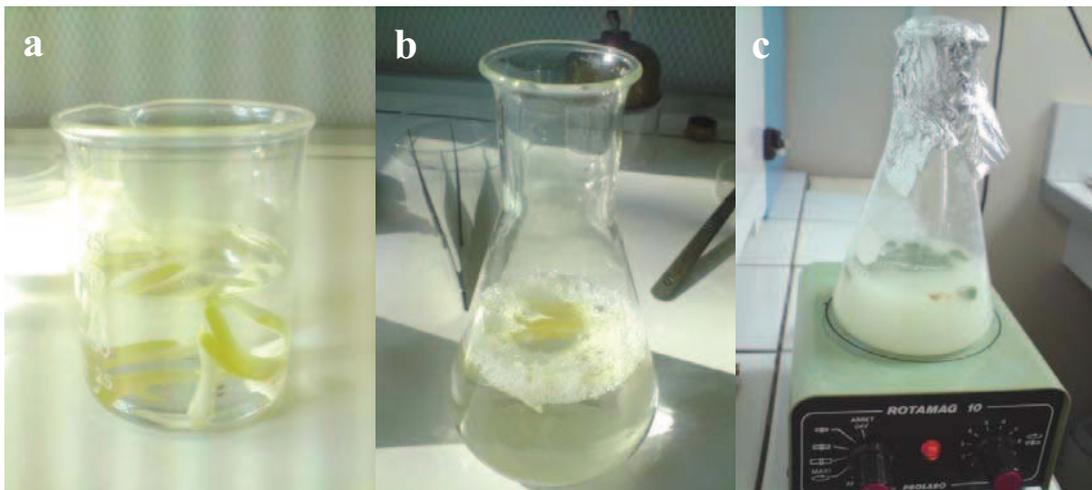


Figure 18 : Etapes de stérilisation des explants. a) Contact pendant 30 s avec l'éthanol 70 % ; b-c) Agitation pendant 10 min dans une solution de Domestos[®]/eau distillée (50 mL/250 mL).

b. Mise en culture des explants

Avant d'être mises en culture, les feuilles sont rincées par 3 bains successifs d'eau stérile pendant quelques minutes chacun, afin d'éliminer toute trace de détergent (Figure 19a).

Après trois rinçages successifs à l'eau distillée stérile, les tissus végétaux sont découpés en explants de 3-5 mm (Figure 19b). Ces explants sont ensuite mis en culture sur milieu solide Murashige et Skoog (MS) additionné de saccharose, et de régulateurs de croissance. Les cultures sont ensuite maintenues à 25 °C, à l'obscurité et les subcultures ont lieu toutes les 4 semaines.

Les manipulations du matériel biologique se font de manière stérile et aseptique sous hotte à flux laminaire (ADS de type U12, débit en charge environ 100 Pascals) à l'aide d'instruments (pinces, scalpels, etc..) stérilisés dans un four à 220 °C pendant 120 min, et

flambés avant l'utilisation. Les milieux de culture solides et liquides servant lors des manipulations sont stérilisés par autoclavage à 120 °C sous une pression de 2 bars pendant 20 minutes. Les produits thermolabiles utilisés pour ces cultures, comme les antibiotiques, et les précurseurs biogénétiques sont ajoutés dans les milieux de culture après autoclavage, par microfiltration à travers des filtres stérilisants (filtre millipore 0,22 µm).

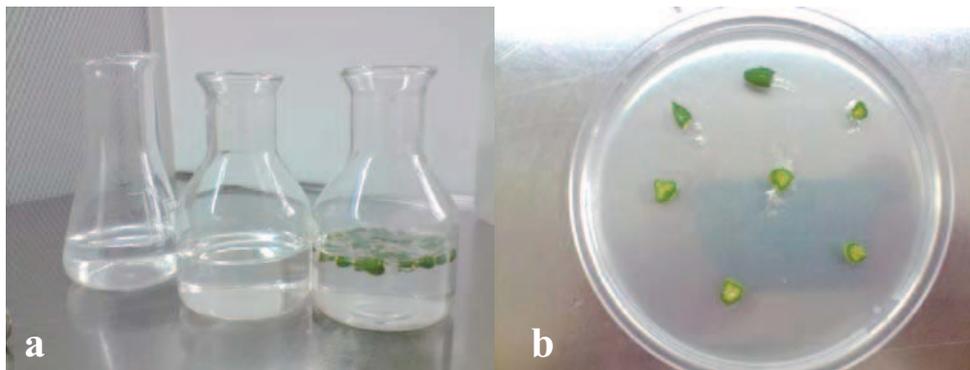


Figure 19 : a) Rinçage par 3 bains successifs d'eau stérile ; b) Mise en culture des explants (3-5 mm) sur milieu solide.

c. Composition des milieux de culture

Pour toutes les étapes de culture *in vitro* les mises en culture ont été réalisées sur un milieu de base Murashige & Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962) solide ou liquide, additionné de saccharose, des antibiotiques et des phytorégulateurs dont les concentrations changent selon le matériel végétal cultivé en vue d'obtenir divers matériels producteurs de galanthamine. La composition du milieu de base est donnée dans l'annexe 2.

- Initiation des cals embryogènes : MS + 30 g/L de saccharose + 25 µM piclorame + 0,5 µM BAP ; les cultures sont maintenues à 25 °C à l'obscurité.
- Initiation des bulbilles : MS + 60 g/L de saccharose + 10 µM ANA + 5 µM BAP ; les cultures sont maintenues à 25 °C à l'obscurité.

L'agar à 8 g/L (Sigma - Aldrich), nécessaire pour la solidification des milieux de culture, et les phytorégulateurs sont ajoutés avant l'autoclavage.

d. Stérilisation et préparation des milieux de culture et du matériel expérimental

Les milieux de culture (MS) sont stérilisés par autoclavage à 120 °C sous une pression de 1 bar pendant 20 minutes. Pour les milieux solides, ils sont coulés dans des boîtes de Pétri (9 cm de diamètre), dans des conditions aseptiques sous une hotte à flux laminaire. Chaque boîte doit contenir environ 20-25 mL de milieu qui sera refermée après solidification, libellée et stockée à la température ambiante jusqu'à son utilisation. Elles sont utilisées au maximum 1 mois après leur préparation pour les cultures des tissus végétaux. Tandis que pour les milieux de culture liquides exemptés d'agar, ils sont directement stockés après autoclavage, à la température ambiante à l'obscurité.

e. Optimisation du milieu de culture

Dans le but d'optimiser le milieu et les conditions conduisant à un meilleur développement des tissus (survie, callogenèse et organogénèse), nous avons choisi d'étudier l'effet combiné du charbon actif, du saccharose et des régulateurs de croissance ajoutés aux milieux de culture des Amaryllidaceae. Les études ont été réalisées sur les espèces de *Narcissus* et de *Galanthus*, en établissant un plan d'expérience et en faisant varier 4 facteurs en 21 expériences. Ces facteurs s'agissent de la variation des concentrations de 4 éléments, saccharose, BAP, 2,4-D et charbon (Tableau 1).

Une matrice de Doehlert (Tableau 1), un outil mathématique, est utilisée pour étudier les interactions entre les différents facteurs et pour obtenir un maximum d'information et de précision à partir d'un nombre réduit d'expériences.

Nous avons choisi de faire varier les concentrations des quatre variables suivantes :

- le saccharose, de 0 à 120 g/L;
- deux phytorégulateurs (la BAP et le 2,4-D), de 0 à 20 µM ;
- et le charbon, de 0 à 10 g/L.

Pour chaque facteur, plusieurs réponses sont mesurées après plusieurs mois de culture:

- la survie, exprimée en pourcentage d'explants vivants;
- la callogenèse, exprimée en nombre moyen de cals par explant « survivant » ;
- l'organogénèse, exprimée en nombre moyen de bulbes (ou de racines) par explant « survivant ».

A partir de ces valeurs extrêmes, définies initialement pour chaque facteurs, le logiciel Nemrod[®] détermine les différents niveaux que ces variables (ou facteurs) vont prendre et leur combinaison. Le logiciel Nemrod[®] est utilisé pour analyser les données. On obtient une représentation polynomiale de la fonction réponse (qui n'est valable qu'à l'intérieur du domaine expérimental) du type : $Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j$

Où β_0 est une constante, les β_i sont les coefficients linéaires de premier ordre, les β_{ii} sont les coefficients quadratiques, et les β_{ij} sont les coefficients de second ordre (interactions). L'extrapolation de cette fonction réponse à l'extérieur du domaine conduit à un modèle théorique. Il est donc important de bien définir le domaine expérimental.

Tableau 1 : Matrice de Doehlert pour les quatre variables (saccharose, BAP, 2,4-D et charbon), incluant quatre expériences au centre du domaine (n° 21 à 24)

N° Expérience	Saccharose (g/L)	BAP (μ M)	2,4-D (μ M)	Charbon (g/L)
1	120	10,00	10,00	5
2	0	10,00	10,00	5
3	90	20,00	10,00	5
4	30	-0,00	10,00	5
5	90	-0,00	10,00	5
6	30	20,00	10,00	5
7	90	13,33	20,00	5
8	30	6,67	-0,00	5
9	90	6,67	-0,00	5
10	60	16,67	-0,00	5
11	30	13,33	20,00	5
12	60	3,33	20,00	5
13	90	13,33	12,50	10
14	30	6,67	7,50	0
15	90	6,67	7,50	0
16	60	16,67	7,50	0
17	60	10,00	17,50	0
18	30	13,33	12,50	10
19	60	3,33	12,50	10
20	60	10,00	2,50	10
21	60	10,00	10,00	5
22	60	10,00	10,00	5
23	60	10,00	10,00	5
24	60	10,00	10,00	5

f. Ajout du saccharose et des phytorégulateurs

Dans le but de choisir les meilleures concentrations de saccharose et de régulateurs de croissance conduisant à une meilleure accumulation des alcaloïdes, nous avons complété le travail en variant l'ajout du saccharose et la nature des phytorégulateurs chez les deux espèces citées ci-dessus, et chez *Leucojum aestivum*. Deux milieux de culture basaux ont été choisis :

- MSA (10 µM 2,4-D + 10 µM BAP) : pour l'étude de l'effet du saccharose (0, 30, 60, 90 et 120 g/L),
- MSB (60 g/L saccharose + 10 µM BAP) : pour l'étude de l'effet des régulateurs de croissance (10 µM 2,4-D, piclorame, ou ANA).

Les cultures de *Narcissus* et de *Galanthus* ont été initiées en présence de lumière, alors que les cultures de *Leucojum* ont été maintenues à l'obscurité. La température de stockage est maintenue constante à 25 °C.

Chez *L. aestivum*, en plus des auxines étudiées ci-dessus, plusieurs types de cytokinines ont été testés postérieurement, et qui sont :

- Zéatine (9-(oxan-2-yl)purin-6-amine),
- Méta-topoline (6-(3-hydroxybenzylamino)-purine),
- Thidiazurone 1-fényl-3-(1,2,3-tiadiazole-5-yl)urea,
- et Kinétine (6-furfurylaminopurine).

Après 4 mois de culture, les explants ont subi un protocole d'extraction et les extraits ont été analysés en HPLC, GCMS et LCMS afin d'évaluer l'influence des facteurs sur l'accumulation et la diversité des alcaloïdes.

g. Ajout des précurseurs, inhibiteurs ou capteurs de l'éthylène aux cultures *in vitro* de *L. aestivum*

Pour cette étude, les cultures de cals de *Leucojum aestivum* ont été initiées en Pologne par Dr. Ptak Agata (Department of Plant Breeding and Seed Science, Agricultural University, 31-140 Krakow, Poland).

Les cals ont été cultivés sur un milieu de base MS30 additionné de 25 µM piclorame et 0,5 µM BAP. Un précurseur (ACC), des inhibiteurs (STS et AgNO₃), ou un capteur d'éthylène (KMnO₄) ont été ajoutés au milieu de base, selon des concentrations diverses. L'ACC, le STS et l'AgNO₃ ont été ajoutés après filtration 0,22 µm, et après autoclavage du milieu de culture. Le KMnO₄ est introduit sous forme solide, où une masse de 4,5 g a été placée dans un tube ouvert au sein de l'atmosphère des cultures *in vitro*. Les cultures ont été maintenues à l'obscurité et à 25 °C, des repiquages ont été faits toutes les 4 semaines.

Après 6, 10 et 16 semaines de culture, nous avons observé la transformation des explants en cals nodulaires embryogènes. Le pourcentage et l'intensité de la callogénèse ont été évalués à l'aide du test Ducan. Les cals sont ensuite lyophilisés. Après une étape d'extraction, les extraits obtenus sont injectés en HPLC, LCMS ou GCMS.

h. Ajout du méthyljasmonate aux cultures de cals et de bulbilles *in vitro* de *L. aestivum*

Le méthyljasmonate (MeJa) a été ajouté aux cultures de cals embryogènes, et des bulbilles *in vitro* de *Leucojum aestivum*.

Pour l'étude chez les cals embryogènes, les essais ont été réalisés avec 6 durées de métabolisation (0, 2, 5, 10, 24, et 31 heures) et 6 concentrations de MeJa (0, 50, 100, 150, 200 et 300 µM).

Pour l'étude de l'effet éliciteur du MeJa chez les bulbilles *in vitro* de *Leucojum aestivum*, les essais ont été réalisés avec 4 durées de métabolisation (0, 2, 5, et 10 heures), et 4 concentrations de MeJa (0, 50, 100 et 150 µM).

Le MeJa acheté dans le commerce sous forme liquide, a été filtré sur filtre stérile (0,22 µm) et ajouté directement aux cultures à temps 0 d'incubation (t_0). Les cultures ont été maintenues stérilement dans une étuve sous agitation à 150 rpm, et à 23 °C à l'obscurité, et sont arrêtées selon la durée d'incubation souhaitée.

À l'issue de chaque incubation avec le MeJa selon les temps précis, les cals et les bulbilles *in vitro* sont séparés de leur milieu de culture par centrifugation. Le culot est pesé afin de contrôler l'éventuelle toxicité du MeJa. A chaque fois, le milieu de culture et les cellules subissent un protocole d'extraction méthanolique afin d'extraire les alcaloïdes et de les doser par chromatographie. Les concentrations d'alcaloïdes sont ensuite déterminées dans les tissus et dans les milieux par HPLC, et ensuite par LCMS.

i. Ajout de la 4'-O-méthyl-d₃-norbélladine aux cultures de cals de *L. aestivum*

2 g de cals embryogènes sont mis en culture dans les Erlenmeyers de 100 mL contenant 20 mL de milieu MS30 additionné de 25 µM de 2,4-D et de 0,5 µM de BAP.

La 4'-O-méthyl-d₃-norbélladine a été synthétisée dans notre groupe SUCRES de l'UMR 7565 – CNRS UHP Nancy-1 par le Dr. Michel Boisbrun, après modification du mode opératoire décrivant la synthèse de la molécule non deutérée par Szewczyk *et al.*, 1988. L'ajout de la 4'-O-méthyl-d₃-norbélladine deutérée intervient au premier jour de subculture à des concentrations de 0,02.10⁻³; 0,07.10⁻³; et 0,15.10⁻³ g/L. Des témoins ainsi que trois répétitions pour chaque concentration ont été établis. Les cultures sont maintenues à l'obscurité, à 25 °C et sous agitation orbitale (150 rpm) pendant 28 jours.

À la fin de chaque cycle de culture, les cellules et leurs milieux de culture sont lyophilisés et réduits en poudre. Après l'extraction méthanolique, chaque extrait est filtré sur filtre méthanol (0,45 µm) et directement injecté en HPLC et LCMS pour déterminer à chaque fois, dans les extraits cellulaires et leur milieux de culture, le contenu en galanthamine et lycorine deutérées et natives, ainsi que la présence et le relargage de différents autres alcaloïdes issus du même précurseur.

j. Ajout des précurseurs deutérés aux cultures *in vitro* de bulbes de *L. aestivum*

2 g de bulbilles sont mis en culture dans les erlenmeyers de 100 mL contenant 20 mL de milieu MS60 additionné de 10 µM d'ANA et de 5 µM de BAP. Les cultures sont maintenues à l'obscurité, à 25 °C et sous agitation orbitale (150 rpm) pendant 40 jours.

Les précurseur deutérés (isovanilline-d₃ (D3ISO) et 4'-O-méthyl-d₃-norbélladine (D3MN)) ont été ajoutés dans le milieu liquide des bulbes *in vitro* (bulbilles) de *Leucojum aestivum* au premier jour de subculture à des concentrations 0,05 ; 0,1 ; et 0,2 g/L de chacun. Des témoins ainsi que trois répétitions pour chaque concentration ont été établis.

Le protocole est conduit avec des arrêts des incubations aux jours 0, 15, 30 et 40. Pour pouvoir évaluer la biomasse en fonction du temps, en présence et en absence de chacun des précurseurs, les bulbilles sont récupérés, après rinçage trois fois successives à l'eau stérile, ensuite séchés pour enlever le milieu de culture, puis pesés. Les cellules et leurs milieux de culture sont lyophilisés, réduits en poudre, avant de subir une extraction méthanolique.

Chaque extrait est filtré sur filtre méthanol (0,45 µm) et directement injecté en HPLC et LCMS pour déterminer à chaque fois, dans les extraits de bulbilles et leurs milieux de culture, le contenu en galanthamine, et en lycorine deutérées et natives, ainsi que la présence et le relargage de différents alcaloïdes issus du même précurseur.

4. Etude phytochimique et dosage des alcaloïdes des tissus *in vitro* et *in vivo* d'Amaryllidaceae

a. Méthode d'extraction des alcaloïdes des Amaryllidaceae

L'extraction est réalisée à la fois sur du matériel végétal *in vivo* et *in vitro* des espèces d'Amaryllidaceae différentes et de leurs milieux de culture. Ces trois espèces sont : *Leucojum aestivum* ; *Galanthus elwesii* ; *Narcissus pseudonarcissus* (Carlton) ; *Narcissus poeticus*, *Narcissus tazetta* ; *Pancratium tortuosum* ; et *Pancratium maritimum*.

Nous avons suivi le protocole d'extraction (Figure 20) adapté aux espèces ci-dessus et utilisé précédemment au laboratoire pour des analyses de *Leucojum aestivum* (Diop *et al.*, 2007) ; de *Narcissus carlton* et de *Galanthus elwesii* (Bordage S, 2008).

Tout matériel, avant de subir un protocole d'extraction, doit être congelé à -20 °C, étape essentielle pour sa lyophilisation.

Après son stockage à -20 °C, le matériel est ensuite lyophilisé durant au moins 48 heures, broyé et réduit en poudre. 1 g de matière sèche est mis au contact de 10 mL de méthanol (MeOH) pendant 24 heures, intercalés de plusieurs vortex, et comprenant 1 h 30 minutes de sonication.

Après décantation, les extraits sont ensuite filtrés sur filtre MeOH (RC – VILIESVERSTÄRKT 1840-13-K ; 0,45 µm). Le filtrat de chaque extrait est directement injecté pour les analyses chromatographiques.

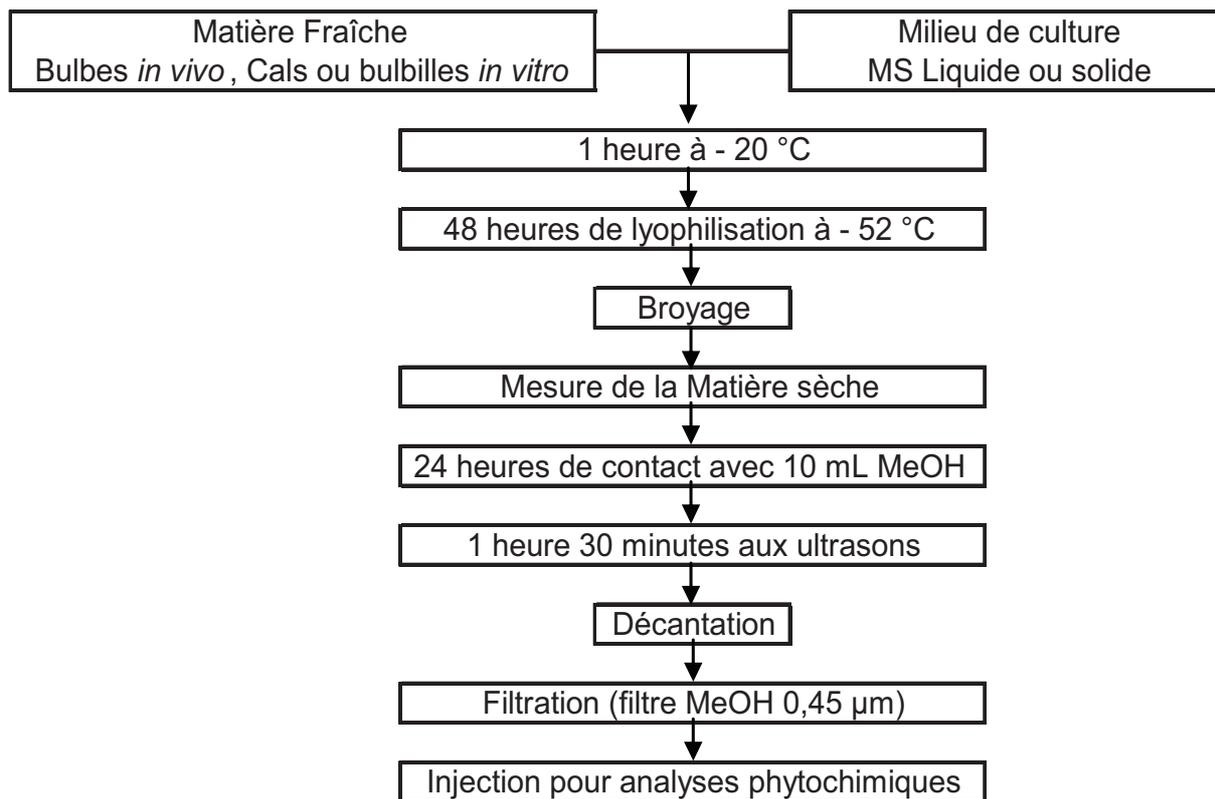


Figure 20: Protocole d'extraction méthanolique des alcaloïdes à partir des plantes *in vivo*, ou des cultures *in vitro* et de leur milieu de culture.

b. Analyses des alcaloïdes par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Afin de quantifier et de cribler les alcaloïdes dans les extraits *in vivo* et *in vitro* des différentes espèces nous avons eu recours à une méthode chromatographique en phase inverse ; la chromatographie liquide à haute performance.

La chromatographie liquide à haute performance ou haute pression (HPLC) utilise des phases stationnaires de très fine granulométrie et permet la mise en œuvre de tous les principes chromatographiques (partage, échanges d'ions ...). La séparation se fait grâce aux différences de solubilité entre la phase mobile (appelée éluant) et la phase stationnaire. Ces différences dépendent de la polarité ou de l'hydrophobicité respective de la phase mobile (polaire), de la phase stationnaire (apolaire) et des molécules à séparer.

Contrairement à la chromatographie de phase normale, en chromatographie à phase inverse la phase stationnaire est non polaire et la phase mobile modérément polaire. Les molécules qui sont plutôt non polaires en nature ont une rétention allongée et des molécules polaires s'éluent plus rapidement.

Conditions chromatographiques :

Nos analyses ont été réalisées en phase inverse avec un système de gradient comprenant les éléments suivants :

- une colonne de silice (de type C18 Platinum (250 x 4,6 mm, 100 Å) remplie de particules de 5 µm de diamètre (Altech))
- deux pompes à solvant de type LC-10ATVP (Shimadzu)
- un injecteur constitué d'une vanne Rhéodyne équipée d'une boucle d'injection de 10 µL
- un détecteur UV de type SPD-M10A VP (Shimadzu) réglé à 280 nm (lampe deutérium)
- et d'un enregistreur-intégrateur Class-VP (Shimadzu).

- Phase mobile :

Solvant A : Tampon d'acétate Triéthylammonium (TEAA, Fluka Biochemika) 30 mM

Solvant B : 70 % Acétonitrile pur (qualité HPLC) + 30 % du solvant A

- Phase stationnaire: Colonne de silice (C18 Platinum ; 250 x 4,6 mm, 100 Å) thermostatée dans un four à 45 °C.

Nous nous sommes d'abord basés sur le programme mis au point par Diop *et al.*, 2006 auquel ensuite nous avons subi diverses modifications. Les conditions chromatographiques finales sont détaillées dans le chapitre I des résultats et discussions.

c. Analyses des alcaloïdes par chromatographie liquide à haute résolution couplée à la spectrométrie de masse électrospray (LC/ESI-MS et LC/ESI-HRMS)

La séparation des extraits a été réalisée, dans un premier temps, par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse couplée à un détecteur UV à barrettes de diodes. Afin de confirmer les pics et les concentrations obtenues nous avons eu recours à cette méthode plus précise que l'HPLC et à haute résolution. Les solutions d'extraits méthanoliques (1 µL) ont donc été injectées en LCMS sur une colonne Acclaim PepMap C18 ID 1 mm (150 mm x 3 µm x 100 Å).

L'éluion a été conduite à un débit de 40 µL/min en utilisant un système de gradient de 36 min décrit par De Jong *et al.*, 2006 (Tableau 2) :

- Système : U3000-Dionex microTOFLCTM – System (Bruker Daltonics)
- Source d'Ion : ESI-Apollo Source (Bruker Daltonics)
- Débit : 40 µL/min
- Volume d'injection : 1 µL
- Gradient: Solvant A (97,5 % Tampon bicarbonate d'ammonium (NH₄HCO₃) 10 mM + 2,5 % MeOH) pH 7,8.
Solvant B (2,5 % Tampon bicarbonate d'ammonium (NH₄HCO₃) 10 mM + 97,5 % MeOH) pH 7,8.

Tableau 2: Gradient d'éluion LCMS adapté à la séparation des alcaloïdes des Amaryllidaceae.

Time (min)	0	1	30	31	36	37	45
Solvent A	100	100	50	0	0	100	100
Solvent B	0	0	50	100	100	0	0

Les spectres de masse ESI-HRMS (Électrospray Ionisation Haute Résolution) en mode d'ionisation positif ont été obtenus sur un Q-TOF (microTOF_QTM Bruker Daltonics). Ce spectromètre de masse hybride qui associe un analyseur quadripole (Q) et un analyseur temps de vol avec réflectron (TOF-R) permet de disposer de la haute résolution (accès à la composition élémentaire de la molécule) et de la MS/MS (fragmentation spécifique de la molécule).

Un spectre de masse de type TOF MS (time of flight mass spectrometer) est basé sur la mesure du temps de vol d'un ion sur une distance donnée, sous un vide poussé de 10^{-5} Pa. Cela indique quatre étapes successives : la formation des ions, leur accélération, leur séparation et leur détection.

Le système chromatographique U3000-Dionex couplé au Q-TOF est constitué d'une chaîne HPLC haute pression ; la température de la source électrospray et celle du gaz de désolvatation a été fixée à 190 °C. Le gaz Azote a été utilisé comme gaz de désolvatation et de nébulisation à un débit de 4 L/min. La tension du capillaire était de 4,5 kV, la tension de source de 150 V (cone voltage + RF lens1 energy). La gamme de masse était de 0-10 mDa et l'acquisition et le traitement des données ont été réalisés par le logiciel Bruker Daltonics DataAnalysis 3.4.

d. Analyses des alcaloïdes par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GCMS)

La chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GCMS type QP2010-Shimadzu) est équipée d'un injecteur maintenu à 280 °C, où 1 μ L d'échantillon sont mis en mode « split » (ratio de 1 :50). Les molécules des extraits injectés sont fragmentées à la sortie de la colonne par impact électronique (EI - 70 eV).

- La phase mobile (Hélium) possède un débit de 0,8 mL/min.
- La phase stationnaire se constitue d'une colonne (SLB5-5 ; 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) impliquée dans un programme de 30 min avec une gamme de température entre 80 et 280 °C.

Nous avons repris le même système établi par Berkov *et al.*, 2008; Néanmoins la programmation de température a été légèrement modifiée, celle-ci augmente de 10 °C/min dans un intervalle de 80-280 °C, suivi d'un plateau de 10 min à 280 °C. La température de l'interface est de 300 °C, et celle de la source EI (Electronic Impact) est de 200 °C.

Le mode « full scan » est mis en route de 4,1 à 33 min pour détecter les fragments de rapport m/z compris entre 100 et 350. On obtient alors des spectres de masses, où chaque pic correspond à un fragment de rapport m/z d'une molécule éluée au bout d'un temps t.

L'identification des alcaloïdes a été performée en comparant le spectre de fragmentation de chaque molécule avec celle de la galanthamine et de la lycorine standards (Sigma-Aldrich).

Par contre, l'identification des molécules dont on ne possède pas les témoins positifs, leur spectre de fragmentation a été alors comparé aux spectres répertoriés dans la littérature. Travaillant dans les mêmes conditions d'analyses, lorsqu'on se place au même temps de rétention, et qu'on obtient les mêmes fragments dans des proportions comparables, on suppose qu'il s'agit de la même molécule (Tableau 3).

Tableau 3 : Quelques alcaloïdes criblés par GCMS et répertoriés dans la littérature.

	Temps de rétention (min)	Pic majoritaire (100 %)	Spectre de fragmentation m/z (intensité relative, %)
Déméthylgalanthamine	24	272	273(98), 230(33), 202(27), 174(12)
Galanthamine	22,75	286	287(83), 244(23), 230(12), 216(31), 174(28)
Narwédine	23,4	284	285(84), 242(18), 216(24), 119(22), 174(40)
<i>N</i> -Formylnorgalanthamine	26,9	301	272(2), 243(6), 230(7), 225(15), 211(16), 128(11), 115(10)
Lycorine	26,3	226	287(27), 286(19), 268(20), 250(20), 227(80), 147(8), 119(12)
Anhydrolycorine	23,8	250	251(45), 220(4), 204(2), 192(14), 191(12), 165(6), 152(2), 139(4), 96(7), 95(9)
Crinine	23,5	271	270(20), 199(10), 187(5), 173(10), 115(22)
Trisphéridine	21,9	223	222(39), 167(10), 166(10), 164(5)
Déméthylmarithidine	23,7	273	230(25), 201(86), 189(54), 175(22), 157(16), 128(19), 115(20)
Pluviine	25,8	242	287(75), 286(44), 268(45), 254(4), 228(23), 198(4), 182(3), 151(4)

e. Chromatographie sur couche mince couplée à la spectrométrie de masse (TLC-MS)

Des extraits méthanoliques des différentes parties (racines, bulbes, tiges, feuilles et graines) des plantes Amaryllidaceae (*Narcissus tazetta*, *Narcissus poeticus*, *Pancreatium tortuosum*, et *Pancreatium maritimum*) ont été analysés par HPTLC (Figure 21).

Des volumes (4, 8 et 10 μL) de chaque échantillon et standards de galanthamine et de lycorine ont été déposés sur les plaques (HPTLC Silica gel 60 F₂₅₄, 20 x 10 cm MERCK) à l'aide d'un appareil HPTLC semi-automatique (CAMAG Linomat 5) dirigé par un logiciel WinCATS.

Après la migration, la lecture des plaques est réalisée à 365 et 254 nm. Les taches sélectionnées sont analysées en spectrométrie de masse à l'aide de l'interface « CAMAG TLC-MS Interface » (Figure 21).

L'interface est couplée à l'appareil LCHRMS (U3000-Dionex microTOFLCTM – System (Bruker Daltonics)) et l'analyse se fait en mode ESI (Electrospray Ionisation) dans les mêmes conditions décrites précédemment.



Figure 21 : Appareil HPTLC semi-automatique (CAMAG Linomat 5) et Interface de couplage à la spectrométrie de masse « CAMAG TLC-MS Interface ».

Pour les analyses qualitatives, les plaques sont pulvérisées par le réactif du Dragendorff préparé selon :

- Solution (a) : 0,85 g d'oxynitrate de bismuth(III) dissous, sous chauffage, dans une solution de 10 mL d'acide acétique glacial et de 40 mL d'eau.
- Solution (b) : 8 g d'iodure de potassium dissous dans 30 mL d'eau.
- Solution stock : mélange (1 :1) des deux solutions (a) + (b).

Le réactif de Dragendorff : 1 mL de solution stock est additionné à une solution de 2 mL d'acide acétique glacial et de 10 mL d'eau.

5. Test enzymatique et mesure du pourcentage d'inhibition de l'AChE

Ces analyses ont été accompagnées des tests biologiques sur l'inhibition de l'AChE d'*Electrophorus electricus*, les analyses ont été réalisées 3 fois et les résultats en pourcentage d'inhibition ont été comparés aux témoins de galanthamine et de tacrine (100 % de pureté). Ces tests ont été réalisés en collaboration avec Dr. Catherine Guillou à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN-CNRS ; Gif-sur-Yvette).

L'activité inhibitrice de l'AChE a été établie par une méthode photométrique décrite par Ellman *et al.*, 1961. Le test Ellman (Figure 22) est automatisé à l'ICSN, permettant le criblage des extraits de produits naturels. L'enzyme AChE provient de l'*Electrophorus electricus* disponible dans le commerce. Le substrat de l'AChE s'agit de l'acétylcholine dans ce test.

L'activité enzymatique est mesurée en suivant l'évolution de la couleur jaune produite par la triocholine quand cette dernière réagit avec l'ion dithiobisnitrobenzoate pour donner l'anion de l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque de couleur jaune, dans 96 puits de microplaques. Le taux de la couleur est détecté à 412 nm à l'aide d'un détecteur (Molecular Devices Spectra Max 384 plus plate reader). Une diminution de la densité optique indique une augmentation de l'inhibition de l'AChE. Chaque extrait est évalué avec plusieurs concentrations (10^{-9} – 2.10^{-5} M) obtenues à l'aide d'un robot Beckman Biomek 3000 et Biomek NX.

Le pourcentage de l'inhibition est calculé en se référant à un échantillon contrôle (DMSO), et les résultats d'inhibition sont présentés avec des moyennes et des écartypes de trois essais successifs. L'objectif est donc d'évaluer la variation de leur pouvoir inhibiteur de l'AChE en fonction des éléments additionnés aux milieux de culture.

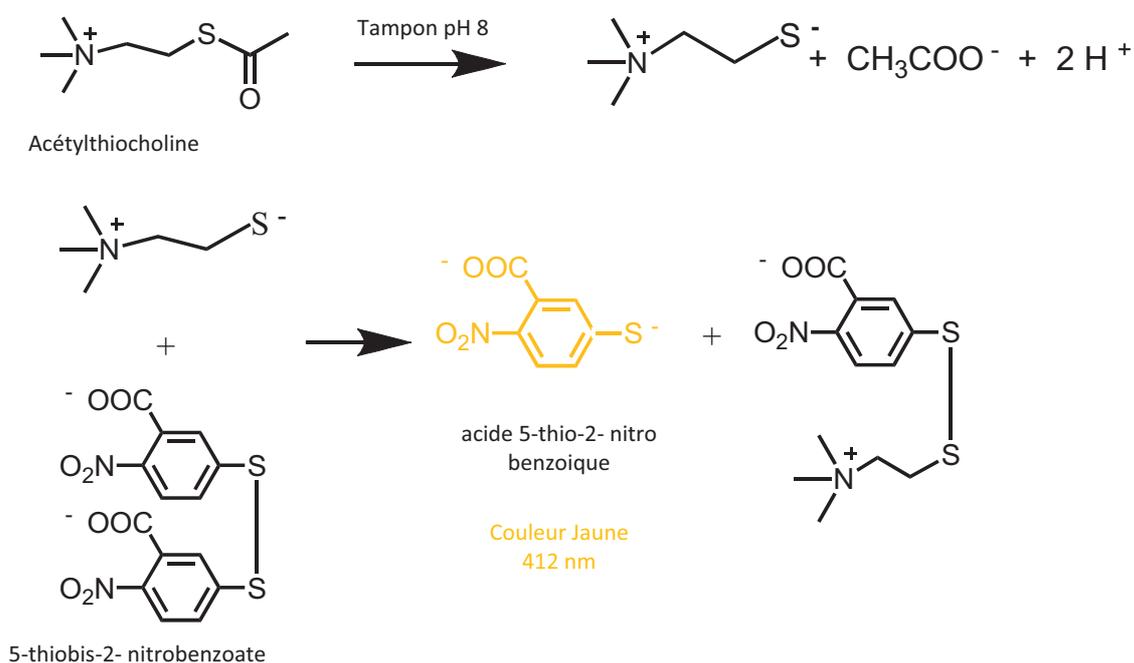


Figure 22: Le test Ellman établi pour mesurer le pouvoir inhibiteur des alcaloïdes vis-à-vis de l'AChE.

6. Extraction des microsomes des plantes d'Amaryllidaceae

Des bulbes *in vitro* de trois espèces d'Amaryllidaceae (*N. pseudonarcissus*, *L. aestivum* et *G. elwesii*) ont été initiés sur milieu MS60 + 10 μ M 2.4-D + 5 μ M BAP. Les bulbes *in vitro* sont conservés dans une chambre de culture à température constante (25 °C) et avec une photopériode de 16 h. Des repiquages des cultures sont effectués tous les mois afin de permettre un meilleur développement des tissus *in vitro* et d'atteindre une quantité de matière fraîche suffisante pour l'extraction des microsomes de chacune des espèces.

L'extraction est effectuée sur plusieurs essais à partir des trois espèces citées ci-dessus afin de mettre au point le protocole conduisant à l'obtention d'un culot significatif de microsomes. Le broyage des bulbes *in vitro* est réalisé à l'aide d'un Ultraturrax. Deux types de centrifugeuse ont été utilisés pour la centrifugation à vitesse faible (10 000 et 15 000 g), et pour une Ultracentrifugation à vitesse élevée (100 000 g).

Après l'obtention des microsomes à partir des bulbes *in vitro*, plusieurs essais d'incubation avec la 4'-*O*-méthyl-d₃-norbelladine (0, 1 et 10 mM) en présence et en absence du NADPH, étape fondamentale pour la localisation de l'enzyme catalysant le précurseur deutéré en diénone. Cette étape nous aidera à comprendre s'il s'agit d'une enzyme à Cytochrome P450.

Le pH des solutions d'incubation a été étudié (pH 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10) et optimisé, en l'ajustant à l'aide d'une solution de NaOH (0,5 N) ou d'une solution d'H₂SO₄ (0,5 N).

Différents temps d'incubation ont été testés, de 10 min à 30 jours intercalés de l'ajout de 10 μ L de microsomes à chaque arrêt afin de garder l'activité des protéines constantes. Les incubations ont été réalisées à 30 °C sous agitation orbitale de 150 rpm.

À chaque arrêt, les incubations arrêtées sont directement stockées dans un bain de glace, et filtrées sur filtre 0,22 μ m ou à l'aide des filtres (Spin850cap filter 0,22 μ m Cellulose Acétate – Interchim). Ces Spins permettent la microfiltration des solutions de faibles volumes (50 à 250 μ L) afin d'éliminer les impuretés et les protéines de grosses tailles pouvant obstruer les colonnes chromatographiques.

Dans la troisième partie de la thèse, nous détaillerons le protocole ainsi que les différents essais d'incubation des microsomes avec la 4'-*O*-méthyl-d₃-norbelladine, et d'analyses par HPLC, HPTLC, et LCMS.

Résultats et Discussion

Chapitre I.

Mises au point et validation des méthodes chromatographiques

A - Chromatographie liquide couplée à l'UV (HPLC-UV)

1. Choix de la phase mobile et du gradient d'éluion pour la méthode HPLC

La séparation des alcaloïdes, galanthamine, lycorine, 4'-*O*-méthyl-d₃-norbelladine, déméthylnarwédine, et du méthyljasmonate, est effectuée en premier lieu en HPLC. Nous nous sommes d'abord basés sur le programme mis au point par Diop *et al.*, 2006, auquel nous avons apporté, ensuite, diverses modifications. Le programme décrit par Diop *et al.*, 2007 constitue un temps d'analyse de 45 min, et a été adapté pour la détection de la galanthamine possédant un temps de rétention de 11 min. Or, dans ce projet nous sommes amenés à détecter les alcaloïdes divers cités ci-dessus. Ces derniers sont plus ou moins retenus que la galanthamine sur la colonne HPLC, pour cela le programme mis au point par Diop *et al.*, 2007 n'a pas permis la détection des autres standards possédant un temps de rétention plus faible que la galanthamine, c'est notamment le cas de la lycorine et de la 4'-*O*-méthyl-d₃-norbelladine. Le but de modification du programme mis au point par Diop *et al.*, 2007, est donc d'obtenir une bonne séparation des pics tout en réduisant le temps d'analyse. Nous avons utilisé la phase mobile, la phase stationnaire et la longueur d'onde (280 nm) décrites par Diop *et al.*, 2007. Ensuite, nous avons modifié le gradient d'éluion. Les conditions chromatographiques finales sont présentées ci-dessous :

- Phase mobile :

Solvant A : Tampon d'acétate Triéthylammonium (TEAA, Fluka Biochemika) 30 mM

Solvant B : 70 % Acétonitrile pur (qualité HPLC) + 30 % du solvant A

- Phase stationnaire: Colonne de silice (C18 Platinum ; 250 x 4,6 mm, 100 Å) thermostatée dans un four à 45 °C.

- Gradient : Le gradient d'élution s'étale sur 26 min (Tableau 4). Le gradient croissant débute avec 20 % du solvant B à t_0 jusqu'à 50 % B à 13 min (Figure 23). Un plateau est ensuite maintenu avec 50 % B de 13 à 18 min et suivi, jusqu'à 20 min, par une augmentation de 50 à 100 % de B. Cette augmentation de gradient est succédée d'un second plateau maintenu de 20 à 23 min avec 100 % de B et nécessaire pour le nettoyage de la colonne. Le gradient est enfin complété par une diminution de 100 à 20 % de B afin de retourner aux conditions chromatographiques initiales.

Tableau 4: Gradient d'élution HPLC adapté à la séparation des alcaloïdes des Amaryllidaceae.

Temps (min)	0	4	13	18	20	23	25	26
Solvant B (%)	20	20	50	50	100	100	20	Stop
Débit (mL/min)	1	1	1	1	1	1	1	0

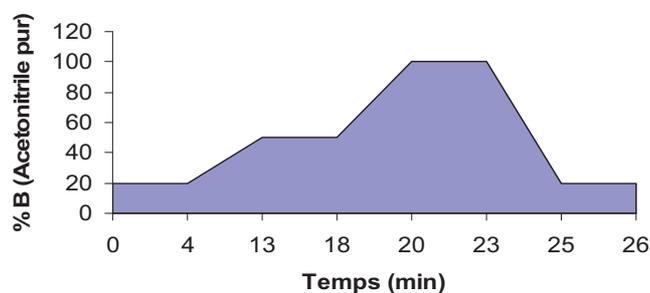


Figure 23: Variation de la concentration du solvant B (acétonitrile pur + 30 % du solvant A) durant 26 min d'analyse par HPLC.

Notre programme d'élution a permis la séparation de cinq étalons détectés à une longueur d'onde de 280 nm (Figure 24). Le choix de la longueur d'onde a été mis au point par Diop *et al.*, 2007. Les solutions étalons sont préparées dans du MeOH pur (qualité HPLC) à partir de galanthamine, de lycorine standards, et de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine obtenue par synthèse chimique par le Dr. Michel Boisbrun au Groupe SUCRES.

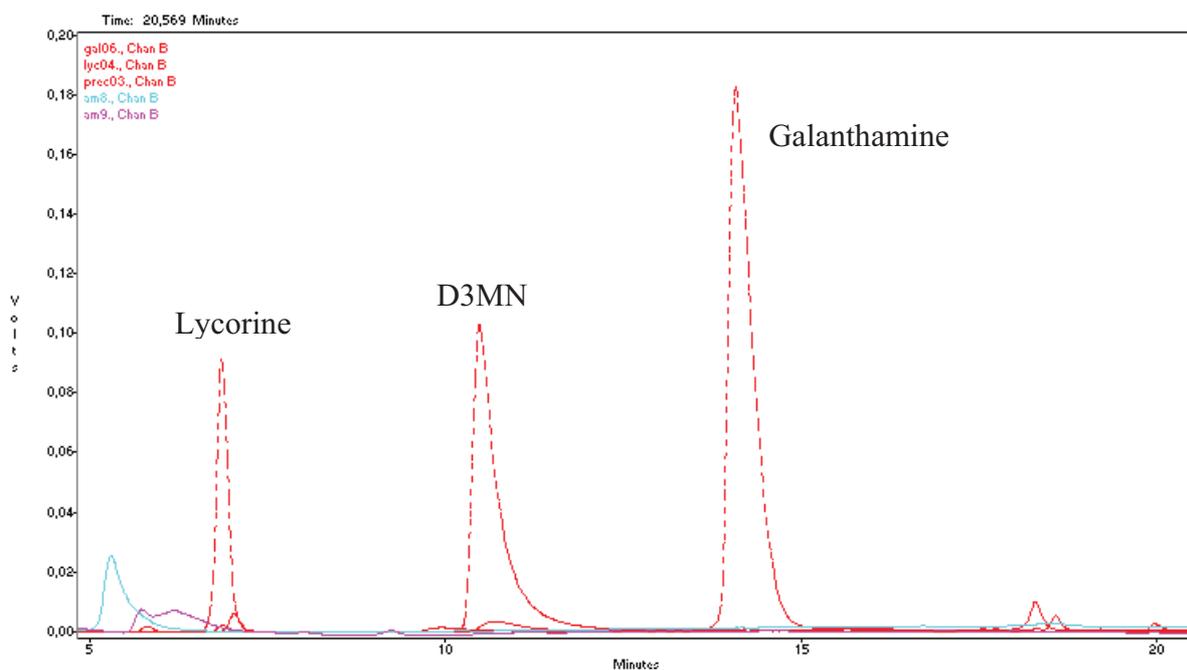


Figure 24 : Chromatogramme HPLC montrant la séparation des étalons de lycorine ($T_r = 6,9$ min), galanthamine ($T_r = 14,5$ min), et 4'-*O*-méthyl- d_3 -norbelleadine (D3MN) ($T_r = 11$ min).

Lors d'une analyse chromatographique liquide haute performance, le signal provenant du détecteur et correspondant à chaque composé élué se présente sous forme d'un pic qui, en principe doit être symétrique et gaussien. Le temps de rétention (T_r) représente le temps d'élution au maximum du pic, mesuré à partir de l'injection. Dans la figure 24, on observe une séparation des étalons en fonction du temps de rétention de chacun. La lycorine est éluee à 6,9 min, la galanthamine à 14,5 min, la 4'-*O*-méthyl- d_3 -norbelleadine à 11 min.

2. Validation du dosage par HPLC

Dans l'objectif d'évaluer l'aptitude de la méthode HPLC à répondre à nos attentes en dosant des molécules présentes dans nos extraits, une étude de la validation de la méthode a été réalisée en tenant compte de la proportionnalité entre aire du pic et concentration, des limites de détection et de quantification, et de la précision de la méthode. Ce dernier paramètre a été déterminé en définissant le niveau de précision et d'exactitude de la méthode.

a. Proportionnalité et exactitude de la méthode

Des courbes d'étalonnage ont été réalisées avec plusieurs concentrations de galanthamine, lycorine et de 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine (D3MN) comprises entre 0,003 et 1 g/L pour un volume injecté de 10 µL (Figure 25). Le logiciel « Class-VP » peut intégrer les chromatogrammes enregistrés afin de quantifier les molécules. Il existe différentes méthodes de quantification. Nous avons travaillé avec la méthode des « aires de la courbe ». La surface calculée sous un pic peut alors être reliée à la concentration de la molécule correspondante. L'aire du pic enregistré correspond donc à la concentration du produit. Nous trouvons sur chaque chromatogramme, les aires du pic, correspondant à chacun des trois étalons, reportés sur un diagramme en fonction de leurs concentrations respectives afin d'obtenir les droites de régression linéaire exprimées par la formule $Y = ax + b$. Le coefficient de détermination R^2 devra être $> 0,99$ (Figure 25).

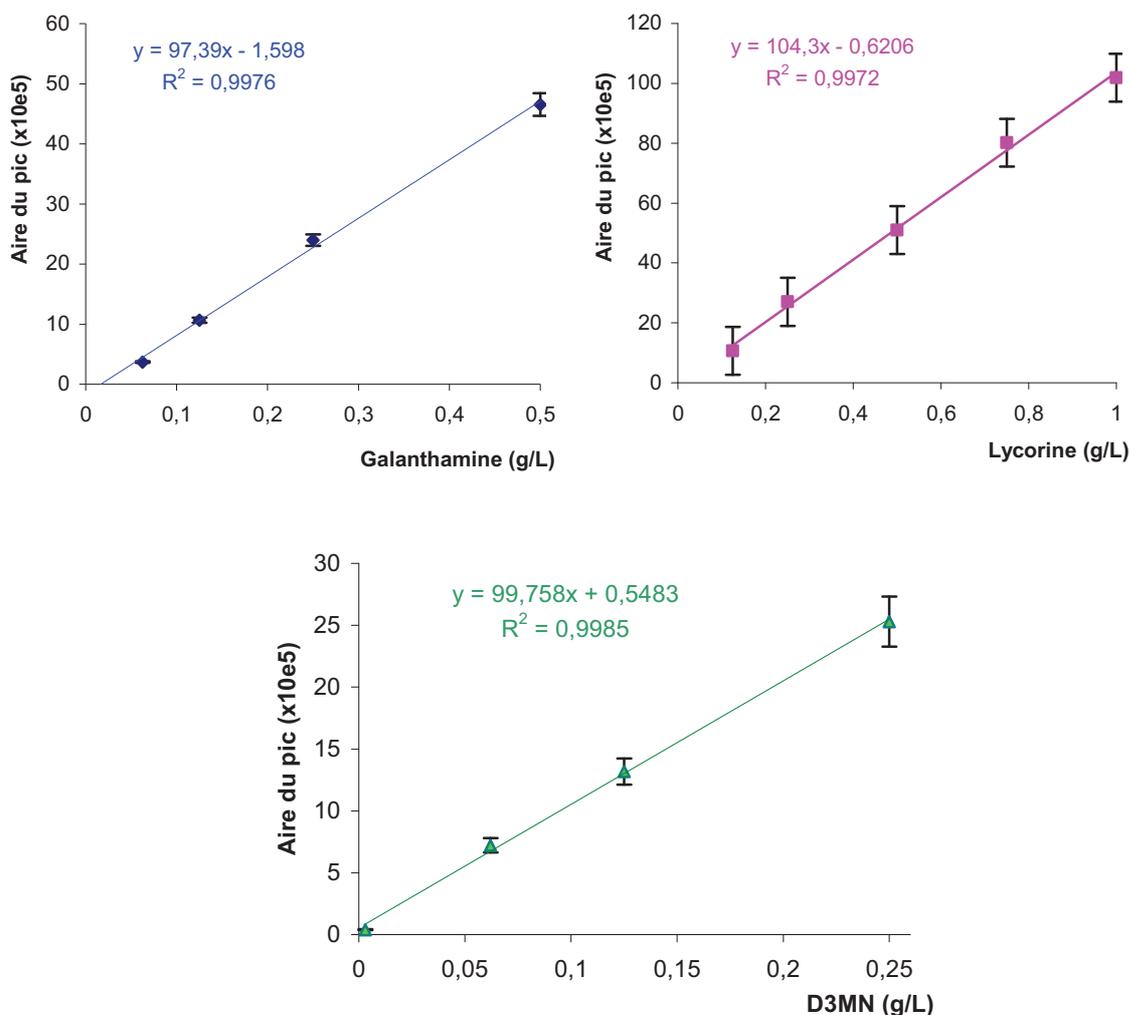


Figure 25: Courbes d'étalons de la galanthamine, de la lycorine et de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine (D3MN), obtenues par HPLC.

La reproductibilité de notre méthode d'analyse a été vérifiée en injectant chaque échantillon à trois reprises. Les concentrations et les temps de rétention sont le résultat des moyennes établies pour chaque étalon et chaque échantillon analysé. Sur la base des résultats obtenus grâce à l'analyse de régression linéaire, les coefficients de corrélation sont très satisfaisants, compris entre 0,9972 et 0,9985. Donc la méthode s'est révélée proportionnelle pour les plages de concentrations, en galanthamine, lycorine, et D3MN. La méthode est validée en fonction de la linéarité des gammes d'étalonnages, c'est-à-dire la vérification de la proportionnalité de la réponse en fonction de la concentration. On en déduit un intervalle de linéarité dans lequel les alcaloïdes des Amaryllidaceae peuvent être dosés [0 et 1g/L]. La méthode a été vérifiée par la méthode de l'étalonnage externe. Pour un volume injecté constant V, l'injection ultérieure du même volume V de l'échantillon à doser permet, à l'aide de la mesure de l'aire du pic reportée sur la courbe d'étalonnage, de connaître la concentration de galanthamine, lycorine et D3MN à 0,2 g/L injectées 3 fois. Cela correspond tout à fait à cette concentration sur les droites des gammes d'étalonnage pour ces composés (Tableau 5).

Tableau 5 : Les aires des pics obtenus lors d'injection de 0,2 g/L de chacun des standards.

	Aire du pic		
	1ère injection	2ème injection	3ème injection
Galanthamine 0,2 g/L	1788954	1786889	1788786
Lycorine 0,2 g/L	2023945	2036884	2012586
D3MN 0,2 g/L	2058511	2045687	2014427

b. Limite de détection et de quantification

La limite de détection (LDD) est définie comme la plus petite quantité de substance pouvant être détectée mais non quantifiée comme valeur exacte. Cette valeur est égale à la concentration donnant un signal égal au triple du signal correspondant au bruit de fond. Dans notre cas pour un standard de galanthamine, de lycorine, et de D3MN, les limites de détection sont respectivement de 0,06 ; 0,05 ; et 0,003 g/L. Il est bien connu que, chez les plantes Amaryllidaceae, les teneurs en alcaloïdes sont très faibles. Chez *L. aestivum* par exemple, les teneurs en galanthamine varient entre 0,02 % de matière sèche (MS) dans les bulbes *in vivo*, et dix fois moins (0,002 % MS) dans les cultures *in vitro*, des teneurs qui sont inférieures à la LDD de l'HPLC (Diop MF, 2007).

Notre matériel végétal renferme aussi d'autres alcaloïdes potentiellement intéressants mais, par manque de standards, nous ne pourrions pas les identifier en HPLC. Enfin, pour confirmer les pics identifiés dans nos extraits, quantifier les composés ou même identifier d'autres alcaloïdes également présents, nous avons eu recours à la spectrométrie de masse.

B - Chromatographies couplées à la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est utilisée comme technique de détection dans le cadre de nos tests de quantification et de criblage. Il s'agit d'une technique d'analyse de pointe permettant de déterminer les analyses en fonction de leurs masses moléculaires. Le fonctionnement d'un spectromètre de masse repose sur l'action d'un champ sur une particule chargée. L'analyse par spectrométrie de masse nécessite par conséquent la formation initiale d'ions, en phase gazeuse, à partir de l'échantillon. Lorsqu'un échantillon est introduit dans un spectromètre de masse (Figure 26), il est éventuellement vaporisé, avant d'être transformé en ions de masses distinctes. L'analyseur permet ensuite de trier cet ensemble d'ions, de mesurer leurs masses, de déterminer leur abondance et, éventuellement, de les fragmenter pour produire d'autres ions de plus faible masse.

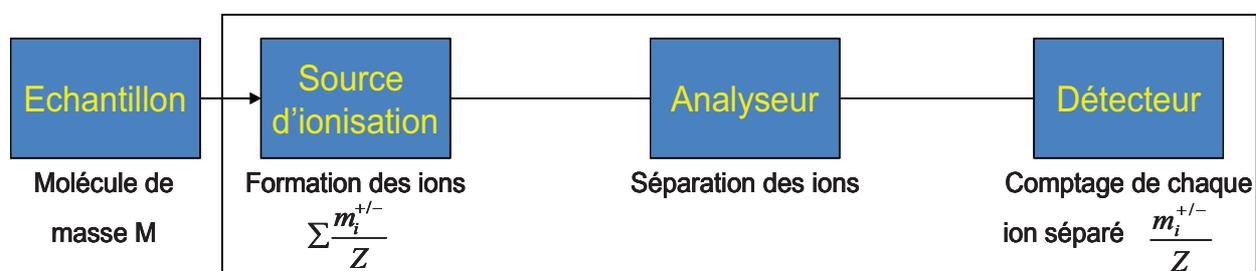


Figure 26: Eléments constitutifs d'un spectromètre de masse.

Quelque soit la technique de spectrométrie de masse utilisée, il s'agit d'analyser des espèces chargées, selon leur rapport masse sur charge (m/z). Si le composé ne possède qu'une seule charge ($z = 1$), l'analyse s'effectue selon la masse. Si le composé analysé possède plusieurs charges ($z > 1$) alors l'analyse s'effectue selon le rapport m/z .

Une analyse en spectrométrie de masse se fait en trois parties :

- Ionisation de la molécule dont les techniques se différencient selon les capacités de la molécule à former un ion moléculaire et/ou des fragments de la molécule, à former des ions mono- ou poly-chargés. L'impact électronique sera utilisé en GCMS, et l'ionisation électronique électrospray (ESI) en LCMS.

- Analyse des ions formés par séparation selon le rapport m/z . Les analyseurs peuvent se caractériser selon leur résolution (capacité de séparer deux ions de masses proches) et leur précision en masse (capacité de déterminer la masse d'un ion).
- Détection des ions.

La spectrométrie de masse analyse la masse d'un ion : seule la masse isotopique nous intéresse. Sur un spectre de masse il y a la présence d'un massif isotopique caractéristique. La résolution représente le pouvoir séparateur de l'analyseur, c'est-à-dire sa capacité à séparer deux rapports m/z voisins. Elle est définie par le rapport $R = m/\Delta m$, où Δm désigne la plus petite différence de masse pour laquelle il est encore possible de « séparer » le pic m du pic $m + \Delta m$ (Figure 27).

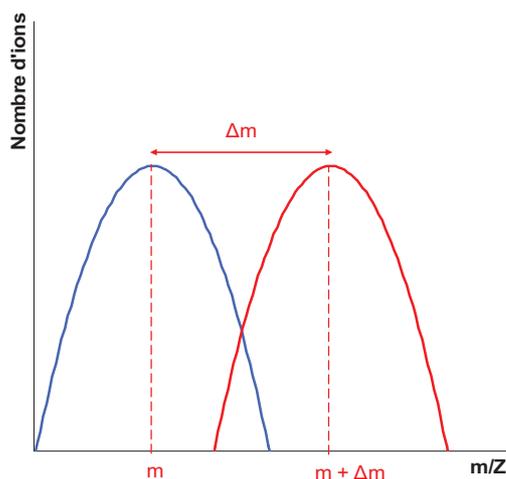


Figure 27 : Représentation graphique de la mesure de résolution à 50 % de vallée.

La précision sur la mesure de la masse est le rapport $\Delta m_e/m$ où Δm_e est l'erreur sur la mesure de la masse de l'ion de masse m . Cette précision est exprimée en ppm. Si cette précision est suffisante (de l'ordre du ppm), il est possible d'atteindre une détermination quasi certaine de la composition élémentaire (formule brute) de l'ion considéré. Une bonne résolution peut être atteinte en calibrant avec soin les spectres de masse, c'est-à-dire, en attribuant des masses bien définies à certains pics des spectres. Ce sont les pics du spectre qui seront utilisés comme étalons internes pour calibrer les spectres de masses obtenus lors de nos recherches.

D'autres critères d'évaluation de performances d'un analyseur peuvent être cités comme la gamme de masse accessible, la précision sur la mesure des abondances isotopiques, la sensibilité, le domaine de linéarité dynamique, la vitesse de balayage d'une certaine gamme de masse. Ces diverses performances sont bien entendu différentes d'un analyseur à l'autre. Si elles peuvent guider le choix, il faut leur ajouter d'autres critères tels que la compatibilité avec le mode d'ionisation souhaité, la facilité d'utilisation, la convivialité du logiciel de pilotage etc.. Il existe de nombreuses approches dans le cadre des tests de criblage, mais le but dans cette thèse n'est pas d'en faire une liste exhaustive. Nous nous intéressons spécifiquement aux tests de criblage des molécules à activité pharmacologique et appartenant à la voie de biosynthèse de la galanthamine.

1. Caractéristiques et validation du programme d'analyses LCMS

La faible sensibilité rend la méthode HPLC-UV peu efficace dans l'analyse quantitative des alcaloïdes des Amaryllidaceae. Pour surmonter ce problème, la technique de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LCMS) sera employée pour quantifier la galanthamine, la lycorine, et la D3MN dans les extraits des différentes expérimentations. Les avantages de la détection simultanée par l'utilisation de la LCMS (LC/ESI-MS et LC/ESI-HRMS) sont liés à l'efficacité de séparation et à la haute résolution ($R > 10\ 000$) permettant la détection des faibles quantités. L'élution a été conduite en utilisant un système de gradient décrit par De Jong *et al.*, 2006.

a. Proportionnalité et exactitude de la méthode

Une calibration externe a été préalablement réalisée en référence aux solutions authentiques de la galanthamine, de la lycorine et de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine (Figure 28). La reproductibilité de notre méthode d'analyse a été vérifiée en injectant chaque échantillon à trois reprises. Les concentrations et les temps de rétention sont le résultat des moyennes établies pour chaque étalon et chaque échantillon analysé. Sur la base des résultats obtenus grâce à l'analyse de régression linéaire, les coefficients de corrélation sont très satisfaisants, compris entre 0,96 et 1. Il suffit ensuite de relever dans chaque échantillon les surfaces correspondantes au composé élué au temps de rétention X, on en déduit alors la teneur à condition de rester dans le domaine de linéarité des droites d'étalonnage. Donc la méthode s'est révélée proportionnelle pour les plages de concentrations, en galanthamine, lycorine, et D3MN.

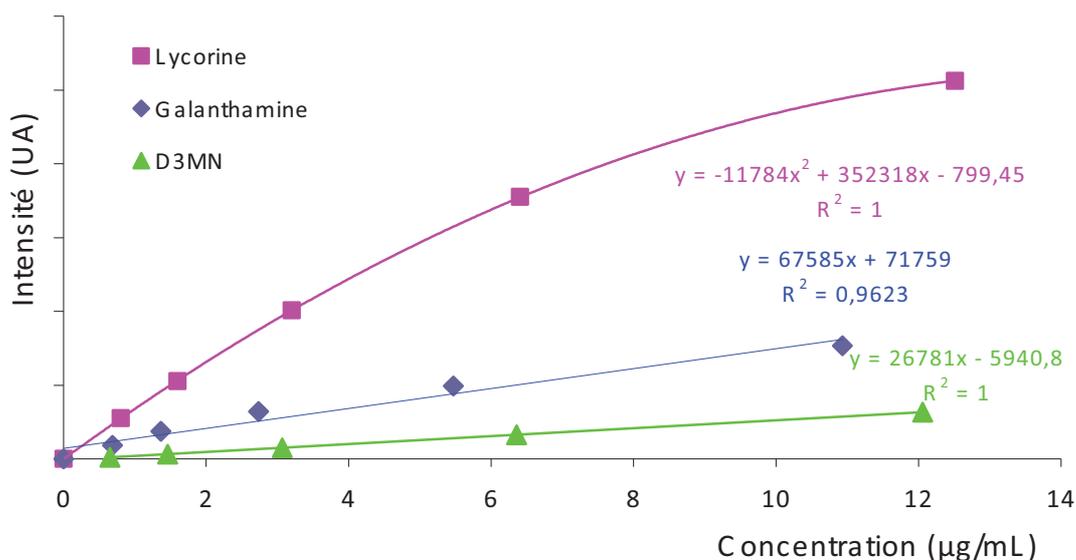


Figure 28: Calibration de la colonne LCMS et courbes étalons de la galanthamine, de la lycorine et de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine (D3MN).

L'identification et la quantification des alcaloïdes sont effectuées en se référant aux mêmes standards utilisés en HPLC. Étant donné que la masse moléculaire de la galanthamine (287,36 g/mol) et celle de la lycorine (287,32 g/mol) sont très proches, il est possible de les distinguer avec la spectrométrie de masse, en fonction du temps de rétention et de leur ion moléculaire à m/z (288) qui diffère à partir du deuxième chiffre après la virgule (Figure 29). La galanthamine possède un temps de rétention égale à 32,2 min, et a montré un ion moléculaire à m/z égale à 288,1568 [M+H]⁺. La lycorine est éluée à 25,5 min et a montré un ion moléculaire à m/z égale à 288,1203 [M+H]⁺. Enfin, la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine possède un temps de rétention égale à 33,5 min et un ion moléculaire à m/z égale à 277,1634 [M+H]⁺.

b. Limite de détection et de quantification

La limite de détection (LDD) est définie comme la plus petite quantité de substance pouvant être détectée mais non quantifiée comme valeur exacte. Dans notre cas pour un standard de galanthamine, de lycorine, et de D3MN, la LDD est de $0,02 \cdot 10^{-3}$ g/L. La limite de quantification est de $0,03 \cdot 10^{-3}$ g/L. Cette méthode LCMS est donc 1000 fois plus sensible que la méthode HPLC possédant une LDD de 0,05 g/L.

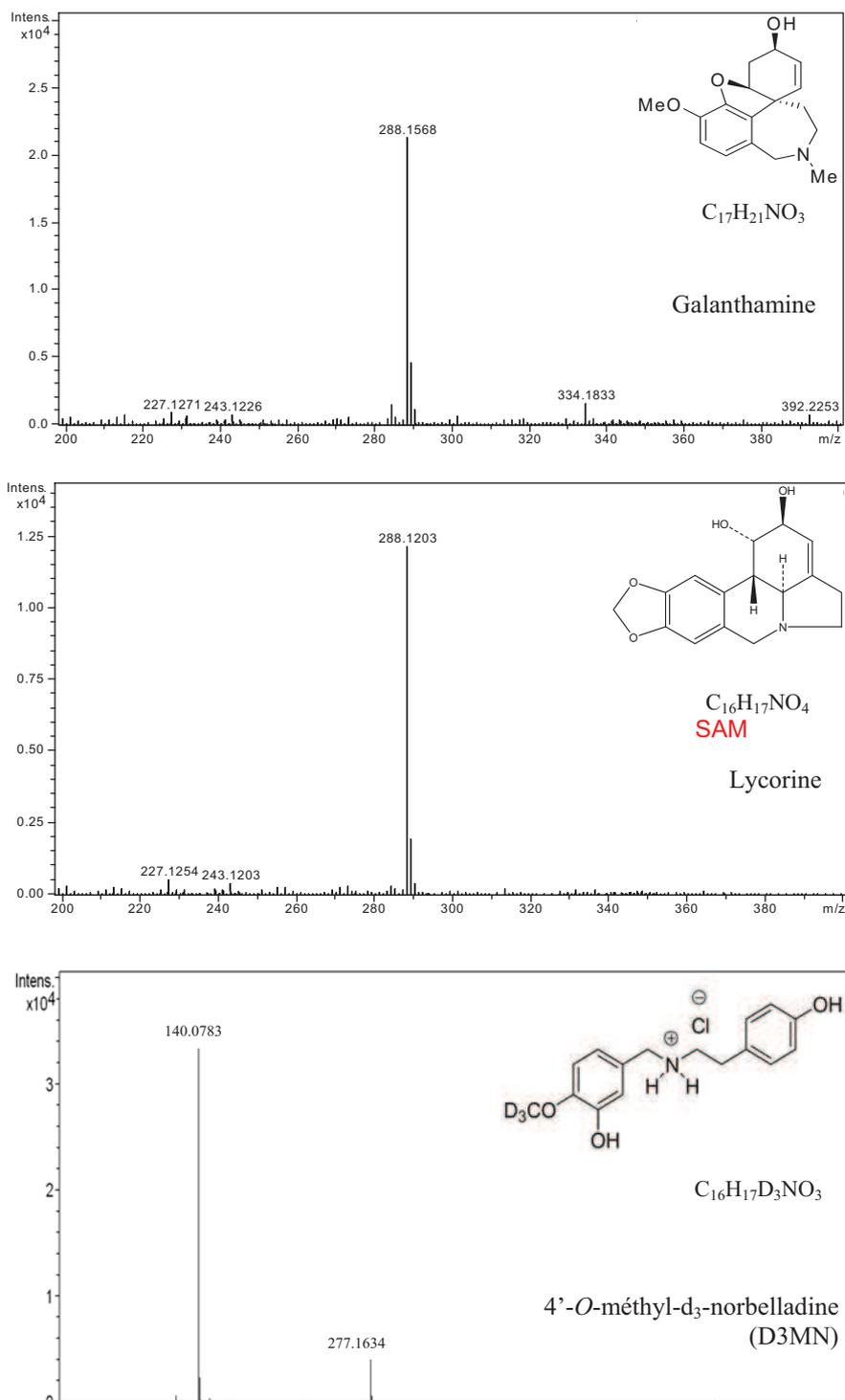


Figure 29 : Spectres de masse de la galanthamine ($[M+H]^+$, $m/z = 288,1568$), de la lycorine ($[M+H]^+$, $m/z = 288,1203$) et de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine ($[M+H]^+$, $m/z = 277,1634$) obtenus par LCMS en mode d'ionisation positif.

2. Caractéristiques et validation du programme d'analyses GCMS

Nous avons repris le même système établi par Berkov *et al.*, 2005 et Berkov *et al.*, 2008; néanmoins, la programmation de température a été légèrement modifiée. L'identification des alcaloïdes a été réalisée en comparant le spectre de fragmentation de chaque molécule avec celui de la galanthamine, de la lycorine, et de la D3MN standards. Par contre, pour l'identification des molécules dont on ne possède pas les témoins positifs, leurs spectres de fragmentation ont été comparés à ceux répertoriés dans la littérature et dans la librairie NIST08.LIB.

a. Proportionnalité et exactitude de la méthode

Afin de pouvoir quantifier les teneurs en galanthamine et en lycorine, nous avons réalisé une courbe d'étalonnage (Figure 30). Les échantillons analysés en mode « full scan », ont été repassés en mode « SIM » (Selective Ion Monitoring). Ce mode nous permet de focaliser sur certains ions (correspondant à la galanthamine (286 et 287) et à la lycorine (226 et 227) ce qui améliore la sensibilité des analyses (Figure 31). Les extraits ainsi analysés peuvent alors être quantifiés.

En se basant sur les résultats de l'analyse de régression linéaire, les coefficients de corrélation sont très satisfaisants, compris entre 0,95 et 0,99 (Figures 30 et 31). Donc la méthode, avec un rapport de résolution (R) unitaire, s'est révélée proportionnelle pour les plages de concentrations, en galanthamine, et en lycorine.

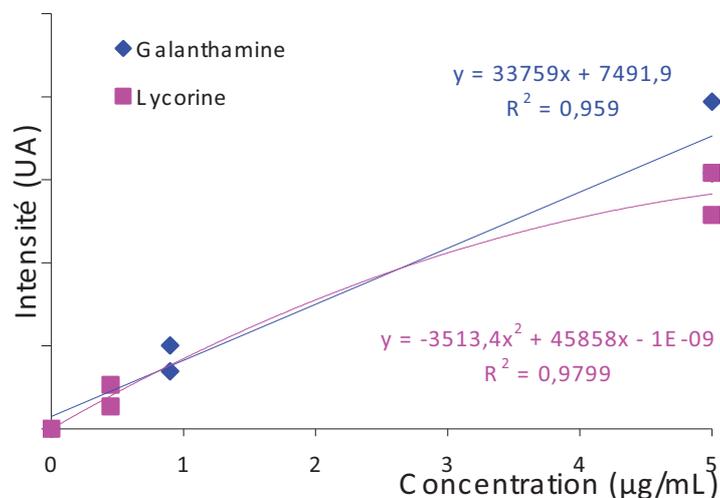


Figure 30: Courbes de calibration en GCMS de la galanthamine (Tr = 22,7 min.) et de la lycorine (Tr = 26,3 min.) en mode semi-quantitatif.

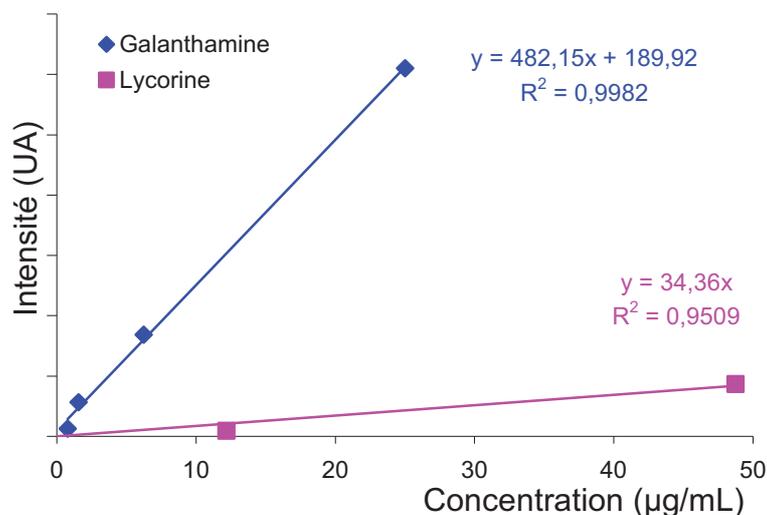


Figure 31: Courbes de calibration en GCMS de la galanthamine (Tr = 22,7 min) et de la lycorine (Tr = 26,3 min) en mode SIM.

b. Limite de détection et de quantification

Dans notre cas pour un standard de galanthamine, et de lycorine, la LDD et la limite de quantification sont de $0,03 \cdot 10^{-3}$ g/L. La méthode GCMS est donc amplement plus sensible que la méthode HPLC possédant une LDD de 0,05 g/L, mais légèrement moins sensible que la méthode LCMS possédant une LDD de $0,02 \cdot 10^{-3}$ g/L.

c. Criblage et identification des alcaloïdes

Pour identifier les molécules avec plus de certitude, il faudrait déterminer les pourcentages de tous les fragments et les comparer aux molécules suspectées (d'après leur ion moléculaire). L'idéal, étant de posséder le témoin positif de la molécule à identifier, car le temps de rétention varie selon la matrice entourant la molécule à analyser. Ainsi, les temps de rétention obtenue pour la galanthamine et la lycorine ne sont pas les mêmes que ceux obtenus par Berkov et ses collaborateurs en 2005 et en 2008. L'identification des pics, a été réalisée en comparant leur spectre de fragmentation à ceux répertoriés dans la littérature chez les mêmes espèces, et dans la base de données (Librairie : NIST08.LIB).

Un composé organique introduit dans le spectromètre de masse est ionisé par bombardement électronique à 70 eV. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir des ruptures des liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formant ainsi des ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés. Ces ions fragments sont ensuite séparés en fonction de leur rapport m/z par l'application d'un champ magnétique et/ou électrique, puis collectés par un détecteur. L'ensemble de ces ions fragments constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire.

La galanthamine détectée à 22,8 min (Figure 32), est identifiée grâce à son fragment d'ion majoritaire (286), à son ion moléculaire (287) qui est de l'ordre de 83 % et au fragment 216 d'environ 31 % (Figure 33). La lycorine, élue à 26,3 min (Figure 32), est identifiée grâce à son fragment d'ion majoritaire (226), à son ion moléculaire (287) de l'ordre de 27 % et du fragment 227 d'environ 80 % (Figure 34). Ces résultats sont très proches de ceux de Berkov et ses collaborateurs en 2005 et en 2008. La 4'-O-méthylnorbelladine deutérée étalon, est détectée à 24,54 min et caractérisée par son ion majoritaire (140) et le fragment 169 de l'ordre de 32 % environ (Figure 35).

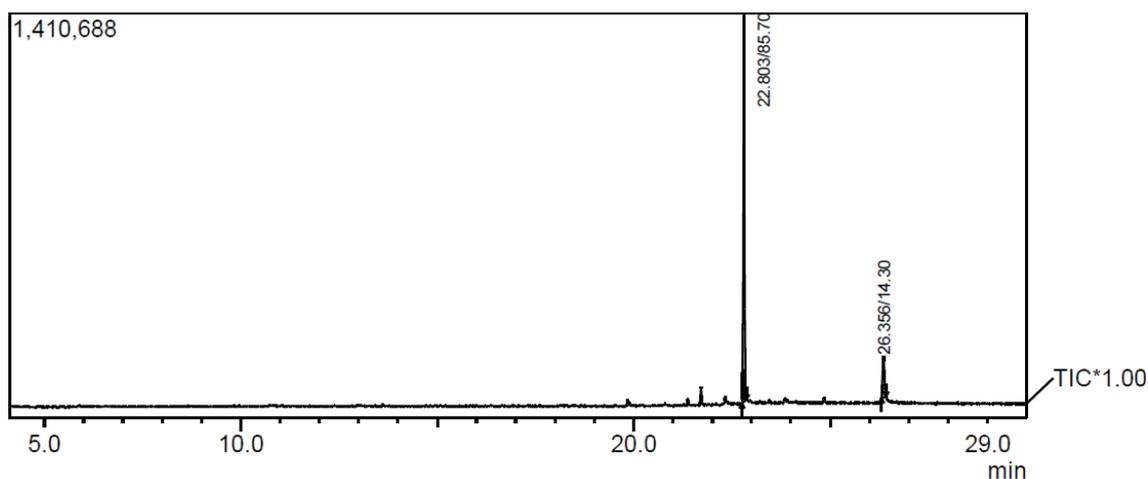
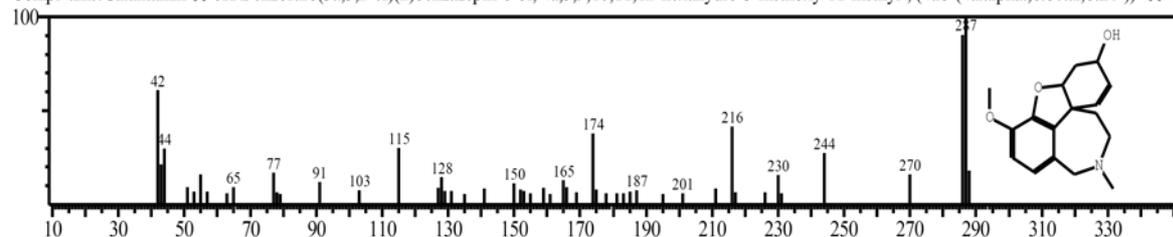


Figure 32 : Chromatogramme GCMS des étalons de galanthamine (Tr = 22,80 min) et de lycorine (Tr = 26,35 min).

Hit#:1 Entry:102910 Library:NIST08.LIB

SI:88 Formula:C17H21NO3 CAS:357-70-0 MolWeight:287 RetIndex:2213

CompName:Galantamin \$\$ 6H-Benzofuro(3a,3,2-ef)(2)benzazepin-6-ol, 4a,5,9,10,11,12-hexahydro-3-methoxy-11-methyl-, (4aS-(4a.alpha.,6.beta.,8aR*))- \$\$ Galantamine



Peak#:1 R.Time:22.8(Scan#:2244)

MassPeaks:224

RawMode:Averaged 22.8-22.8(2243-2245)

BG Mode:Averaged 22.9-22.9(2252-2254) Group 1 - Event 1

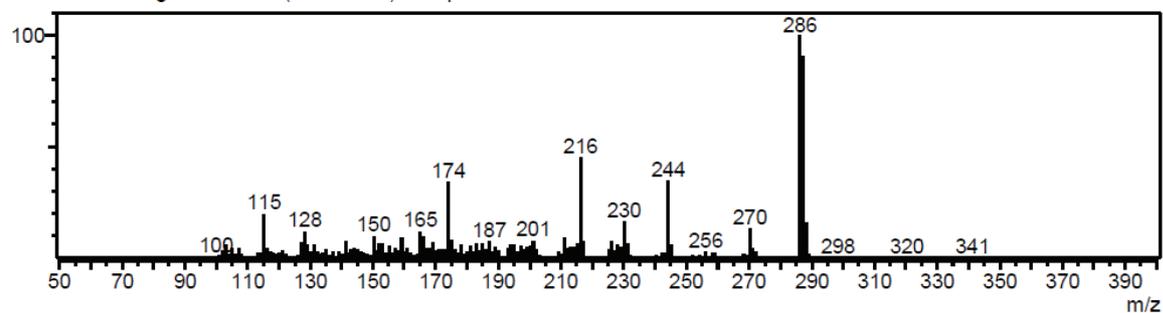
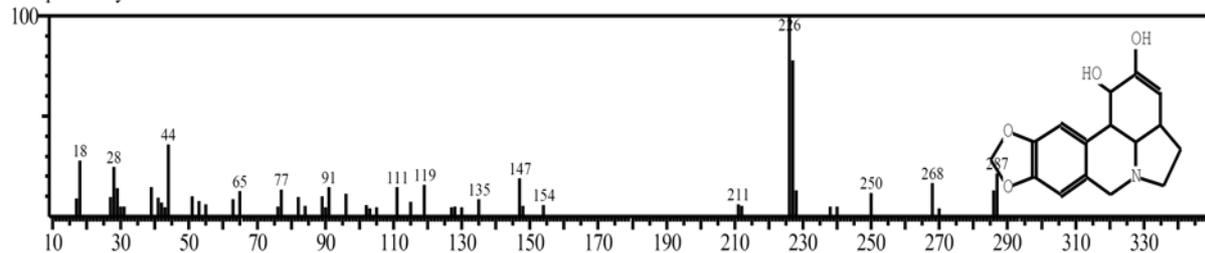


Figure 33 : Spectres de masse de la galanthamine standard (286(100) ; 287(83), 216 (31)) identifiée dans la librairie NIST08.LIB, et par GCMS en mode « full scan ».

Hit#:1 Entry:102825 Library:NIST08.LIB
SI:84 Formula:C16H17NO4 CAS:0-00-0 MolWeight:287 RetIndex:2263
CompName:Lycorin



Peak#:2 R.Time:26.3(Scan#:2669)
MassPeaks:206
RawMode:Averaged 26.3-26.3(2668-2670)
BG Mode:Averaged 26.4-26.4(2678-2680) Group 1 - Event 1

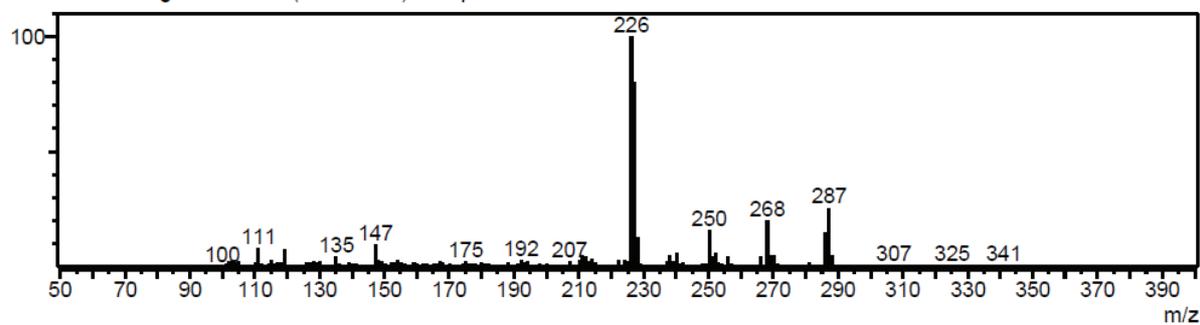
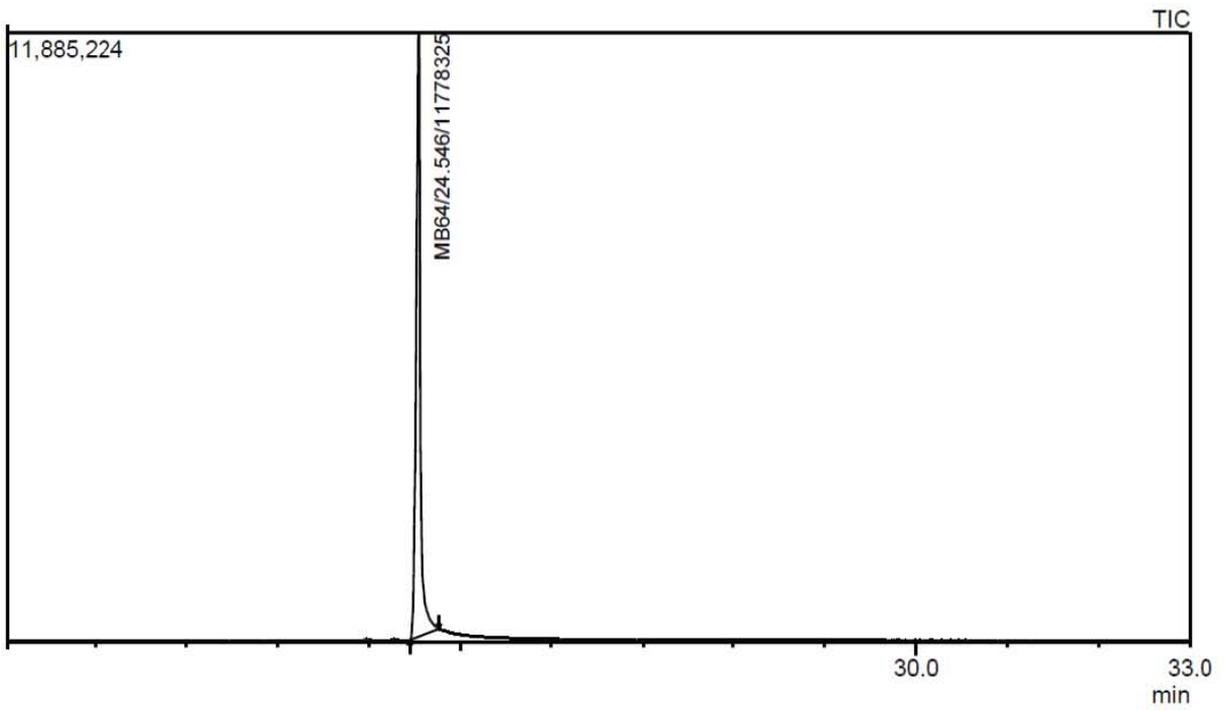


Figure 34 : Spectres de masse de la lycorine standard (226(100); 227 (80), 287(27)), identifiée dans la librairie NIST08.LIB, et par GCMS en mode « full scan ».



Peak#:1 R.Time:24.5(Scan#:2455)
 MassPeaks:239
 RawMode:Averaged 24.5-24.6(2454-2456)
 BG Mode:Averaged 24.8-24.8(2481-2483) Group 1 - Event 1

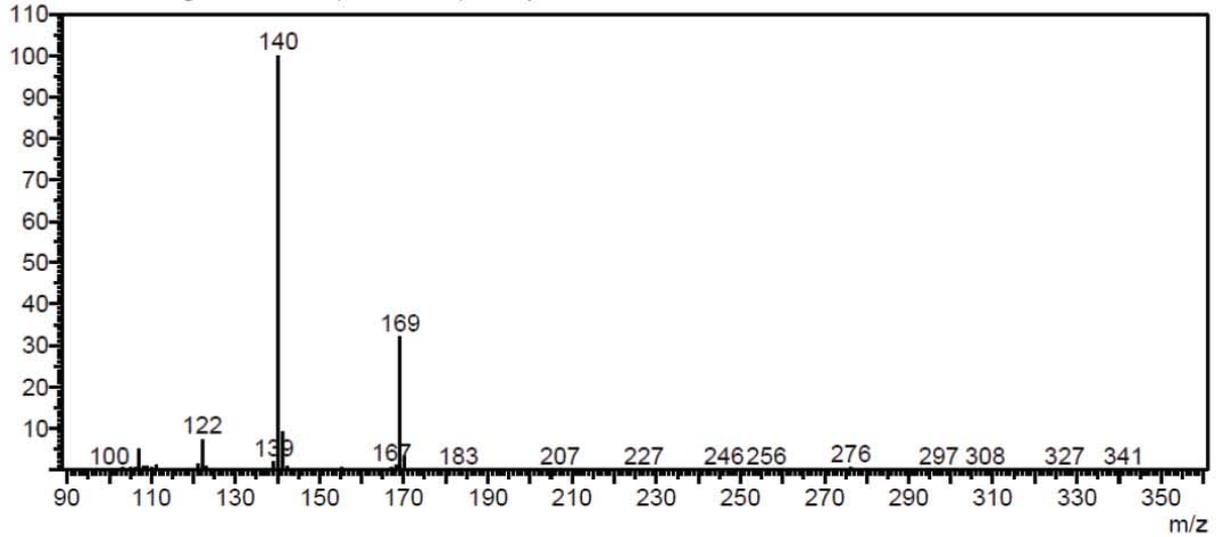


Figure 35 : Chromatogramme et spectre de masse GCMS de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine (140(100) ; 169 (32)).

3. HPTLC-MS Chromatographie sur couche mince couplée à la spectrométrie de masse (TLC-MS)

Parmi les méthodes chromatographiques disponibles actuellement, la chromatographie sur couche mince (TLC – Thin layer chromatography) est largement utilisée pour les analyses rapides des médicaments à base de plantes. Wagner *et al.*, 1995 ont rapporté que la TLC représente une méthode analytique idéale pour l'étude des plantes médicinales et pour la préparation des médicaments (Berkov *et al.*, 2008).

Il existe plusieurs raisons favorables à son utilisation :

- Le temps requis pour la démonstration des caractéristiques des constituants d'un extrait par TLC est très court.
- En plus de la détection qualitative, la TLC fournit aussi des informations semi-quantitatives permettant l'estimation des constituants les plus actifs d'un produit.
- La TLC fournit une empreinte chromatographique permettant l'évaluation de la pureté d'un produit et son identité.

En comparaison avec l'HPLC, la TLC possède plusieurs avantages :

- Résultats visuels,
- Simplicité,
- Analyses parallèles de plusieurs échantillons,
- Résultats rapides,
- Flexibilité,
- Usage unique de la plaque,
- Détection multiple,
- Rentable et économique.

En revanche, cette méthode est soumise à plusieurs facteurs défavorables. La TLC ou HPTLC (High performance thin layer chromatography) est un système exposé à différents facteurs environnementaux, comme l'oxygène, la température, l'humidité, la luminosité, et le stress mécanique. Afin de respecter la reproductibilité des résultats, la plaque doit être traitée avec précaution.

Les extraits de plantes médicinales constituent des mélanges complexes de produits naturels. Pour la majorité des extraits, la composition chimique des composés présents dans l'extrait n'est pas entièrement connue. Les compositions qualitative et quantitative des produits peuvent varier considérablement à cause de la variabilité naturelle des plantes. Il est à noter également le manque de matériel de références comme les molécules standards, qui limite l'utilisation de cette méthode. D'où l'intérêt du couplage à la masse grâce à l'interface qui relie l'HPTLC à la spectrométrie de masse (HPTLC-MS). Cela nous permet de cribler et d'identifier les différentes tâches de migration en fonction de la masse des composés et de les quantifier avec une haute résolution. L'UMR 7565 a acquis cet appareillage en fin d'année 2009, ce qui nous a permis de l'utiliser à maintes reprises.

Dans ce projet, des extraits méthanoliques des différentes parties (racines, bulbes, tiges, feuilles et graines) de plantes d'Amaryllidaceae (*Narcissus tazetta*, *Narcissus poeticus*, *Pancreatium tortuosum*, et *Pancreatium maritimum*) ont été analysés par HPTLC.

La migration des alcaloïdes a été réalisée dans une cuve conditionnée avec deux solvants successifs selon le protocole décrit par Ingkaninan *et al.*, 2000 :

- Solvant 1: CHCl₃/MeOH 9:1 (v/v)
- Solvant 2: Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau 100:11:11:27 (v/v/v/v)

Le facteur de rétention est calculé selon la formule :

$$R_F = \frac{d \text{ (distance parcourue d'une tache)}}{ds \text{ (distance parcourue du solvant)}}$$

La migration sur plaque nous permet d'analyser des échantillons de volume faible (< 250 µL) en déjouant le problème de microfiltration, et aussi d'analyser les échantillons en suspension avec des sels (Tampon phosphate, tris-HCl) et/ou renfermant des protéines comme dans le cas de l'extraction des microsomes. Ces derniers pouvant bloquer la colonne LCMS, ils seront séparés sur les plaques TLC. Grâce au couplage à la spectrométrie de masse, et par les biais de l'interface CAMAG, on pourra d'une part détecter et quantifier les taches correspondant à la galanthamine et à la lycorine, et d'autre part, identifier les autres pics dont on ne possède pas les standards.

C - Conclusion du chapitre (Ptak A, El Tahchy A *et al.*, J Nat Prod 2009)

Le nouveau programme d'éluion HPLC a permis de réduire le temps d'analyse tout en conservant une bonne séparation des pics. La méthode HPLC est validée en fonction de la linéarité des gammes d'étalonnages, c'est-à-dire la vérification de la proportionnalité de la réponse en fonction de la concentration. On en déduit un intervalle de linéarité dans lequel les alcaloïdes des Amaryllidaceae peuvent être dosés [entre 0 et 1g/L].

Il est bien connu que chez les plantes Amaryllidaceae, les teneurs en alcaloïdes sont très faibles. Chez *Leucojum aestivum* par exemple, les teneurs en galanthamine varient entre 0,02 % de matière sèche (MS) dans les bulbes *in vivo*, et dix fois moins (0,002 % MS) dans les cultures *in vitro*, des teneurs qui sont inférieures à la LDD de l'HPLC (Diop *et al.*, 2006 ; Diop MF, 2007). La faible sensibilité rend la méthode HPLC peu efficace dans l'analyse quantitative des alcaloïdes des Amaryllidaceae, en particulier pour les pics mineurs dans un extrait de plante. La méthode LCMS permet de quantifier la galanthamine, la lycorine et la D3MN à partir d'une quantité $0,02 \cdot 10^{-3}$ µg/mL. Elle permet aussi la distinction des molécules possédant la même masse moléculaire grâce à la haute résolution et son couplage à la spectrométrie de masse. Pour toutes ces raisons, c'est une méthode très efficace et indispensable, surtout dans l'étude de la galanthamine et de la lycorine.

Un extrait de plantes renferme aussi d'autres alcaloïdes qui ont été observés en HPLC et en LCMS. Le manque de standards limite leur identification en HPLC. Afin de confirmer les pics identifiés dans nos extraits, quantifier les composés ou même identifier d'autres alcaloïdes également présents, nous avons eu recours, dans un troisième temps, à la chromatographie en phase gazeuse, permettant la caractérisation des pics et des composés en se référant à une base de données connues ou à des travaux rapportés dans la littérature.

La GCMS représente un moyen indispensable pour l'identification des alcaloïdes dans les extraits de plantes, surtout lorsqu'il s'agit d'étudier des composés dont on ne possède pas les témoins positifs. Nous allons pouvoir identifier chez nos espèces, les alcaloïdes des Amaryllidaceae décrits auparavant par Berkov et ses collaborateurs, et ceux répertoriés dans la librairie NIST08.LIB. L'avantage de cette méthode demeure dans la reproductibilité de l'impact électronique nous permettant ainsi de comparer les spectres de fragmentation des alcaloïdes à ceux décrits dans la littérature et dans la base de données. Elle représente aussi une technique d'analyse plus sélective et plus sensible que l'HPLC couplée à l'UV.

Quant à l'avantage de la chromatographie sur couche mince, il s'agit de pouvoir analyser des échantillons de volume faible ($< 250 \mu\text{L}$) en évitant le problème de microfiltration, ainsi que d'analyser les échantillons en suspension avec des sels (Tampon phosphate, tris-HCl) et/ou renfermant des protéines comme dans le cas de l'extraction des microsomes. Ces derniers peuvent dégrader et bloquer la colonne LCMS. Les différents composés sont d'abord séparés sur les plaques TLC, puis le couplage à la spectrométrie de masse, par les biais de l'interface CAMAG, nous permet d'identifier et de quantifier les tâches correspondantes à la galanthamine et à la lycorine.

Chapitre II.

Effet du saccharose et des phytorégulateurs sur l'organogenèse et le métabolisme des alcaloïdes

Le changement des conditions de culture *in vitro* affecte fortement le métabolisme des alcaloïdes d'une part (Mantell et Smith, 1983), et la régénération des embryons somatiques d'autre part (Malik M, 2008). Différents paramètres peuvent être modifiés en vue d'augmenter l'accumulation des alcaloïdes *in vitro*. La modification de la composition du milieu de culture, et les changements de facteurs environnementaux ont une influence sur la croissance cellulaire et sur la biosynthèse des alcaloïdes (Tadeusz Aniszewski, 2007). Dans l'objectif d'améliorer la croissance cellulaire et l'accumulation des alcaloïdes dans les cultures *in vitro*, nous avons procédé par une optimisation du milieu de culture suivie d'une étude de l'effet du saccharose et des phytorégulateurs sur le métabolisme alcaloïdique des espèces *N. pseudonarcissus*, *L. aestivum*, et *G. elwesii*.

A - Optimisation du milieu de culture de *N. pseudonarcissus* pour l'induction d'une organogenèse

Chez les Amaryllidaceae, quelques travaux ont rapporté que l'accumulation de la galanthamine dans les tissus *in vitro* dépend de plusieurs facteurs et conditions de culture (Sellès *et al.*, 1997 ; Colque *et al.*, 2004 ; Diop *et al.*, 2006 ; Diop *et al.*, 2007; Ptak *et al.*, 2009 ; Georgiev *et al.*, 2009 ; Berkov *et al.*, 2009). D'autres ont rapporté que l'organogenèse est favorable pour une accumulation accrue de métabolites secondaires (Ptak *et al.*, 2009). A l'inverse, l'état indifférencié n'est pas favorable à la synthèse d'alcaloïdes en particulier (Laurain-Mattar D, 2008). Notre objectif est donc d'optimiser le milieu de culture *in vitro* de tissus d'Amaryllidaceae *via* un plan d'expérience, afin de définir les conditions aboutissant aux taux optimaux de survie, callogenèse ou organogenèse (formation de bulbilles et de racines).

1. Plan d'expérience

Le plan d'expérience initialement prévu pour les trois espèces n'a pu être poursuivi que pour *Narcissus* en raison de la perte de matériel *in vitro* suite à des nécroses et à des contaminations bactériennes et fongiques. Nous allons d'abord expliquer notre choix des facteurs inclus dans le plan d'expérience.

2. Choix de quatre facteurs influençant l'organogenèse

De nombreux facteurs peuvent influencer les cultures de plantes *in vitro*. Pour la culture *in vitro* de bulbes, on peut trouver des conditions expérimentales très différentes dans la littérature scientifique. Ainsi, selon les auteurs, ces cultures se font soit à la lumière soit à l'obscurité, à différentes températures, avec ajout de sucres et souvent de phytorégulateurs (à des concentrations variables), avec des compositions en sels minéraux différentes, etc... Aussi, de très nombreux milieux de culture ont été publiés, dans le souci d'adapter plus étroitement la composition de la solution minérale de base au matériel végétal utilisé et au type de culture (cals, embryogenèse,...). En 2006, Staikidou *et al.*, ont développé un milieu « G » pour certaines espèces de *Galanthus*, basé sur la composition minérale des bulbes *in vivo*. Ce milieu a été comparé au milieu Murashige et Skoog (MS), et l'initiation de bulbilles était supérieure ou inférieure selon les espèces; le milieu MS donnant alors de meilleurs résultats pour *G. elwesii*. Le milieu G réduisait l'hyperhydratation de cette espèce (Staikidou *et al.*, 2006).

Le milieu MS reste employé, d'une manière générale, pour tous les types de culture *in vitro* (Margara J, 1982). Nous avons donc utilisé ce milieu de base, auquel nous avons ajouté plusieurs composés organiques à des concentrations variables. Nous allons expliquer, ci-dessous, pourquoi, parmi les facteurs potentiellement influant sur nos cultures, nous avons choisi d'en faire varier quatre. Nous préciserons ensuite le rôle biologique de ces facteurs.

Dans le laboratoire, des explants d'Amaryllidaceae sont mis en culture *in vitro* et étudiés depuis plusieurs années. Les explants issus des bulbes sont d'abord cultivés sur milieu MS solide. Ce milieu de base est enrichi en saccharose (30 g/L) pour l'apport de carbone, et généralement en phytorégulateurs. Deux types de phytorégulateurs, une cytokinine et des auxines, sont ainsi ajoutés au milieu MS à des ratios variables : la BAP (cytokinine), et le 2,4-D ou le piclorame (auxines). Ces deux types de phytorégulateurs sont couramment ajoutés aux milieux de cultures végétales, dans des gammes de concentrations variant généralement de 0 à 20 μ M. Nous avons donc fait varier ces deux phytorégulateurs dans cette gamme. Les résultats de notre plan d'expérience devraient faire ressortir les ratios optimaux de ces phytorégulateurs pour différents effets recherchés (survie des explants, callogenèse et organogenèse).

Une recherche bibliographique a révélé l'importance d'autres facteurs du milieu de culture impliqués dans la croissance et le développement des tissus végétaux. Ainsi, certaines études se sont intéressées à l'effet des sucres sur la croissance de bulbes *in vitro*. Staikidou *et al.*, ont

par exemple étudié les effets de 3 sucres (glucose, fructose et saccharose) sur 2 variétés de *Narcissus*. Si les effets de ces 3 sucres étaient similaires à faible concentration (moins de 45 g/L), le saccharose permettait d'obtenir une plus grande masse sèche des bulbilles à 90 g/L. De plus, l'augmentation de la concentration en sucre entraînait une meilleure croissance, avec une plus grande taille et un plus grand nombre de bulbilles (Staikidou *et al.*, 2005). D'autres études ont montré l'intérêt d'une augmentation de l'apport en sucres pour la croissance ou le développement d'Amaryllidaceae *in vitro* (Sellès *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 1998). Nous avons donc choisi de faire varier la concentration en saccharose entre 0 et 120 g/L. L'absence de sucre est à priori létale, mais cette situation ne se présente qu'une fois parmi les 24 expériences du plan. La plus forte concentration (120 g/L) peut paraître élevée, mais a déjà été utilisée dans une étude précédente (Hanks GR, 2002). Cette limite permet d'étudier une plus large gamme. La matrice correspondante fait notamment apparaître une majorité d'expériences où la concentration en saccharose est fixée à 60 ou 90 g/L, concentrations que nous souhaitons tester, ainsi que des expériences à 30 g/L de saccharose, concentration habituellement employée.

Enfin, l'utilisation simultanée de charbon et de saccharose pourrait avoir un effet synergique sur la croissance de bulbilles *in vitro*. C'est ce qu'a montré Staikidou en étudiant les effets de ces deux facteurs sur la croissance de différentes espèces de *Galanthus*, en particulier *G. nivalis* "Flore Pléno" et *G. elwesii* (Staikidou *et al.*, 2006). Dans leur étude sur la micropropagation de *Lilium longiflorum*, Bong Hee Han et ses collaborateurs ont ajouté, en plus de concentrations importantes de saccharose, du charbon. C'est le milieu enrichi de 5 à 10 g/L de charbon et 250 g/L de saccharose qui a été le plus efficace pour la formation et la croissance de bulbilles à partir de plantules. Nous avons utilisé, le cas échéant, les mêmes concentrations de charbon activé dans notre plan d'expérience. Les effets potentiels du charbon activé, que nous détaillerons dans le paragraphe suivant, sont différents selon les situations. Son ajout au milieu peut aussi bien être positif que négatif pour la culture de tissus végétaux. Nous cherchons donc, à travers nos expériences, à évaluer ses effets mais aussi son interaction éventuelle avec les autres variables (saccharose et phytorégulateurs).

D'autres facteurs du milieu pourraient avoir une importance dans notre étude, en particulier d'autres phytorégulateurs, mais aussi certains minéraux (azote et phosphore notamment), le pH... Il serait aussi intéressant d'étudier l'influence de facteurs physiques tels que la luminosité et la température. Le nombre de manipulations aurait alors été multiplié, ce qui n'était pas possible dans le temps imparti. Nous nous sommes donc limitée aux quatre

variables discutées ci-dessus: la BAP, le 2,4-D, le saccharose et le charbon. Leurs effets propres et d'éventuelles interactions pourraient être détectés. Ces facteurs varient dans des gammes relativement larges, mais comparables aux gammes habituellement testées dans ce type d'expérience. Quelques soient les résultats du plan d'expérience (en terme d'optimisation du milieu), le matériel végétal devait donc être régénéré.

a. Les deux phytohormones utilisées (2,4-D et BAP)

Nous utilisons ici principalement le 2,4-D, et aussi le piclorame (acide 4-amino-3,5,6-trichloropyridine-2-carboxylique) dont les effets morphogènes sont parfois comparables. Ce sont des auxines très fortes, qui agissent à très faible concentration (de l'ordre du μM , voire du nM pour le piclorame). Le 2,4-D devient rapidement toxique aux concentrations élevées, provoquant la réaction hyperhydrique des tissus.

Les cytokinines sont des dérivés de l'adénine. Elles sont caractérisées par leur capacité à stimuler les divisions cellulaires dans les tissus cultivés *in vitro*. Il existe différentes cytokinines, mais leurs activités seraient moins variables que celles des auxines. La benzyladénine (ou BAP), très active et peu coûteuse, est donc souvent employée. Les effets des cytokinines varient beaucoup selon leurs concentrations : de 10^{-7} à 10^{-6} M, elles sont souvent utilisées pour stimuler la prolifération de tissus en culture, de 10^{-6} à 10^{-5} M, elles sont largement employées pour déclencher la néoformation de bourgeons sur des cals, et à forte concentration (10^{-5} à 10^{-4} M), elles peuvent par exemple favoriser la prolifération *in vitro* des méristèmes axillaires en culture d'apex.

Le choix des concentrations, des combinaisons et éventuellement des séquences de régulateurs de croissance est essentiel pour le déclenchement et la régulation de l'organogenèse. Les combinaisons à essayer pour un matériel et un type d'organogenèse donnés sont donc assez nombreuses. D'où l'intérêt du plan d'expérience, qui pourrait révéler des ratios optimaux entre auxine et cytokinine, en un minimum de manipulations.

b. Saccharose et charbon

Notre plan d'expérience, avec des concentrations de saccharose variant entre 0 et 120 g/L, pourrait nous donner les concentrations optimales de ce saccharose pour différentes réponses : formation de cals, de racines et de bulbilles.

Le charbon activé est couramment utilisé dans les milieux de culture de tissus. Il peut promouvoir ou inhiber la croissance *in vitro*, en fonction des espèces et des tissus utilisés. Ses

effets pourraient être attribués à l'assombrissement du milieu, à l'adsorption de substances indésirables, ou de facteurs de régulation et autres composés organiques, ou au relargage de substances présentes ou adsorbées par le charbon activé. Par exemple, Ebert et Taylor ont étudié les variations des concentrations de 2,4-D dans des milieux de culture contenant du charbon (Ebert et Taylor, 1989). Ce phytorégulateur a été plus ou moins adsorbée selon les conditions (température, pH, viscosité du milieu), réduisant ainsi sa disponibilité pour les tissus végétaux qui se sont alors développés différemment.

Aussi, notre plan d'expérience pourrait révéler des interactions entre le charbon et le 2,4-D ou d'autres facteurs (BAP et saccharose).

3. Évaluation des réponses : survie, callogenèse et organogénèse

Après quatre mois de culture *in vitro*, les résultats suivants ont été quantifiés pour chaque espèce, et dans chaque condition de culture pour le plan d'expérience: survie, callogenèse et organogénèse (bulbes ou racines).

a. Taux de survie

Le taux de survie est déterminé de la façon suivante:

$$\text{Taux de survie} = \frac{\text{Nombre d'explants final}}{\text{Nombre d'explants initial} - \text{Nombre d'explants contaminés}}$$

$$=$$

$$\frac{(\text{Nombre d'explants final}) - (\text{Nombre d'explants contaminés}) - (\text{Nombre d'explants necrosés})}{(\text{Nombre d'explants initial}) - (\text{Nombre d'explants contaminés})}$$

b. Taux de callogenèse

Les cals peuvent être plus ou moins développés sur un explant, et prendre différentes formes (Figure 36). Pour cela, le taux de callogenèse est calculé comme suit :

$$\text{Taux de callogenèse} = \frac{\text{Nombre d'explants avec prolifération cellulaire}}{\text{Nombre d'explants final}}$$



Figure 36 : Différents types de développements cellulaires obtenus après 5 mois de culture d'explants de *Narcissus*.

c. Taux d'organogenèse

Les taux d'organogenèse (formation de bulbilles ou de racines) sont calculés de la manière suivante :

$$\text{Taux d'organogenèse} = \frac{\text{Nombre d'organes}}{\text{Nombre d'explants final}}$$

Ce calcul prend en compte le nombre d'organes par explant. Le même explant peut développer plusieurs tissus ou organes différents. Les réponses sont très variables, même pour les explants de la même espèce cultivés sur le même milieu et dans les mêmes conditions. Pour cela, une moyenne est calculée pour 6 explants différenciés, et intégrée à la matrice du plan d'expérience.

Compte tenu du nombre assez important de nécrose, plusieurs expériences n'ont pas pu aboutir. Ainsi, le plan d'expérience initialement prévu pour trois espèces d'Amaryllidaceae (*L. aestivum*, *G. elwesii*, et *N. pseudonarcissus*), n'a pu être poursuivi que pour *N. pseudonarcissus*.

Les coefficients présentés dans le tableau 6 correspondent aux équations polynomiales modélisant les réponses (taux de survie, de callogenèse et d'organogenèse (formation de bulbilles ou de racines)) à partir de la matrice de Doehlert décrite précédemment (Matériels et Méthodes) en utilisant le logiciel Nemrod[®]. Les valeurs de R² indiquent que peu de coefficients sont significatifs.

Tableau 6 : Estimations des ratios en fonction des 4 facteurs (saccharose, BAP, 2,4-D et charbon). Équations du type $Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j$.

Facteurs (X)	Ratios (Y)			
	Survie	Cals	Racines	Bulbes
	0,372***	0,468**	-0,000	0,100
Saccharose	0,186**	-0,043	0,025	0,090
BAP	0,028	-0,035	-0,023	-0,085
2,4-D	-0,123*	-0,056	0,143	-0,022
Charbon actif	-0,092	-0,161	-0,269*	-0,351**
(Saccharose) ²	-0,133	-0,286	0,046	0,082
(BAP) ²	0,002	0,329	-0,015	0,085
(2,4-D) ²	-0,096	-0,115	0,409**	-0,005
(Charbon actif) ²	0,055	0,091	0,252	0,291
Saccharose/BAP	-0,115	-0,248	-0,000	0,426
Saccharose/2,4-D	-0,153	0,462	-0,612*	-0,151
BAP/2,4-D	-0,007	0,355	0,568	0,178
Saccharose/Charbon actif	0,128	-0,253	-0,095	-0,061
BAP/Charbon actif	-0,155	0,386	0,343	0,112
2,4-D/Charbon actif	0,012	-0,555	0,332	-0,144
R ²	0,830	0,568	0,794	0,762

* Significatif à 90 %, ** Significatif à 95 %, et *** Significatif à 99 %.

Les nombres précédés d'un signe négatif indiquent qu'une augmentation des facteurs correspondant entraîne une diminution de la réponse. Par exemple, une augmentation de la concentration de 2,4-D entraîne une diminution de la survie des explants, ce qui est cohérent avec sa toxicité. De même, le charbon aurait toujours un effet négatif significatif quant à l'organogenèse : sa concentration dans le milieu diminue les taux de racines et de bulbilles.

A l'inverse, l'ajout de saccharose augmente plutôt la survie des explants. Ce résultat peut paraître évident dans la mesure où le saccharose du milieu est ici la seule source de carbone. Les autres effets du saccharose seul ne sont pas significatifs, mais de plus faibles quantités pourraient augmenter la callogenèse et diminuer l'organogenèse (et inversement). L'augmentation de l'apport en saccharose serait donc bénéfique au développement de bulbilles, ce qui rejoint les conclusions de Staikidou (Staikidou *et al.*, 2005). Le même effet du saccharose vient aussi confirmer les résultats rapportés par Chow *et al.*, chez *Narcissus* cultivars (Chow *et al.*, 1992) et par Berkov *et al.*, chez *L. aestivum* (Berkov *et al.*, 2009).

Les effets de la BAP seule ne sont pas significatifs et ceux du 2,4-D le sont très peu. Ce phytorégulateur stimulerait la rhizogenèse, ce qui est bien connu des auxines dont elle fait partie. L'effet combiné des deux phytorégulateurs n'apparaît pas significatif dans le tableau 6, mais les coefficients suggèrent une interaction positive de ces deux phytorégulateurs, à la fois pour la callogenèse et l'organogenèse. Par contre, le 2,4-D semble interagir négativement avec le saccharose pour la plupart des réponses, en particulier pour la rhizogenèse. Leur interaction serait en faveur d'une callogenèse, contrairement à chacun de ces facteurs pris séparément pour cette réponse.

Enfin, bien que les autres coefficients ne soient pas significatifs, ils nous donnent une idée des effets éventuels de certains facteurs ou interactions. Par exemple, chaque facteur pris séparément aurait un effet plutôt négatif sur la callogenèse. Par contre, certaines de leurs interactions seraient plutôt callogènes (saccharose/2,4-D, BAP/2,4-D et BAP/charbon). Excepté pour le saccharose (qui aurait des effets positifs propres), il en va de même pour la formation de bulbilles, les interactions plutôt positives étant saccharose/BAP, BAP/2,4-D et BAP/charbon. Par ailleurs, les interactions charbon/phytorégulateur auraient des effets assez différents des phytorégulateurs seules. C'est notamment le cas de l'interaction charbon/2,4-D : ce phytorégulateur est plutôt toxique à concentration élevée, alors que son effet combiné avec le charbon serait légèrement favorable à la survie. Le résultat peut s'expliquer par l'adsorption d'une partie du phytorégulateur par le charbon, diminuant ainsi ses effets négatifs. L'apport de charbon ne nous semble pas bénéfique dans ces conditions, cependant les quantités, de saccharose et de phytorégulateurs, ajoutées au milieu de culture peuvent être optimisées.

À partir des modèles calculés, le logiciel Nemrod[®] permet aussi d'étudier les interactions de 2 facteurs (les autres étant fixés) et de déterminer leurs ratios optimaux. Les interactions entre les deux phytorégulateurs nous intéressent particulièrement. De plus, on a vu que pour toutes les réponses considérées, le charbon paraît toujours défavorable et un niveau de saccharose d'environ 70 g/L semble souvent optimal. Nous avons donc fixé les niveaux de ces deux facteurs (0 g/L de charbon et 60 g/L de saccharose), et étudié les interactions éventuelles entre les phytorégulateurs pour chaque réponse.

Dans ces conditions, les combinaisons optimales de BAP/2,4-D sont **4/10** pour un **taux élevé de callogenèse (0,9-1)**, et **5/12** pour un **taux élevé de formation de bulbilles (0,7)**. Cela est en accord avec les résultats de Khanam *et al.*, qui montrent qu'une induction de la callogenèse sur un milieu supplémenté avec de la BAP associée à du 2,4-D, permet l'obtention d'une masse fraîche importante (Khanam *et al.*, 2000). Quant au **taux de survie**,

celui-ci est significatif quand il s'agit d'une combinaison riche en BAP et pauvre en 2,4-D. Le taux est optimisé à 60 % de survie avec **15 µM BAP et 8 µM 2,4-D**. Enfin, le **taux de formation de racines** est optimal avec 80 % de rhizogenèse en présence de **6 µM BAP et 4 µM 2,4-D**.

Parmi les travaux rapportés dans la littérature sur les Amaryllidaceae, peu sont ceux qui étudient la culture de tissus non différenciés chez ces espèces. L'équipe de Takayama *et al.*, montre que le taux de formation des embryons somatiques a été favorable en présence d'une combinaison de BAP/2,4-D (Takayama *et al.*, 1991). Ensuite Sage *et al.*, ont montré qu'un ajout de 4,25 µM 2,4-D aux cultures de *Narcissus* favorise la callogenèse. L'ajout de 5 à 10 µM 2,4-D a conduit à l'obtention des embryons somatiques alors qu'un faible ajout de 2,4-D (0,5 µM) a semblé moins favorable (Sage *et al.*, 2000). Egalement, d'autres équipes ont observé l'effet des concentrations élevées en 2,4-D (45,2 µM) qui stimulent la formation des cals chez *Hyacinthus orientalis*. Le même effet a été observé en augmentant les quantités d'auxines dans le milieu de culture des feuilles de coing, on favorise ainsi la callogenèse tout en défavorisant l'organogenèse (Chow *et al.*, 1992 ; Morini *et al.*, 2000). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Sellès qui montrent que le transfert des cultures de *N. confusus* sur un milieu MS solide pauvre en auxine (4,5 µM 2,4-D) et riche en cytokinines (22,2 µM BAP) a stimulé la formation des bulbes (Sellès *et al.*, 1997).

4. Conclusion partielle

Les combinaisons optimales de BAP/2,4-D sont **4/10** pour un **taux de callogénèse élevé (0,9-1)**, et **5/12** pour un **taux de formation de bulbilles élevé (0,7)**. Quant au **taux de survie**, le taux est optimisé à **60 %** de survie avec **15 µM BAP et 8 µM 2,4-D**. Enfin, le **taux de formation de racines** est optimal avec **80 %** de rhizogenèse en présence de **6 µM BAP et 4 µM 2,4-D**.

Suite à l'ensemble de nos résultats, qui sont en accord avec la littérature, nous avons choisi un milieu MS optimum contenant **4 µM de BAP, 10 µM de 2,4-D et 60 g/L de saccharose, mais pas de charbon**. Il a donc été décidé de réaliser la mise en culture des explants de *Narcissus* sur ce milieu optimum.

B - Influences du saccharose et des phytorégulateurs sur le métabolisme des alcaloïdes des Amaryllidaceae

La modification des conditions de culture agit fortement, non seulement sur l'organogénèse des explants *in vitro* (Mantell et Smith, 1983), mais aussi sur le métabolisme des alcaloïdes (Malik M, 2008). Merillon *et al.*, ont étudié l'effet du saccharose sur l'évolution du métabolisme des alcaloïdes (Merillon *et al.*, 1984). Une meilleure accumulation de galanthamine a été observé lorsque les tissus de *L. aestivum* et de *N. confusus* sont respectivement cultivés en présence de 180 g/L et 60 g/L de saccharose (Georgiev *et al.*, 2009 ; Sellès *et al.*, 1997).

À ce jour, aucune corrélation entre l'accumulation des alcaloïdes, la diversité des alcaloïdes, et l'activité biologique résultante n'a été étudiée chez les différentes espèces. Notre objectif est de faire varier de nouveau, les concentrations de saccharose (30, 60, 90 et 120 g/L), et la nature des auxines (2,4-D, ANA, piclorame) dans le milieu de culture des bulbilles des trois espèces d'Amaryllidaceae (*N. pseudonarcissus*, *L. aestivum*, et *G. elwesii*) (Figure 37). Le but est de corréliser les effets combinés des conditions de culture (saccharose et phytorégulateurs), avec la diversité et l'accumulation des alcaloïdes *in vitro*, conduisant à une activité anti-acétylcholinestérase (Anti-AChE) puissante.

Les bulbes *in vitro* sont lyophilisés après 4 mois de culture sur deux milieux de culture basaux MSA (10 M 2,4-D + 10 µM BAP) pour l'étude de l'effet du saccharose (0, 30, 60, 90 et 120 g/L), et MSB (60 g/L saccharose + 10 µM BAP) pour l'étude de l'effet des régulateurs de croissance (10 µM 2,4-D, piclorame, ou ANA). Les différents extraits méthanoliques obtenus à partir des matières sèches sont analysés en GCMS. La GCMS nous permet de cribler les alcaloïdes présents dans les extraits et de quantifier la galanthamine présente.



Figure 37 : Bulbilles *in vitro* des trois espèces d'Amaryllidaceae: a) *Leucojum aestivum*, b) *Narcissus pseudonarcissus*, c) *Galanthus elwesii*.

1. Influence sur la diversité des alcaloïdes

a. Effet du saccharose

Les résultats du criblage des alcaloïdes extraits des tissus des trois espèces d'Amaryllidaceae, cultivés sur MSA en présence de différentes concentrations de saccharose sont présentés dans le tableau 7. Afin de comparer le contenu initial en alcaloïdes dans les bulbes de la nature, en parallèle, les bulbes *in vivo* qui ont servi pour la mise en culture des différents explants ont été également analysés.

La biodiversité des alcaloïdes varie selon les espèces. La galanthamine n'a pas été détectée dans les extraits de bulbes *in vivo* des trois espèces étudiées. Les cultures *in vitro* favorisent la diversité, et parfois même dans les tissus, nous observons des alcaloïdes nouveaux n'existant pas dans le bulbe *in vivo* mère.

Parmi les trois espèces analysées, les bulbes *in vivo* de *N. pseudonarcissus* présentent la plus grande diversité en alcaloïdes avec **trois** alcaloïdes identifiés parmi les sept recherchés. Seulement la trisphéridine, l'anhydrolycorine et la crinine ont été identifiées. Pareillement, les bulbes *in vitro* de *N. pseudonarcissus*, renferment la plus grande diversité avec **cinq** alcaloïdes détectés dans les extraits *in vitro* sur les sept recherchés. La galanthamine, l'anhydrolycorine, la crinine, la déméthylmarithidine et la narwédine ont été identifiées. La plus grande diversité est atteinte en cultivant les tissus en présence de **30 g/L** de saccharose.

Les bulbes *in vivo* de *G. elwesii* semblent être moins riches en alcaloïdes, seulement **deux** alcaloïdes ont été identifiés (l'anhydrolycorine, et la crinine). Par contre, la diversité est plus importante dans les cultures *in vitro*, où on observe la présence de la galanthamine, de la lycorine et de la trisphéridine. La plus grande diversité *in vitro* est donc observée avec **quatre** alcaloïdes identifiés dans les tissus cultivés en présence de **60 g/L** de saccharose.

Quant aux bulbes *in vivo* de *L. aestivum*, ceux-ci ont présenté la diversité la plus faible parmi les trois espèces *in vivo*. **Un** alcaloïde (la crinine) a été identifié dans les bulbes *in vivo*. Au contraire, une augmentation de la diversité a été remarquée dans les tissus *in vitro*. **Quatre** alcaloïdes ont été identifiés dans les extraits de tissus cultivés en présence de **30 g/L** de saccharose.

On en conclut, quelque soit l'espèce, que les cultures *in vitro* favorisent la diversité des alcaloïdes. Des alcaloïdes n'existant pas dans les bulbes *in vivo* sont apparus dans les tissus *in vitro*. Et enfin, on remarque que cette diversité est variable d'une espèce à l'autre et elle est dépendante de la quantité de saccharose ajoutée au milieu de culture.

Tableau 7: Criblage par GCMS des extraits de culture *in vitro* d'Amaryllidaceae cultivés sur le milieu basal (MSA) additionné de différentes concentrations de saccharose (30, 60, 90, et 120 g/L).

Espèces	Saccharose (g/L)	Alcaloïde												
		Galanthamine Formule Pic majoritaire	Lycorine C ₁₆ H ₁₇ NO ₄	Trisphéridine C ₁₄ H ₉ NO ₂	Anhydrolycorine C ₁₆ H ₁₃ NO ₂	Crinine C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	Déméthylmaritidine C ₁₆ H ₁₉ NO ₃	Narwéidine C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	286	226	223	250	271	273
<i>G. elwesii</i> <i>in vivo</i>		-	-	-	-	+	-							
	30	-	-	-	-	-	-							
	60	+	-	+	-	+	-							
	90	+	+	-	-	+	-							
120	-	-	+	-	-	-								
<i>N. pseudonarcissus</i> <i>in vivo</i>		-	-	+	+	+								
<i>N. pseudonarcissus</i> <i>in vitro</i>	30	+	-	-	+	+								
	60	-	-	-	-	+	-							
	90	+	+	-	-	+	-							
	120	+	-	-	+	+	-							
<i>L. aestivum</i> <i>in vivo</i>		-	-	-	-	+								
<i>L. aestivum</i> <i>in vitro</i>	30	+	+	-	-	+								
	60	+	+	-	-	-	-							
	90	-	-	-	-	-	-							
	120	-	-	+	-	-	-							

b. Effet des phytorégulateurs

Dans l'objectif de suivre l'évolution de la diversité *in vitro* des alcaloïdes en fonction de la nature de l'auxine additionnée au milieu de culture, nous avons choisi d'étudier trois types d'auxines (2,4-D, ANA, piclorame) en fixant le saccharose à 60 g/L et la cytokinine BAP à 10 μ M. Les résultats du criblage des alcaloïdes extraits des tissus des trois espèces d'Amaryllidaceae, cultivées pendant quatre mois sur milieu MSB en présence des différentes auxines sont présentés dans le tableau 8. Afin de comparer le contenu initial en alcaloïdes dans les bulbes de la nature, les bulbes *in vivo*, qui ont servi pour la mise en culture des différents explants, ont été également analysés.

Dans le tableau 8, on observe toujours, une diversité globale plus élevée dans les tissus *in vitro* que celle dans les bulbes *in vivo*. Une plus grande diversité est atteinte avec **six** alcaloïdes identifiés chez *G. elwesii in vitro* cultivés sur MSB additionné d'ANA. On détecte la galanthamine, la lycorine, la trisphéridine, la crinine, la déméthylmarithidine et la narwédine.

De même, les extraits des tissus *in vitro* de *N. pseudonarcissus* ont montré une meilleure diversité en présence de l'auxine ANA. Les **cinq** alcaloïdes identifiés sont, la galanthamine, la lycorine, la trisphéridine, la crinine et la déméthylmarithidine.

Parmi les trois espèces étudiées, *L. aestivum in vivo* a présenté la diversité la plus faible, avec **quatre** alcaloïdes identifiés dans les extraits de tissus *in vitro* cultivés sur MSB additionné de **2,4-D**. Les alcaloïdes identifiés sont, la galanthamine, la lycorine, la crinine et la déméthylmarithidine.

Comparés à la littérature, nos résultats ont conduit à une diversité alcaloïdique plus faible que celle rapportée par Georgiev et ses collaborateurs qui ont mis au point un milieu optimisé additionné de 8 μ M ANA et 9 μ M BAP, et conduisant à la détection de 12 alcaloïdes dans les tissus de *L. aestivum* (Georgiev *et al.*, 2009). La même équipe a montré en 2005 une diversité plus faible des alcaloïdes limitée à un nombre de six seulement quand le milieu était additionné d'une faible quantité d'auxine (0,8 μ M ANA) (Berkov *et al.*, 2005).

Tableau 8: Criblage par GCMS des extraits de culture *in vitro* d'Amaryllidaceae cultivés sur le milieu basal (MSB) additionné de différents types de phytorégulateurs (2,4-D; ANA et piclorame).

Espèces Amaryllidaceae	Phytorégulateurs (10 µM)	Alcaloïde												
		Galanthamine Formule C ₁₇ H ₂₁ NO ₃	Lycorine C ₁₆ H ₁₇ NO ₄	Trispnéridine C ₁₄ H ₉ NO ₂	Anhydrolycorine C ₁₆ H ₁₃ NO ₂	Crinine C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	Déméthylmaritidine C ₁₆ H ₁₉ NO ₃	Narvédine C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	286	226	223	250	271	273
majoritaire		Pic												
<i>G. elwesii</i> <i>in vivo</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2,4-D	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
	ANA	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	
	Piclorame	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>N. pseudonarcissus</i> <i>in vivo</i>		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	2,4-D	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
	ANA	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
	Piclorame	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
<i>L. aestivum</i> <i>in vivo</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2,4-D	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
	ANA	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Piclorame	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	

2. Influence sur l'accumulation de la galanthamine et sur l'activité biologique

Dans l'objectif de suivre l'évolution de l'accumulation de la galanthamine, en fonction des différentes concentrations de saccharose (30, 60, 90 et 120 g/L) et des différents types d'auxines (2,4-D, ANA, piclorame), cet alcaloïde a été quantifié par GCMS dans les extraits des tissus *in vitro* des trois espèces cultivées sur MSA et MSB. Les extraits des plantes *in vivo* ont été aussi analysés. La quantification de la galanthamine a été réalisée en se référant à la courbe d'étalonnage de la galanthamine standard ($T_r = 22,6$ min). Les extraits ont servi, par la suite, pour la mesure de leur activité inhibitrice de l'AChE à l'aide du test Ellman (Ellman *et al.*, 1961). L'activité de chaque extrait a été comparée au pourcentage d'inhibition de la galanthamine et de la tacrine standards possédant respectivement des activités de $83,8 \pm 2,1$ % et $98,8 \pm 0,3$ % d'inhibition.

a. Analyses des extraits de *G. elwesii*

L'accumulation de la galanthamine a été quantifiée par GCMS dans les extraits *in vivo* et *in vitro* de *G. elwesii* (Figure 38). L'augmentation de cette accumulation, observée dans les cultures *in vitro*, vient confirmer nos résultats du criblage par GCMS qui ont montré précédemment que les cultures *in vitro* sont plus riches en alcaloïdes que leurs bulbes *in vivo*. Toutefois, on remarque une activité inhibitrice importante ($34,43 \pm 10$ % d'inhibition) exercée par les extraits des bulbes *in vivo* de *G. elwesii* qui ne renferment pas de galanthamine (Figure 39). Ce résultat indique la présence d'autres alcaloïdes possédant également un pouvoir inhibiteur de l'AChE.

L'accumulation maximale de **galanthamine** est observée dans les extraits de tissus *in vitro* cultivés sur MSA en présence de **60 et 90 g/L** de saccharose (Figure 39A). Dans ces extraits, le maximum de galanthamine est de l'ordre de **$0,02 \pm 0,01$ % MS**, ce qui signifie une amélioration *in vitro* équivalente à 20 fois l'accumulation naturelle *in vivo*. L'accumulation de galanthamine dans les tissus *in vitro* est aussi accompagnée d'une activité inhibitrice comparable à celle des extraits *in vivo*, et représentant un pourcentage maximal de **$38,5 \pm 6$ % d'inhibition**. En parallèle, la meilleure accumulation de galanthamine obtenue par les tissus *in vitro* n'a pas été améliorée en substituant dans le milieu MSB, le 2,4-D par l'ANA ou le piclorame (Figure 39B). Ces derniers ne semblent pas être efficaces pour l'accumulation de la galanthamine ni pour l'inhibition de l'AChE. Le remplacement du 2,4-D par l'ANA ou le piclorame entraîne une baisse de l'activité inhibitrice qui varie entre 11 et 13 ± 5 % d'inhibition.

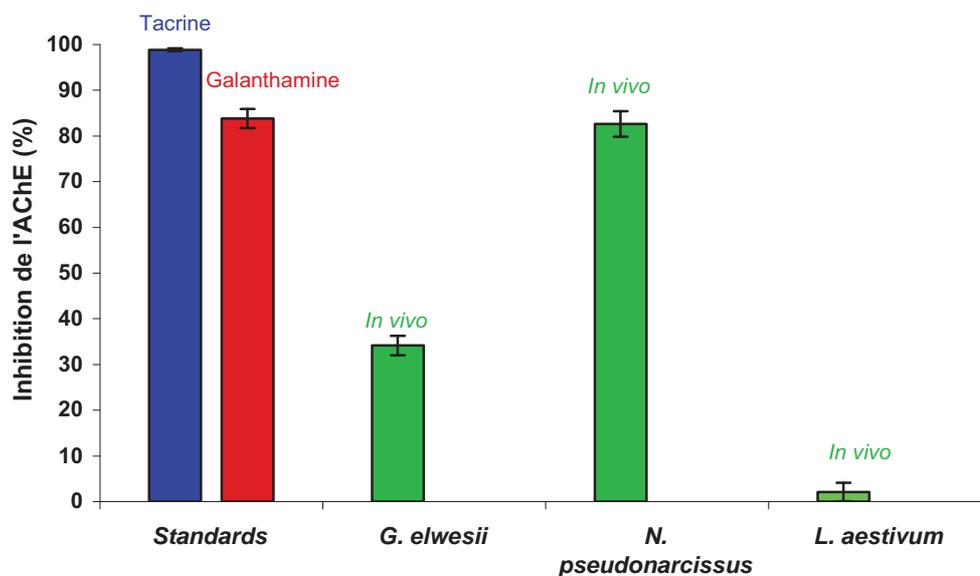


Figure 38 : Pouvoirs inhibiteurs de l'AChE des extraits des bulbes *in vivo* des Amaryllidaceae.

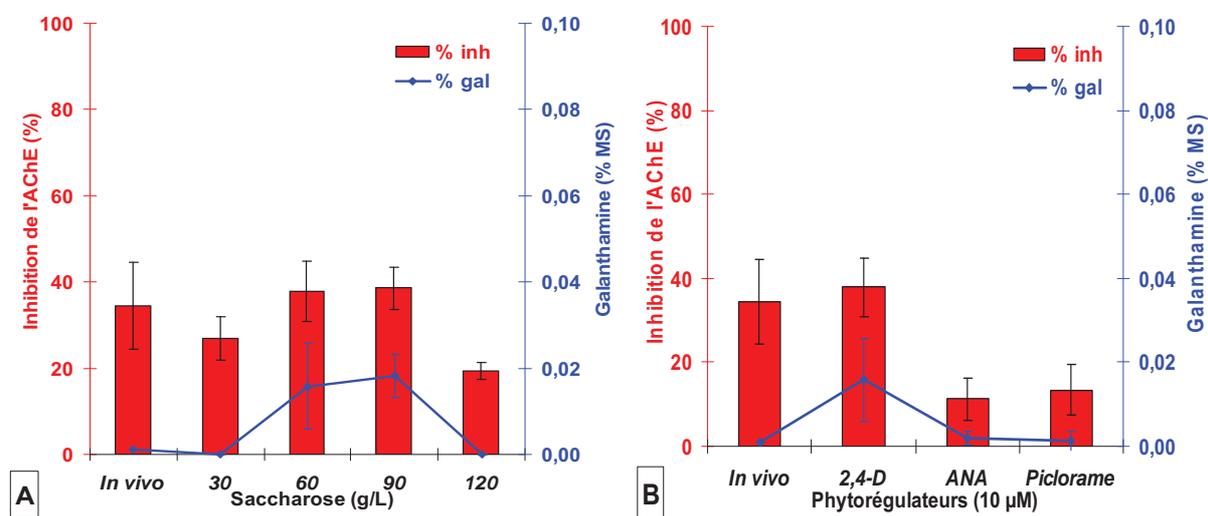


Figure 39 : Pourcentages d'accumulation de la galanthamine et d'activité antiAChE dans les extraits *in vivo* et *in vitro* de *G. elwesii*. A : en fonction des différentes concentrations de saccharose ajoutées au milieu de culture MSA ; B : en fonction des régulateurs de croissance ajoutés au milieu de culture MSB.

b. Analyses des extraits de *N. pseudonarcissus*

Parmi les trois espèces étudiées, *N. pseudonarcissus* représente l'espèce la plus riche en **galanthamine** (0,1 % MS) (Figure 40A). Le même phénomène observé précédemment chez *G. elwesii*, se reproduit chez *N. pseudonarcissus* avec une amélioration de la teneur de galanthamine *in vitro* (**0,08 à 0,1 ± 0,01 % MS**). Une accumulation *in vitro*, de l'ordre de 8 à 10 fois plus que celle détectée *in vivo*, est atteinte en cultivant les tissus de *N. pseudonarcissus* sur un milieu MSA additionné de **30 et 120 g/L** de saccharose.

En parallèle, la variation de la nature du phytorégulateur dans le milieu MSB n'a montré aucun effet significatif vis-à-vis de l'accumulation de la galanthamine et de l'activité inhibitrice de l'AChE (Figure 40B). Une baisse de l'activité inhibitrice, qui varie entre 17,55 et 26,64 ± 5 % d'inhibition, a été remarquée dans les cultures *in vitro*. Cela est équivalent à une différence d'environ 40 %, entre l'inhibition maximale exercée par les extraits des bulbes *in vivo* (80 ± 1,7 % d'inhibition) et l'inhibition moyenne exercée par les extraits des tissus *in vitro* (22,1 % d'inhibition).

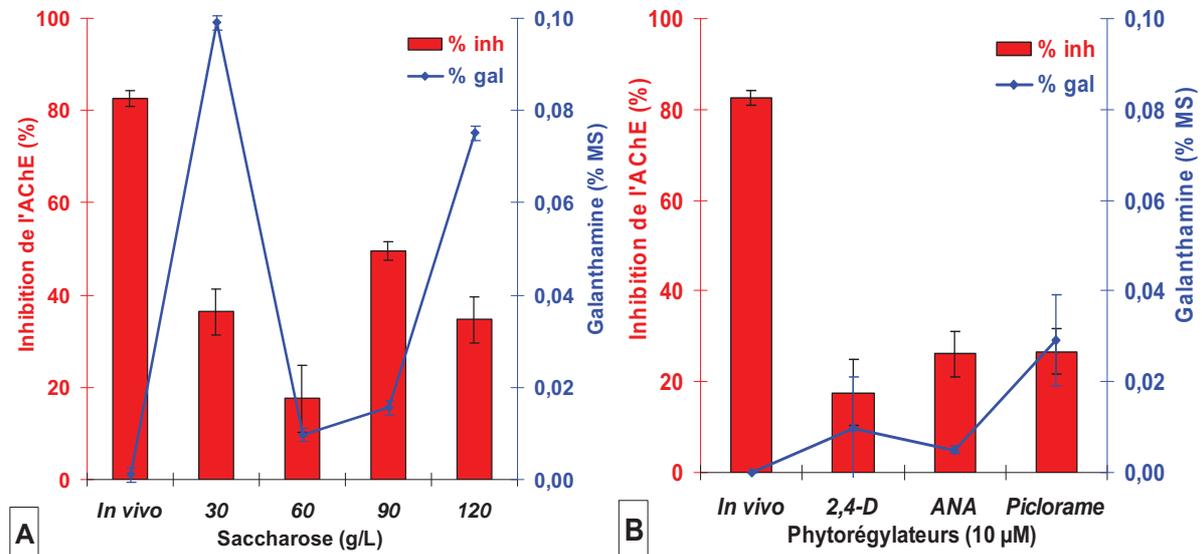


Figure 40 : Pourcentages d'accumulation de la galanthamine et d'activité antiAChE dans les extraits *in vivo* et *in vitro* de *N. pseudonarcissus*. A : en fonction des différentes concentrations de saccharose ajoutées au milieu de culture MSA ; B : en fonction des régulateurs de croissance ajoutés au milieu de culture MSB.

Dans ces conditions optimales, la présence de la galanthamine dans les extraits est toujours accompagnée d'une activité inhibitrice de l'ACHé (35 ± 5 % d'inhibition). Néanmoins, les extraits *in vivo*, ne renfermant pas de galanthamine, ont montré une activité inhibitrice importante ($80 \pm 1,7$ % d'inhibition) comparable aux témoins de galanthamine ($83,8 \pm 2,1$ %) et de tacrine ($98,8 \pm 0,3$ %). Ces résultats intéressants peuvent être expliqués par la présence d'autres alcaloïdes comme la trisphéridine, l'anhydrolycorine et la crinine chez *N. pseudonarcissus* (Figure 40). Néanmoins, d'autres alcaloïdes inconnus ont été détectés lors du criblage GCMS dans les extraits *in vivo* et *in vitro*, qui peuvent révéler la même activité inhibitrice ou représenter des complexes synergiques (Figure 41AB).

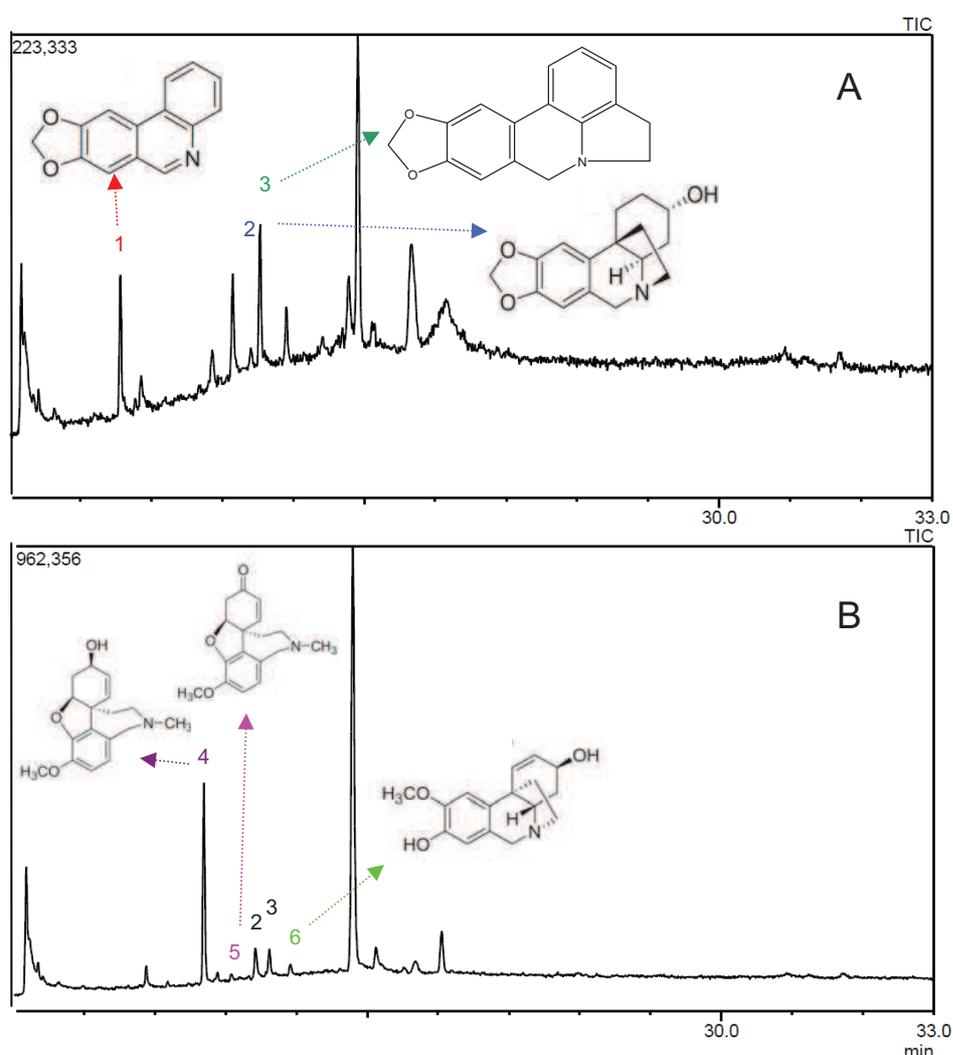


Figure 41 : Chromatogrammes GCMS des extraits de bulbes *in vivo* de *N. pseudonarcissus* (A) et de tissus *in vitro* (B) cultivés sur MSA + 30 g/L de saccharose. Trisphéridine (1); Crinine (2); Anhydrolycorine (3); Galanthamine (4); Narwédine (5) et Déméthylmarithidine (6).

c. Analyses des extraits de *L. aestivum*

Les résultats de quantification par GCMS de la galanthamine dans les extraits *in vivo* et *in vitro* de *L. aestivum*, et de la mesure à l'aide du test Ellman de leur activité inhibitrice de l'AChE, sont illustrés dans la figure 42.

Les extraits des bulbes *in vivo* de *L. aestivum* n'ont montré aucun pouvoir d'inhibition de l'AChE. Lors du criblage par GCMS, cette espèce a présenté la plus faible diversité des alcaloïdes, où seulement, la crinine a été identifiée dans les extraits des bulbes *in vivo*. Cela peut expliquer l'absence de l'activité biologique de ces derniers. Toutefois, les cultures *in vitro* ont montré une augmentation de la diversité des alcaloïdes, et aussi une accumulation de la galanthamine (Figure 42A). La présence de la galanthamine dans les extraits *in vitro* est souvent accompagnée d'une inhibition de l'AChE. L'accumulation maximale (0,032 à 0,045 ± 0,01 % MS), accompagnée de l'activité inhibitrice maximale (24,4 à 54 ± 5 % d'inhibition) sont observées dans les tissus *in vitro* cultivés sur MSA en présence de 30 et 60 g/L de saccharose. Les teneurs en galanthamine ainsi que le pourcentage d'inhibition diminuent drastiquement en présence de concentrations élevées de saccharose.

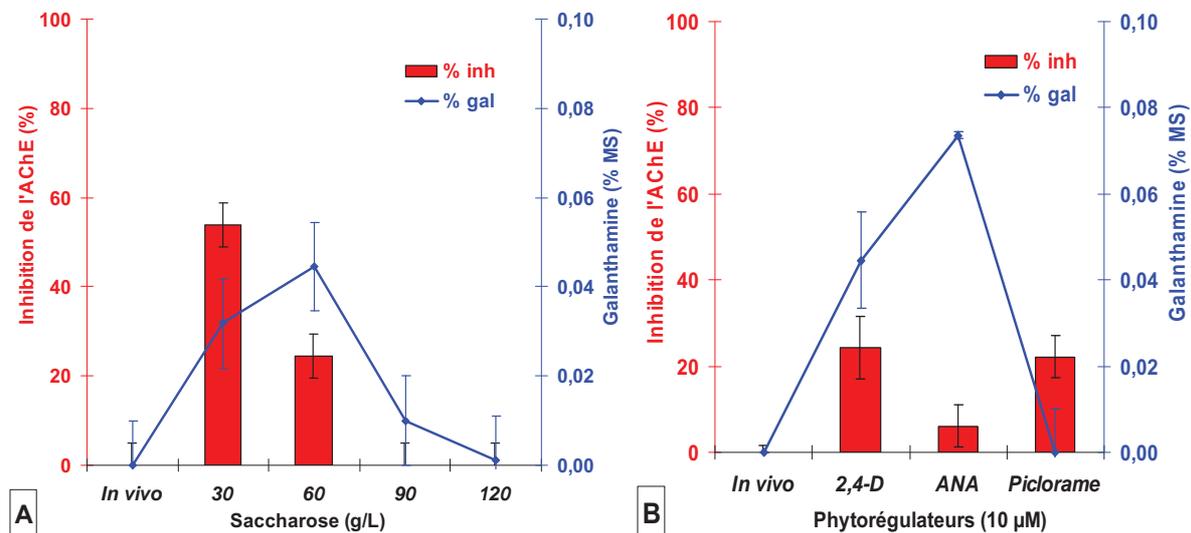


Figure 42 : Pourcentages d'accumulation de la galanthamine et d'activité antiAChE dans les extraits *in vivo* et *in vitro* de *L. aestivum*. A : en fonction des différentes concentrations de saccharose ajoutées au milieu de culture MSA ; B : en fonction des régulateurs de croissance ajoutés au milieu de culture MSB.

L'ajout du piclorame aux milieux de culture de *L. aestivum* n'a pas montré un effet favorable pour l'accumulation de la galanthamine (0 % MS), mais pourtant les extraits correspondant ont montré une activité inhibitrice de l'AChE d'environ 22,2 % (Figure 42B). La substitution du 2,4-D par l'ANA a conduit à l'accumulation de galanthamine, 2 fois plus dans les tissus cultivés sur MSB (Figure 42B). Le pourcentage de galanthamine maximal de l'ordre de **0,075 ± 0,001 % MS** est donc atteint en cultivant les tissus *in vitro* de *L. aestivum* sur MSB additionné d'ANA.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Stanilova et ses collaborateurs (Stanilova *et al.*, 2010). Cette équipe a rapporté que l'accumulation optimale de galanthamine (0,035 % MS) est obtenue quand le milieu de culture est additionné de l'auxine ANA combinée à la cytokinine BAP.

3. Conclusion partielle

Au terme du criblage par GCMS, on en déduit que les effets du saccharose et des auxines sur le profil des alcaloïdes des Amaryllidaceae sont variables d'une espèce cultivée à l'autre. Distinctement, les meilleures combinaisons de saccharose et de phytorégulateurs conduisant à une plus grande diversité des alcaloïdes sont les suivantes :

- Pour *G. elwessi* : MS + 60 g/L de saccharose + 10 µM ANA + 10 µM BAP,
- Pour *N. Pseudonarcissus* : MS + 30 g/L de saccharose + 10 µM ANA + 10 µM BAP,
- Pour *L. aestivum* : MS + 30 g/L de saccharose + 10 µM 2,4-D + 10 µM BAP.

Au terme des analyses quantitatives, on remarque que *N. pseudonarcissus* représente l'espèce la plus riche en galanthamine. L'accumulation de galanthamine est variable d'une condition à une autre et d'une espèce à une autre. Les meilleures combinaisons de saccharose et de régulateurs de croissance sont les suivantes :

- Chez *G. elwesii*, l'accumulation optimale de galanthamine (0,02 ± 0,01 % MS) et l'inhibition maximale de l'AChE (38,5 ± 5 % d'inhibition) ont été obtenues chez les tissus *in vitro* cultivés sur un milieu MS enrichi avec **60 g/L à 90 g/L** de saccharose et **10 µM de 2,4-D** + 10 µM BAP,

- Chez *N. pseudonarcissus*, les meilleurs résultats sont obtenus avec les tissus *in vitro* cultivés sur un milieu MS enrichi avec :

- **30 g/L** ou **120 g/L** de saccharose et **10 µM de 2,4-D** + 10 µM BAP, pour une accumulation maximale de galanthamine ($0,1 \pm 0,001$ % MS).

- **90 g/L** de saccharose et **10 µM de 2,4-D** + 10 µM BAP, pour une inhibition optimale de l'AChE (59 ± 2 % d'inhibition).

- Quant à *L. aestivum*, les meilleurs résultats sont atteints avec les tissus *in vitro* cultivés sur un milieu MS enrichi avec :

- **60 g/L** de saccharose et **10 µM d'ANA** + 10 µM BAP, pour une accumulation optimale de galanthamine ($0,075 \pm 0,001$ % MS).

- **30 g/L** de saccharose et **10 µM de 2,4-D** + 10 µM BAP, pour une inhibition optimale de l'AChE (54 ± 5 % d'inhibition).

C - Conclusion du chapitre

L'ajout du saccharose et des régulateurs de croissance joue un rôle dans l'activation du métabolisme des alcaloïdes. La diversité des alcaloïdes a été favorisée dans les cultures *in vitro*, et a montré un aspect variable selon les conditions de culture, et dépendant de l'espèce cultivée.

L'accumulation maximale de galanthamine est atteinte en présence des concentrations élevées de saccharose. Ces résultats sont en accord avec les travaux rapportés dans la littérature (Sellès *et al.*, 1997). Cette accumulation de la galanthamine ainsi que l'activité inhibitrice de l'AChE, mesurées pour les mêmes conditions de culture *in vitro* des Amaryllidaceae, diffèrent d'une espèce cultivée à l'autre. Les pourcentages de galanthamine les plus élevés (0,1 % MS chez *N. pseudonarcissus* ; 0,075 % MS chez *L. aestivum* ; et 0,02 % MS chez *G. elwesii*) sont obtenus grâce aux cultures *in vitro* des espèces, et ils sont souvent accompagnés d'une activité importante d'inhibition de l'AChE (> 30 % d'inhibition).

Toutefois, nous avons remarqué dans quelques extraits pauvres en galanthamine, une activité importante d'inhibition de l'AChE allant de 20 à 80 % d'inhibition. Ceci est surtout observé avec les extraits *in vivo* de *G. elwesii* et de *N. pseudonarcissus*, renfermant des teneurs faibles de galanthamine (0 à 0,005 % MS) et exerçant une inhibition très importante (35 à 80 % d'inhibition) comparable même aux témoins de galanthamine et tacrine (84 à 99 % d'inhibition).

Il est connu que le contenu en alcaloïdes est très divers au niveau inter et intra espèce (Zenk MH, 1989 ; Kutchan TM, 1995). Dans la nature, une même espèce de plante peut contenir des quantités d'alcaloïdes faibles et élevées (Tudzynski *et al.*, 1999; Huang FC et Kutchan TM, 2000). La recherche des produits naturels à pouvoir inhibiteur de l'AChE plus puissant a révélé la présence de certains alcaloïdes des Amaryllidaceae, comme la sanguinarine, l'habranthine, et l'*O*-acétyllycorine, qui possèdent une activité inhibitrice de l'AChE similaire voire plus importante que la galanthamine (Lopez *et al.*, 2002).

Plusieurs travaux ont été récemment rapportés dans la littérature concernant l'optimisation des milieux de culture *in vitro*, en vue d'améliorer l'accumulation de la galanthamine chez les espèces de *Narcissus* et de *Leucojum* (Colque *et al.*, 2004 ; Sellès *et al.*, 1997 ; Gerogiev *et al.*, 2009 ; Berkov *et al.*, 2009). Les teneurs de galanthamine les plus élevés, trouvés à ce jour dans la littérature représentent **0,053 % MS** dans les tissus *in vitro* de *Narcissus*. Berkov rapporte que les conditions optimisés conduisent à l'obtention de 0,25 % MS de galanthamine

par culture de *Narcissus*, dont 0,197 % MS ont été relargués dans le milieu de culture, d'où restent 0,053 % MS dans les tissus (Berkov *et al.*, 2009). Par rapport à la littérature, nos expériences ont conduit à l'obtention des teneurs de galanthamine les plus élevés chez les Amaryllidaceae (0,1 % MS). En prenant en considération que la galanthamine n'a pas été quantifiée dans les milieux de culture mais seulement dans les tissus *in vitro*, les teneurs de galanthamine accumulées chez ces derniers ne constituent qu'une part de la totalité de galanthamine produite *in vitro*, l'autre part étant probablement relarguée dans le milieu.

En conclusion, les conditions de culture optimales décrites chez chacune des espèces ont permis l'obtention des plus hautes teneurs en galanthamine jusqu'à ce jour, qui sont de l'ordre de **0,02**; **0,1**; et **0,075 % MS** chez *G. elwesii*, *N. pseudonarcissus*, et *L. aestivum* respectivement.

Chapitre III.

Induction de la synthèse alcaloïdique par des agents exogènes

A - Effet de l'ajout du précurseur, inhibiteur et capteur d'éthylène

L'éthylène est une phytohormone gazeuse produite par les plantes en réponse à plusieurs facteurs, comme le cisaillement, le traitement par les auxines, et le stress environnemental (Pua EC, 1999). Ce composé produit par les tissus *in vitro*, est accumulé dans le matériel de culture *in vitro*. Son accumulation est souvent difficile à contrôler, par conséquent, son rôle est en général étudié en ajoutant dans les cultures *in vitro*, le précurseur [acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC)], les inhibiteurs [thiosulfate d'argent (STS) et nitrate d'argent (AgNO₃)] et le capteur d'éthylène [permanganate de potassium (KMnO₄)].

Notre objectif est donc d'étudier l'effet de l'éthylène, produit par les tissus *in vitro* et accumulé dans les boîtes de culture, sur la morphogenèse des tissus *in vitro* (callogenèse, formation d'embryons somatiques, et régénération des plantes), et sur l'accumulation des alcaloïdes chez l'espèce *L. aestivum*. Les expériences ont été réalisées, selon les ajouts décrits dans le tableau 9, et elles ont été suivies entre 1 et 4 mois de culture des explants de *L. aestivum* sur un milieu de base MS30 + 25 µM piclorame + 0,5 µM BAP, efficace pour l'initiation des cals embryogènes (Ptak *et al.*, 2007). Les mesures du pourcentage de callogenèse et les extractions alcaloïdiques ont été effectuées après 6, 10 et 16 semaines de culture. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr. Ptak à l'Université d'Agriculture de Cracovie (Pologne).

Tableau 9: Bulbes *in vivo* et cultures *in vitro* de *Leucojum aestivum* établies en présence du précurseur (ACC), d'inhibiteurs (STS et AgNO₃) ou du capteur (KMnO₄) d'éthylène.

<i>Leucojum aestivum</i>	Type de traitement
Tissus <i>in vitro</i>	Témoins
	Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (1 µM ACC)
	Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (10 µM ACC)
	Thiosulfate d'argent (1 µM STS)
	Thiosulfate d'argent (10 µM STS)
	AgNO ₃ (1 µM)
	AgNO ₃ (10 µM)
	KMnO ₄
Tissus <i>in vivo</i>	Bulbes <i>in vivo</i>

1. Impact sur la morphogénèse des tissus *in vitro*

Après 6 semaines d'initiation des cultures, le taux de croissance des cals embryogènes nodulaires apparus sur les explants cultivés, a été observé, en comptant les embryons somatiques formés sur les explants.

Le pourcentage de callogénèse a été calculé après lyophilisation des cals, selon :

$$\text{Callogénèse (\%)} = \frac{\text{Masse sèche finale} - \text{masse sèche initiale}}{\text{masse sèche initiale}} \times 100$$

Dans notre expérience, l'ajout de l'ACC au milieu de culture de *L. aestivum*, a entraîné une baisse de formation de cals (Tableau 10). La présence du KMnO_4 a aussi été moins efficace vis-à-vis de l'induction des cals embryogènes.

Les pourcentages maximaux de formation de cals ont été obtenus sur les explants cultivés en présence des inhibiteurs d'éthylène AgNO_3 (1 et 10 μM) et STS (10 μM) (95,2; 90,8; 91,2 %) (Tableau 10).

L'intensité maximale de callogénèse a été atteinte suite à l'ajout, au milieu de culture, des inhibiteurs (AgNO_3 (10 μM), STS (10 μM)) et du capteur d'éthylène (KMnO_4) (Tableau 10). L'effet de l' AgNO_3 a été démontré avec succès chez d'autres plantes monocotylédones, comme le maïs et le riz (Vain *et al.*, 1989 ; Songstad *et al.*, 1991).

Tableau 10: Effets de l'ajout du précurseur (ACC), des inhibiteurs (STS et AgNO_3) et d'un capteur d'éthylène (KMnO_4) sur la formation des cals embryogènes chez les cultures *in vitro* de *L. aestivum*.

Conditions <i>in vitro</i>	Formation de cals (%)	Callogénèse**
Explants témoins	66,0*	++
ACC (1 μM)	65,4	+
ACC (10 μM)	62,0	+
STS (1 μM)	86,9	++
STS (10 μM)	91,2	+++
AgNO_3 (1 μM)	95,2	++
AgNO_3 (10 μM)	90,8	+++
KmnO_4 (4,5 g)	67,0	+++

* Moyennes significatives à $\alpha \leq 0,05$, Test Duncan ; ** (+), intensité de callogénèse.

Après dix semaines de culture, nous avons observé la formation des embryons somatiques de *L. aestivum*. Le nombre maximal d'embryons somatiques a été obtenu avec les cals initiés sur le milieu de culture enrichi avec 10 μM d'ACC (20 embryons/explant) (Tableau 11). Kochba et ses collaborateurs ont montré que l'éthylène ajouté au milieu de culture du *Citrus* induit la formation des cals et favorise l'embryogenèse (Kochba *et al.*, 1978). Hatanaka a rapporté que l'ajout de l'éthylène ou des inhibiteurs de l'éthylène, comme l' AgNO_3 ou le CoCl_2 , inhibent la formation des embryons somatiques sur les explants de feuilles de *Coffea canephora* (Hatanaka *et al.*, 1995). L'ajout de l' AgNO_3 a présenté un effet stimulateur de l'embryogenèse directe des cultures de *Triticum durum* (Fernandez *et al.*, 1999).

Ces résultats montrent qu'il existe une influence de l'éthylène produit par les tissus cultivés, sur leur capacité de développer des embryons somatiques, d'où l'importance de contrôler sa production et son accumulation dans les cultures *in vitro*. Pour cela, nous avons mesuré la production de l'éthylène par les cals et par les embryons somatiques, dans les différentes conditions de culture *in vitro*. La mesure de l'éthylène a été réalisée en aspirant un volume de 10 cm^3 d'air de chaque culture. Les échantillons d'air retirés sont ensuite injectés en chromatographie en phase gazeuse (Chrom 4) munie d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne de 1,2 m de longueur remplie d'oxyde d'aluminium et maintenue à 60 °C. Les mesures ont été effectuées avec 5 répétitions (Tableau 12).

L'ajout de l'ACC a augmenté d'une façon significative la production d'éthylène à la fois par les cals (26,4 nL/g de matière fraîche, MF) et par les embryons somatiques (2,1 nL/g MF). La production a été plus importante chez les cals. Ces derniers, à l'état de contrôles ont montré une production importante d'éthylène équivalente à 9,5 nL/g MF. L'ajout de l'ACC aux milieux de culture, constitue une méthode convenable pour améliorer le niveau de l'éthylène chez les plantes *in vitro* (De Klerk *et al.*, 1999).

Après 4 mois de culture (16 semaines), la variation des aspects de cals et d'embryons somatiques a été observée. Les aspects des cals embryogènes ont montré des différences de couleur et d'opacité. En présence de KMnO_4 les cals étaient jaunes et secs (Figure 43b-c). Les cals cultivés sur un milieu additionné d' AgNO_3 ou STS étaient jaunes et légèrement humides (Figure 43d-e). Par contre, en présence de l'ACC les cals avaient une couleur brune et un aspect mucoïde (Figure 43f).

Tableau 11: Effets de l'ajout du précurseur (ACC), des inhibiteurs (STS et AgNO₃) et d'un capteur d'éthylène (KMnO₄) sur la formation des embryons somatiques chez les cultures *in vitro* de *L. aestivum*.

Conditions <i>in vitro</i>	Nombre d'embryons par explant
Explants témoins	1,8*
ACC (1 µM)	0,0
ACC (10 µM)	20,0
STS (1 µM)	2,0
STS (10 µM)	2,3
AgNO ₃ (1 µM)	2,0
AgNO ₃ (10 µM)	1,9
KmnO ₄	0,0

* Moyennes significatives à $\alpha \leq 0,05$, Test Duncan

Tableau 12: Production d'éthylène par les cals et les embryons somatiques de *L. aestivum*, mesurée après 4 semaines de culture.

Conditions <i>in vitro</i>	Production d'éthylène (nL/g MF)	
	Cals	Embryons somatiques
Explants témoins	9,5 ± 0,80*	0,0
ACC (10 µM)	26,4 ± 0,62	2,1 ± 0,16
STS (10 µM)	0,0	-
AgNO ₃ (10 µM)	0,0	0,0
KMnO ₄	0,0	0,0

*Moyennes de 5 répétitions avec les écartypes correspondant, (-) pas de réponses.

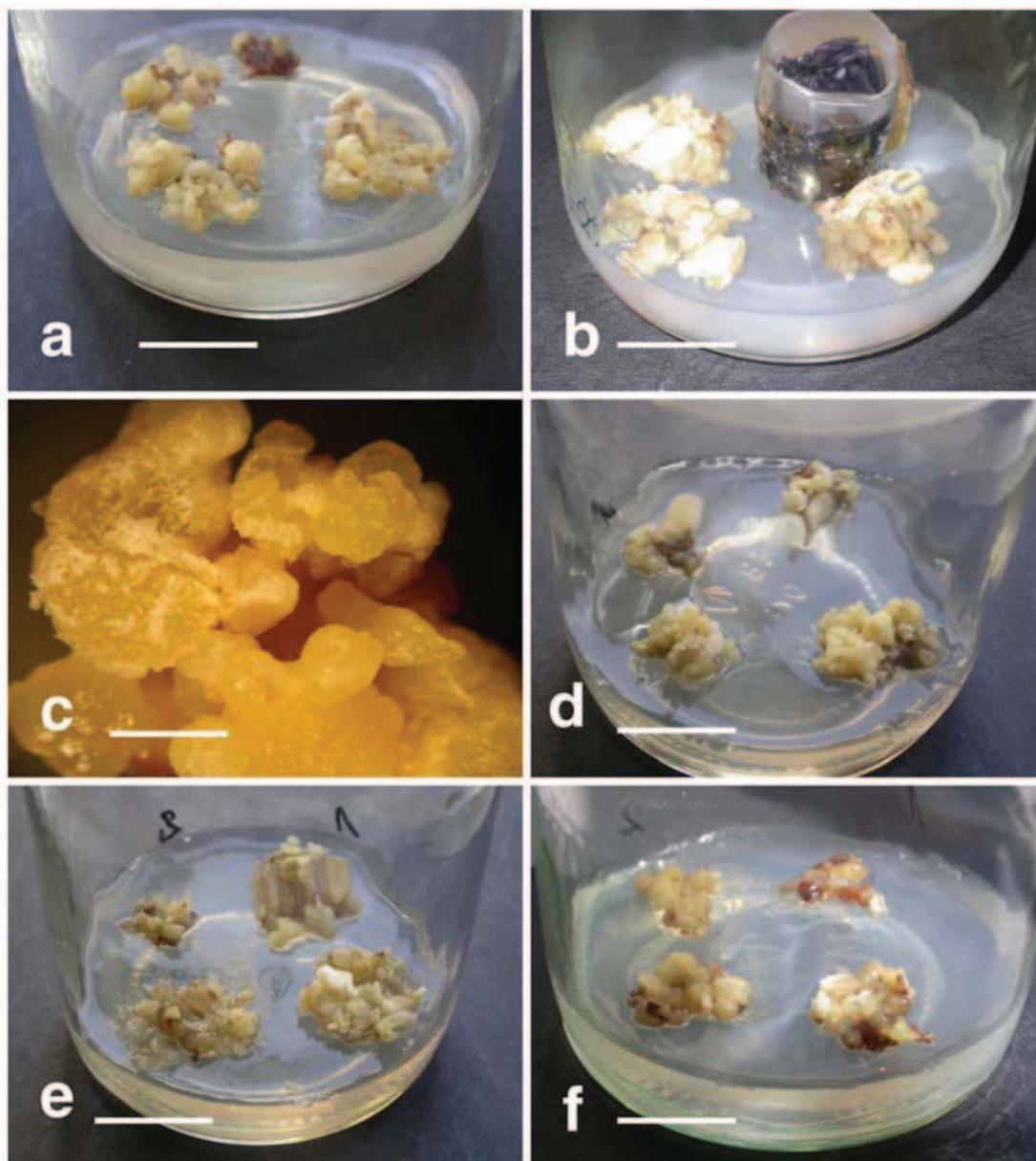


Figure 43 : Les cals de *L. aestivum* cultivés en présence de: a) 25 μM piclorame + 0,5 μM BAP (contrôle), *bar* = 2 cm ; b), c) 25 μM piclorame + 0,5 μM BAP, KMnO_4 , *bar* = 1,5 cm ; d) 25 μM piclorame + 0,5 μM BAP + 10 μM AgNO_3 , *bar* = 2 cm ; e) 25 μM piclorame + 0,5 μM BAP + 10 μM STS, *bar* = 2 cm ; f) 25 μM piclorame + 0,5 μM BAP + 10 μM ACC, *bar* = 1 cm.

2. Impact sur la diversité des alcaloïdes

Dans l'objectif d'étudier l'effet de l'éthylène et de ses régulateurs de biosynthèse sur la diversité des alcaloïdes accumulés dans les cals et les embryons somatiques de *L. aestivum*, des extraits de ces derniers ont été préparés après 6, 10 et 16 semaines de culture en présence du précurseur, des inhibiteurs, et de capteur d'éthylène. Le criblage des alcaloïdes des différents extraits a été réalisé par GCMS et les résultats correspondants sont présentés dans le tableau 13. L'identification des alcaloïdes a été réalisée en comparant leur spectre de fragmentation à ceux rapportés dans la littérature chez les mêmes espèces (Berkov *et al.*, 2005).

Sept alcaloïdes ont été identifiés dans les extraits de bulbes *in vivo* et de cals *in vitro* de *L. aestivum* (Tableau 13). La variabilité des alcaloïdes diffère d'un bulbe *in vivo* à l'autre, en raison de la diversité naturelle des plantes. Les résultats présentés dans le tableau 13, correspondent à la moyenne des extractions de 4 bulbes *in vivo* et 6 répétitions de culture *in vitro*.

La narwédine et la déméthylmarithidine ont été détectées dans les extraits des bulbes *in vivo* seulement. Les cinq autres alcaloïdes, trisphéridine, galanthamine, crinine, anhydrolycorine, et lycorine, ont été identifiés dans les bulbes *in vivo* et dans les cultures *in vitro* (Figure 44a-c).

La galanthamine et la lycorine ont été présentes dans les cals cultivés en présence des inhibiteurs (STS 10 μ M et AgNO₃ 10 μ M), du capteur d'éthylène (KMnO₄) et dans les cals contrôles.

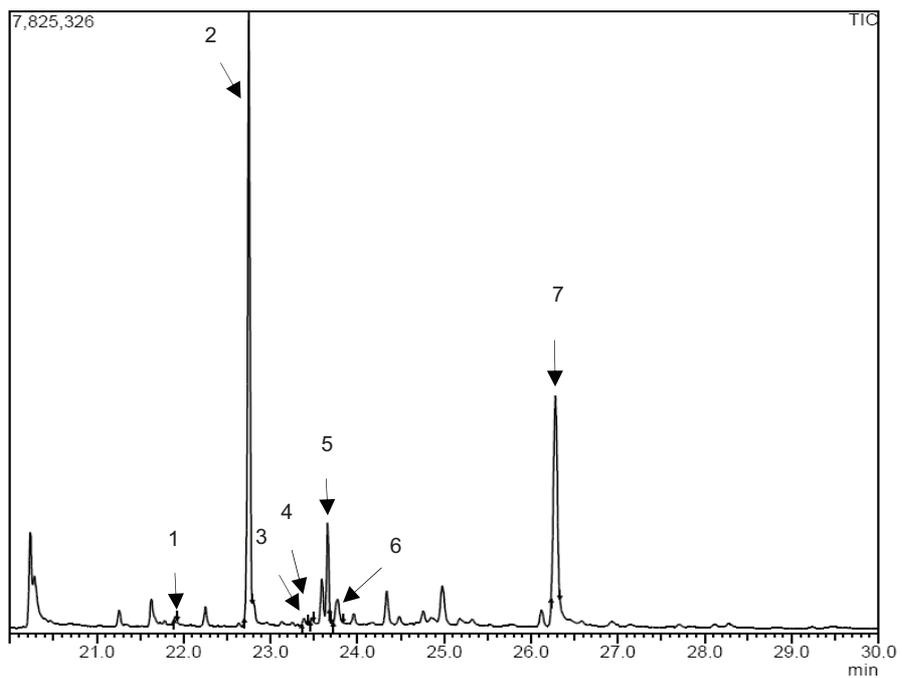
En revanche, l'ajout du précurseur de l'éthylène (ACC 10 μ M) et des faibles quantités de son inhibiteur (STS 1 μ M), a diminué la diversité des alcaloïdes, dans ces conditions aucun alcaloïde n'a été identifié (Tableau 13).

En conclusion, la plus grande diversité *in vitro* a été observée dans les extraits de cals cultivés en présence du capteur d'éthylène (KMnO₄). Dans ces extraits, quatre alcaloïdes ont été identifiés, trisphéridine, galanthamine, anhydrolycorine, et lycorine (Figure 44b). Si on compare qualitativement les profils chromatographiques, on observe que l'anhydrolycorine présente un pic plus intense dans les cultures cultivées en présence du KMnO₄ (Figure 44b). Cet alcaloïde est présent dans les bulbes *in vivo* dont le pic est plus faible (Figure 44a), et absent dans les cals *in vitro* contrôles (Figure 44c). Cependant, on note la présence de pics intenses, qui par manque de standards et de données, n'ont pas été identifiés.

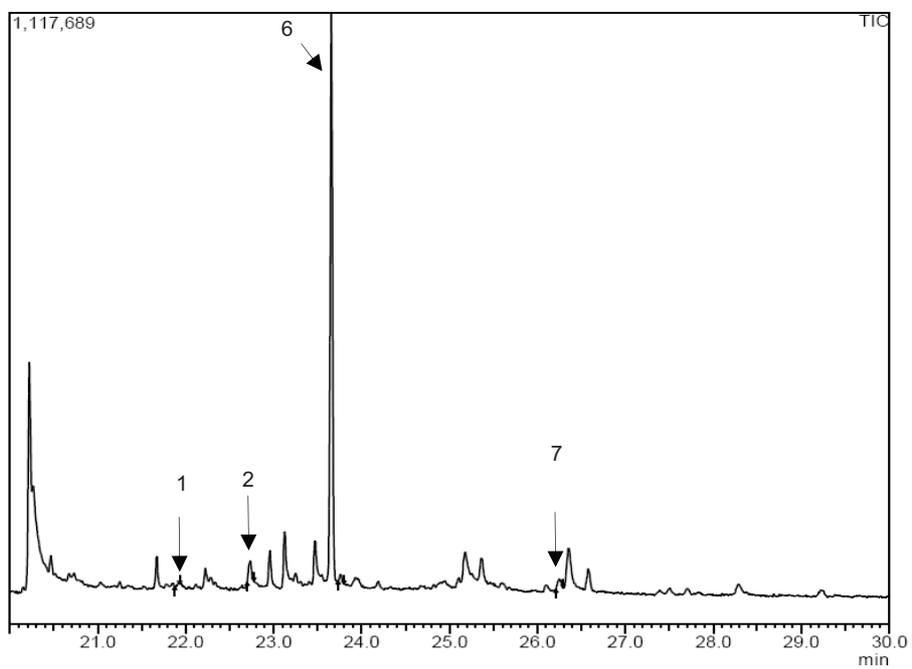
Tableau 13: Alcaloïdes identifiés par GCMS en mode “full scan”, dans les bulbes *in vivo* et les cals *in vitro* de *Leucojum aestivum* obtenus dans les différentes conditions de culture.

Alcaloïdes	Temps de rétention (min)	Pic majoritaire (100)	Fragmentation <i>m/z</i> (intensité relative, %)	Bulbes <i>in vivo</i>		Cultures <i>in vitro</i>							
				Contrôles	ACC 10 µM	ACC 10 µM	STS 1 µM	STS 10 µM	AgNO ₃ 1 µM	AgNO ₃ 10 µM	KMnO ₄		
Trispériidine	21,9	223	222(39), 167(10), 166(10), 164(5)	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Galanthamine	22,75	286	287(83), 244(23), 230(12), 216(31), 174(28)	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Narwéidine	23,4	284	285(84), 242(18), 216(24), 119(22), 174(40)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crimine	23,5	271	270(20), 199(10), 187(5), 173(10), 115(22)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Déméthyl-maritididine	23,7	273	230(25), 201(86), 189(54), 175(22), 157(16), 128(19), 115(20)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anhydro-lycorine	23,8	250	251(45), 220(4), 204(2), 192(14), 191(12), 165(6), 152(2), 139(4), 96(7), 95(9)	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Nor-galanthamine	24	272	273(98), 230(33), 202(27), 174(12)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pluviine	25,8	242	287(75), 286(44), 268(45), 254(4), 228(23), 198(4), 182(3), 151(4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lycorine	26,3	226	287(27), 286(19), 268(20), 250(20), 227(80), 147(8), 119(12)	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
N-Formylnor-galanthamine	26,9	301	272(2), 243(6), 230(7), 225(15), 211(16), 128(11), 115(10)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a



b



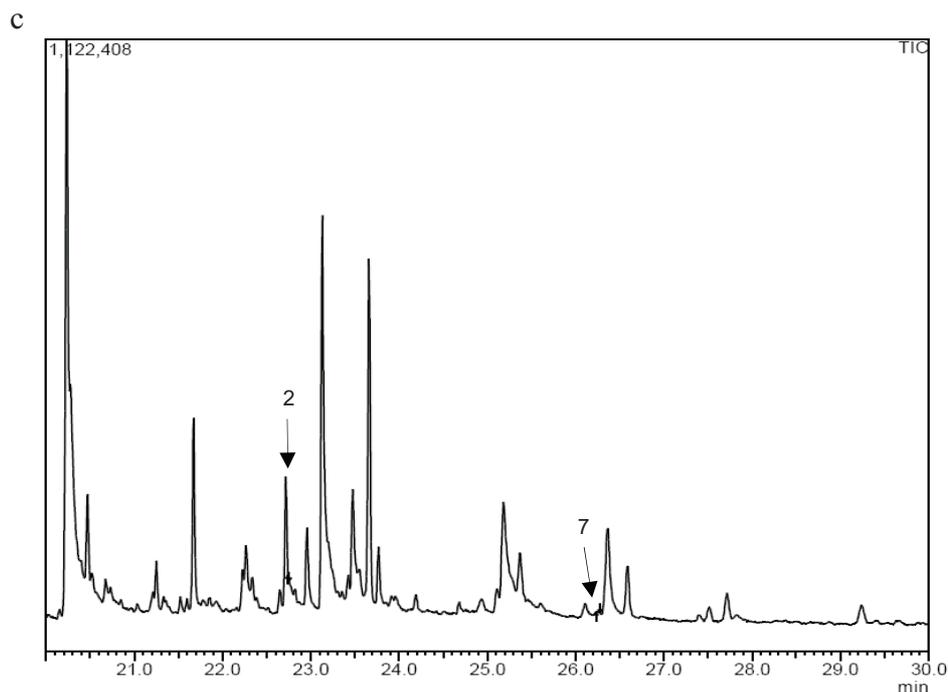


Figure 44: Chromatogrammes obtenus par analyses GCMS des extraits de : (a) bulbes *in vivo* de *Leucojum aestivum*; (b) cals cultivés en présence du KMnO_4 ; (c) cals contrôles. Les numéros des pics correspondent aux alcaloïdes : 1: Trispériidine, 2: Galanthamine, 3: Narwéidine, 4: Crinine, 5: Déméthylmarithidine, 6: Anhydrolycorine, 7: Lycorine.

3. Impact sur l'accumulation de la galanthamine et de la lycorine

La galanthamine, et la lycorine ont été quantifiées dans les extraits de bulbes *in vivo* et de cals *in vitro* cultivés en présence du précurseur, des inhibiteurs, et du capteur d'éthylène.

L'objectif de cette étude, est de rechercher l'effet de l'éthylène accumulé dans les cultures *in vitro*, sur la production de galanthamine et de lycorine dans les cals embryogènes de *L. aestivum*. Pour cela, la quantification de ces deux alcaloïdes a été réalisée en LC-HRMS, après 6 et 16 semaines de culture *in vitro*.

Les résultats d'analyses LC-HRMS des extraits de cals *in vitro* âgés de 6 semaines, sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14: Pourcentages de galanthamine et de lycorine dans les extraits de bulbes *in vivo* et des cals *in vitro* de *Leucojum aestivum* après 6 semaines de culture (LDD = 2.10^{-4} %).

Extraits	Galanthamine % MS	Lycorine % MS
Bulbes <i>in vivo</i>	0,03	0,01
Cultures <i>in vitro</i>		
Contrôles	< LDD	0,001
ACC (1 μ M)	< LDD	< LDD
ACC (10 μ M)	< LDD	< LDD
STS (1 μ M)	< LDD	< LDD
STS (10 μ M)	0,001	0,002
AgNO ₃ (1 μ M)	< LDD	< LDD
AgNO ₃ (10 μ M)	< LDD	< LDD
KMnO ₄	0,002	0,003

La quantification de la galanthamine ($m/z = 288,1600 \pm 11$ ppm) et de la lycorine ($288,1203 \pm 11$ ppm) dans les extraits, a été effectuée en se référant aux standards de la galanthamine ($m/z = 288,1568$) et de la lycorine ($m/z = 288,1236$).

Les bulbes *in vivo* qui ont servi pour l'initiation des cals *in vitro*, ont montré des teneurs de l'ordre de 0,03 % MS de galanthamine, et 0,01 % MS de lycorine. Les cals *in vitro* contrôles ne renferment que 0,001 % MS de lycorine et des traces de galanthamine dont la quantité s'est révélée en dessous de la limite de quantification de la LCMS. Cependant, on observe une amélioration significative de l'accumulation des deux alcaloïdes suite à l'ajout du KMnO₄ et du STS aux cultures de cals. En présence du KMnO₄, 0,002 % MS de galanthamine et 0,003 % MS de lycorine ont été obtenus. Alors que 0,001 % MS de galanthamine et 0,002 % MS de lycorine sont accumulés suite à l'ajout de 10 μ M STS. Par contre, l'ajout du STS en faible quantité (1 μ M) n'a montré aucun effet favorable vis-à-vis de l'accumulation des deux alcaloïdes. Ces résultats sont en cohérence avec les résultats obtenus en GCMS, où nous avons démontré que la diversité alcaloïdique maximale est atteinte en présence du KMnO₄, et du STS (10 μ M).

L'éthylène produit par les tissus *in vitro*, a donc un impact sur la synthèse des alcaloïdes. L'équipe de Zhang et Wu, et celle de Tabata ont rapporté que la production du taxane par les suspensions cellulaires du *Taxus* sp., est fortement stimulée en présence du STS (Zhang et

Wu, 2003 ; Tabata H, 2004). Un effet similaire du STS sur la production du diterpène tanshinone a été observé dans les cultures de racines transgéniques de *Salvia miltiorrhiza* (Zhang *et al.*, 2004).

Dans un second temps, nous nous sommes intéressée à suivre l'effet de l'éthylène sur l'accumulation de la galanthamine pendant quatre mois de culture *in vitro*. Les résultats des analyses ont été obtenus par HPLC, et sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15: Effets de l'éthylène sur l'accumulation de la galanthamine dans les bulbes *in vivo* et les cals *in vitro* de *L. aestivum* après 4 mois de culture.

Extraits	Galanthamine % MS
Bulbes <i>in vivo</i>	0,03 ± 0,01
<i>Cultures in vitro</i>	
Contrôles	0,0*
ACC	0,0
STS	0,1 ± 0,002
AgNO ₃	0,0
KMnO ₄	0,08 ± 0,02

*Moyennes de 3 répétitions avec les écartypes correspondants.

Les bulbes *in vivo* ont présenté une teneur de 0,03 % MS de galanthamine. Ce qui signifie que la méthode de quantification par HPLC est comparable à celle utilisée pour la quantification précédente par LC-HRMS.

Après 4 mois de culture, la galanthamine n'a pas été détectée dans les cultures des cals contrôles. Cependant, l'ajout du STS (10 µM) et du KMnO₄, aux milieux de culture des cals *in vitro*, a induit une stimulation de la synthèse de la galanthamine chez ces derniers. L'accumulation maximale de galanthamine est atteinte dans les cals cultivés en présence du STS (0,1 ± 0,002 % MS) et en présence du KMnO₄ (0,08 ± 0,02 % MS) (Tableau 15).

En comparant les résultats obtenus après 4 mois de culture à ceux décrits précédemment, on constate que la synthèse de la galanthamine est favorisée dans les mêmes conditions, en présence du STS et du KMnO₄. Les effets sont donc cohérents, cependant, le pourcentage de galanthamine est 100 fois plus élevé après 4 mois de culture *in vitro* (Figure 45).

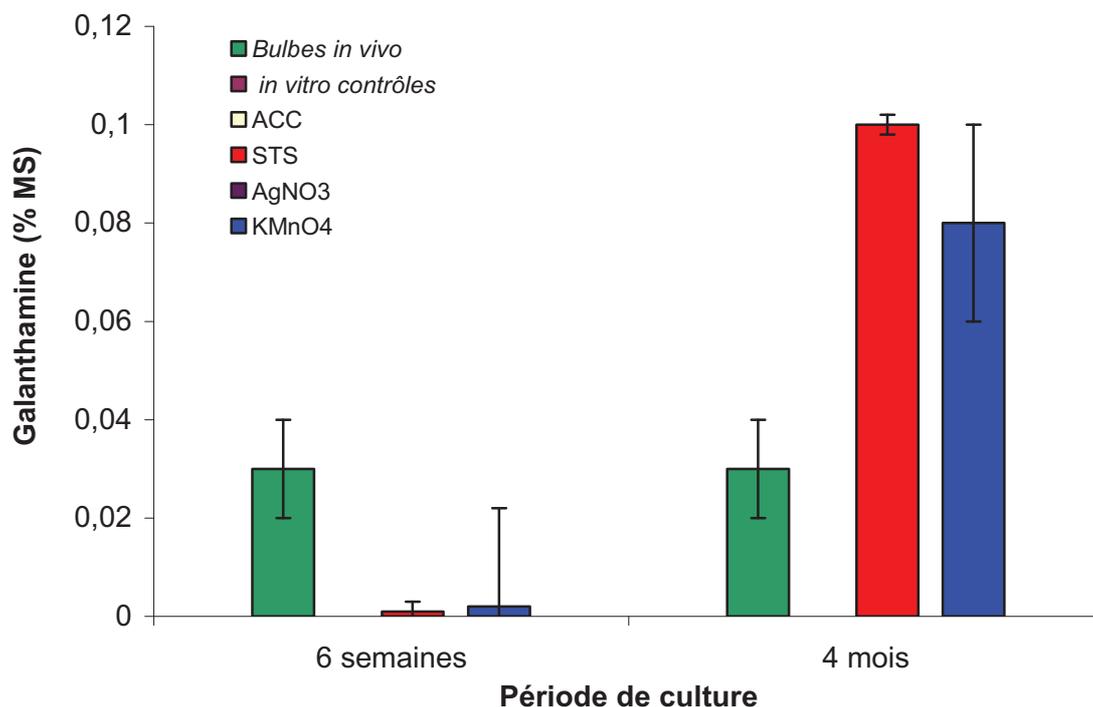


Figure 45 : Évolution du pourcentage de la galanthamine en fonction du temps de culture et de l'ajout des agents exogènes (ACC, STS, AgNO₃, KMnO₄).

Cette différence d'accumulation semble être liée au stade de différenciation des cultures *in vitro*. Après 4 mois de culture, les cals seraient plus différenciés au niveau biochimique que ceux âgés d'un mois seulement.

Récemment, il a été démontré que la production des métabolites secondaires est dépendante du stade de différenciation des tissus *in vitro* (Laurain-Mattar *et al.*, 1999 ; Laurain-Mattar D, 2008, Stanilova *et al.*, 2010).

4. Conclusion partielle

Au terme de cette étude nous avons pu montrer le rôle que joue l'éthylène dans l'organogénèse des tissus *in vitro* de *L. aestivum* et sur l'accumulation et la diversité des alcaloïdes.

L'accumulation des alcaloïdes et l'induction de leur biosynthèse se sont montrées dépendantes du stade de différenciation des cultures *in vitro*. Les cultures âgées de 4 mois ont accumulé des quantités de galanthamine supérieures ($0,1 \pm 0,02$ % MS) à celles produites par les cals âgés d'un mois seulement ($0,002 \pm 0,001$ % MS).

L'accumulation de galanthamine et la diversité des alcaloïdes, la formation de cals et l'intensité de callogenèse, sont maximales quand les cals sont cultivés en présence du KMnO_4 et du STS $10 \mu\text{M}$. Quant à la production de l'éthylène celle-ci est logiquement favorisée ($26,4$ et $2,1$ nL/g MS) suite à l'ajout de l'ACC aux cultures de cals et d'embryons somatiques. Cette production est inhibée en présence des inhibiteurs de l'éthylène.

Sept alcaloïdes ont été identifiés dans les cultures *in vitro* cultivées en présence de KMnO_4 et de STS, ainsi que dans les bulbes *in vivo*. Néanmoins, de nouveaux pics inconnus ont été détectés, ce qui ouvre de nouvelles perspectives pour approfondir cette étude.

B- Effet de l'ajout du méthyljasmonate (MeJa) sur l'élicitation de la biosynthèse

Plusieurs travaux de recherche ont prouvé la capacité du MeJa (Figure 46) à éliciter la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques chez le *Datura stramonium* (Zabetakis *et al.*, 1999 ; Al Balkhi, 2008). D'autres ont montré son pouvoir inducteur de la synthèse de nombreux métabolites secondaires que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, et dont certains jouent le rôle de composés de défense pour la plante (Al Balkhi, 2008).

L'induction vise à faire produire, par des tissus *in vitro*, des métabolites secondaires d'intérêt, entre autres les alcaloïdes en grande quantité. Ayant montré dans les chapitres précédents, que la biosynthèse des alcaloïdes est dépendante du stade de développement tissulaire, nous avons décidé d'étudier l'ajout du MeJa au niveau deux types de morphogénèse (cals embryogènes et bulbilles *in vitro*) chez *L. aestivum*. Pour le choix des concentrations du MeJa, et des temps d'incubation, nous nous sommes basées sur les travaux d'Al Balkhi, 2008 et de Colque *et al.*, 2004. L'ajout de 100 μM de MeJa aux cultures de racines de *Datura* a induit la synthèse des alcaloïdes tropaniques après 10 heures d'incubation (Al Balkhi, 2008). En 2004, l'équipe de Colque a testé l'effet de plusieurs éliciteurs, le MeJa entre autres, sur la biosynthèse de la galanthamine chez *N. confusus*. Les concentrations de MeJa utilisées sont : 25, 50, 100 et 250 μM . Le MeJa a été appliqué aux cultures de tissus organisés pendant 3 à 24 jours (Colque *et al.*, 2004). En 2006, Stanilova a trouvé que l'ajout de l'acide jasmonique aux cultures *in vitro* de *L. aestivum* stimule la biosynthèse de la galanthamine (Stanilova *et al.*, 2010).

Suite à ces informations bibliographiques, nous avons décidé d'étudier l'effet du MeJa sur l'accumulation de la galanthamine et de la lycorine pendant de courtes durées d'incubation et avec des concentrations de MeJa équivalentes. Le travail n'a jamais été réalisé chez *L. aestivum in vitro*.

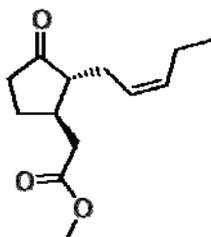


Figure 46 : Structure du méthyljasmonate (MeJa).

1. Mise en place de l'expérience

Le MeJa a été ajouté aux cultures de cals embryogènes, et de bulbilles *in vitro* de *Leucojum aestivum*. Dans le but d'étudier son effet éliciteur, il est nécessaire d'analyser le profil alcaloïdique, et l'accumulation de la galanthamine et de la lycorine dans les différentes cultures.

L'ensemble des essais menés sur les cals embryogènes représente 144 échantillons (Figure 47) préparés selon le protocole décrit dans la figure 48. Les essais ont été réalisés avec 6 durées de métabolisation (0, 2, 5, 10, 24, et 31 heures), 6 concentrations de MeJa (0, 50, 100, 150, 200 et 300 μM) et quatre répétitions pour chaque concentration et durée d'incubation.



Figure 47: Préparation des incubations des cals embryogènes de *Leucojum aestivum* avec différentes concentrations de MeJa (0, 50, 100, 150, 200 et 300 μM).

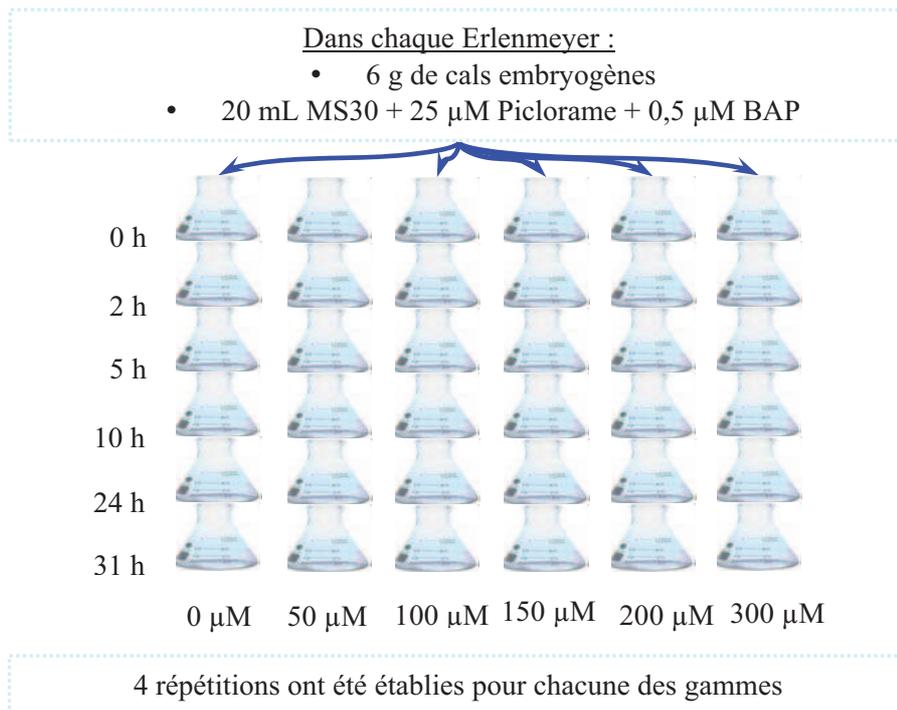


Figure 48: Protocole d'incubation du MeJa dans les cals de *Leucojum aestivum*.

Pour l'étude de l'effet éliciteur du MeJa dans les bulbilles *in vitro* de *Leucojum aestivum*, 48 échantillons (Figure 49) ont été établis selon le protocole décrit dans la figure 50. Les essais ont été réalisés avec 4 durées de métabolisation (0, 2, 5, et 10 heures), 4 concentrations de MeJa (0, 50, 100 et 150 μM), et trois répétitions pour chaque concentration et durée d'incubation.



Figure 49: Préparation des incubations des bulbilles *in vitro* de *Leucojum aestivum* avec différentes concentrations de MeJa.

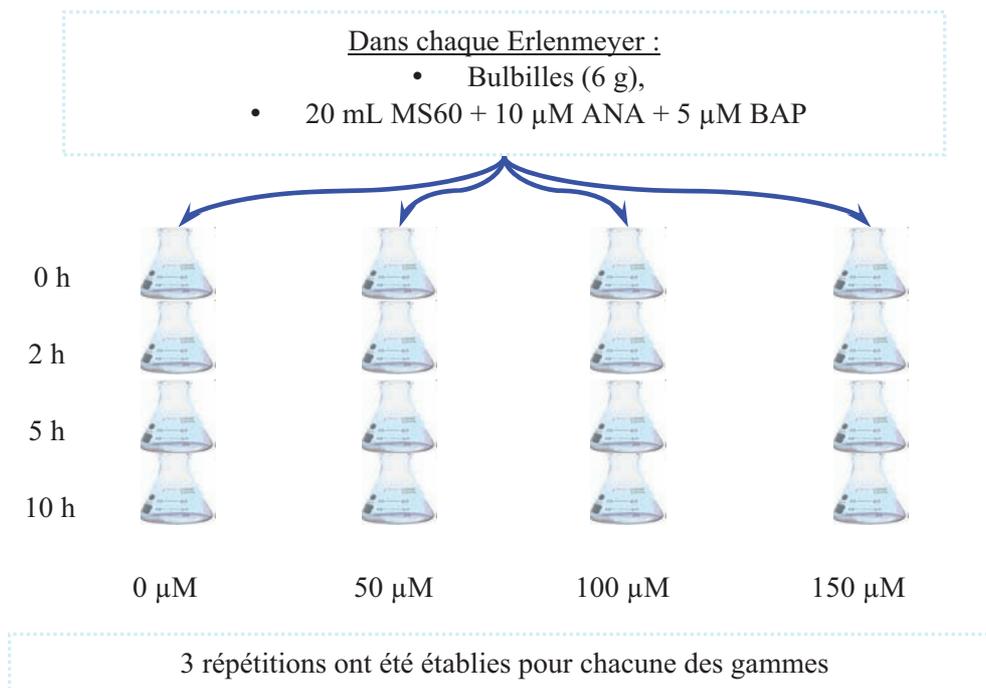


Figure 50: Protocole d'incubation du MeJa chez les bulbilles *in vitro* de *Leucojum aestivum*.

Pour chaque échantillon, 6g de matière fraîche (cals embryogènes ou bulbilles) ont été mis en culture dans 20 mL de milieu de culture (MS30 + 25 μ M piclorame + 0,5 μ M BAP pour les cals ; MS60 + 10 μ M ANA + 5 μ M BAP pour les bulbilles).

Le méthyljasmonate acheté dans le commerce sous forme liquide, a été filtré sur filtre stérile (0,22 μ m) et ajouté directement aux cultures à temps 0 d'incubation (t_0). Les cultures ont été maintenues stérilement dans une étuve sous agitation à 150 rpm, et à 23 °C à l'obscurité, et ont été arrêtées selon la durée d'incubation souhaitée.

La matière fraîche récupérée à t_x d'incubation, a été ensuite lyophilisée et la matière sèche obtenue a été soumise à une extraction méthanolique pour extraire les alcaloïdes. Les extraits alcaloïdiques ont été directement injectés en HPLC et en LCMS.

2. Application du MeJa aux cultures de cals

Afin d'étudier l'effet biochimique du MeJa sur les cultures de cals embryogènes de *Leucojum aestivum*, l'incubation des cals embryogènes avec le MeJa est arrêtée selon le protocole décrit précédemment. A chaque fois, le milieu de culture d'une part et les cellules d'autre part ont subi un protocole d'extraction méthanolique afin d'extraire les alcaloïdes et de les doser. Les concentrations d'alcaloïdes ont été déterminées dans les tissus et dans les milieux par HPLC, puis confirmées par LCMS.

a. Mesure de l'accumulation de la galanthamine et de la lycorine par HPLC

L'accumulation de la galanthamine et de la lycorine a été mesurée dans les extraits de cals *in vitro*, entre 2 et 31 heures. L'évolution des teneurs en fonction de l'ajout des concentrations de MeJa, est présentée dans la figure 51.

Il apparaît clairement dans la figure 51, que l'accumulation de la lycorine dans les cals contrôles et traités avec le MeJa, est plus importante que celle de la galanthamine.

La concentration de **galanthamine** dans les cals traités avec **150 μ M** de MeJa est largement augmentée, de **0,0015 % MS** après **2 h** d'incubation, à **0,0088 % MS** après **5 h** d'incubation (Figure 51A). Cette concentration diminue rapidement ensuite à **0,001 \pm 0,001 % MS** entre **10 et 31 h** d'incubation. Seul l'ajout de 150 μ M de MeJa a présenté une induction significative de la galanthamine. Les autres concentrations du MeJa ont montré un effet moins significatif sur l'accumulation de la galanthamine (Figure 51A).

Quant à l'induction de la lycorine, celle-ci a été influencée après **5 h** d'incubation avec **100 μ M** de MeJa (**0,003 \pm 0,006 % MS**), et après **10 h** d'incubation avec **300 μ M** de MeJa (**0,035 \pm 0,005 % MS**) comparativement aux cultures témoins (**0,0045 \pm 0,002 % MS**) ((Figure 51B).

La quantification des deux alcaloïdes dans les milieux de culture des cals traités par le MeJa, n'a pas pu être réalisée, à cause des pics mineurs inférieurs à la limite de détection de la méthode HPLC.

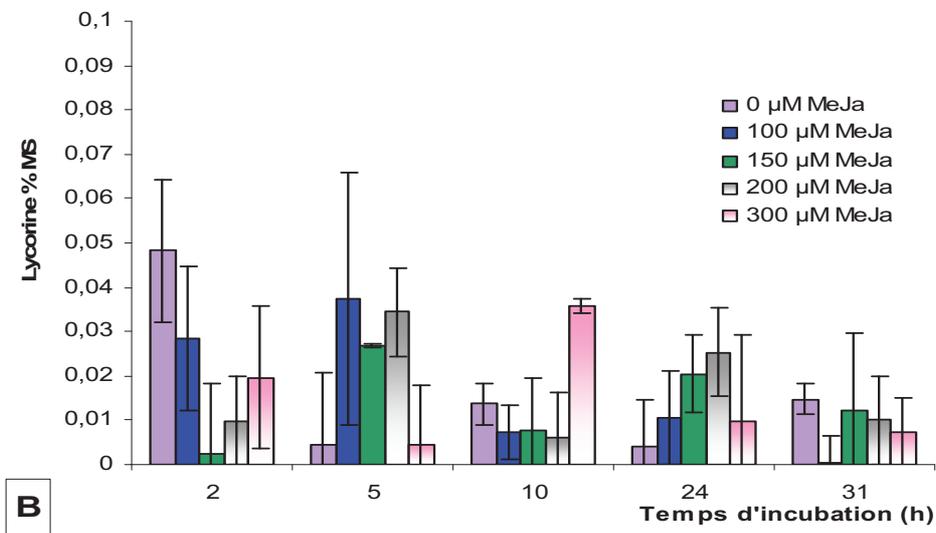
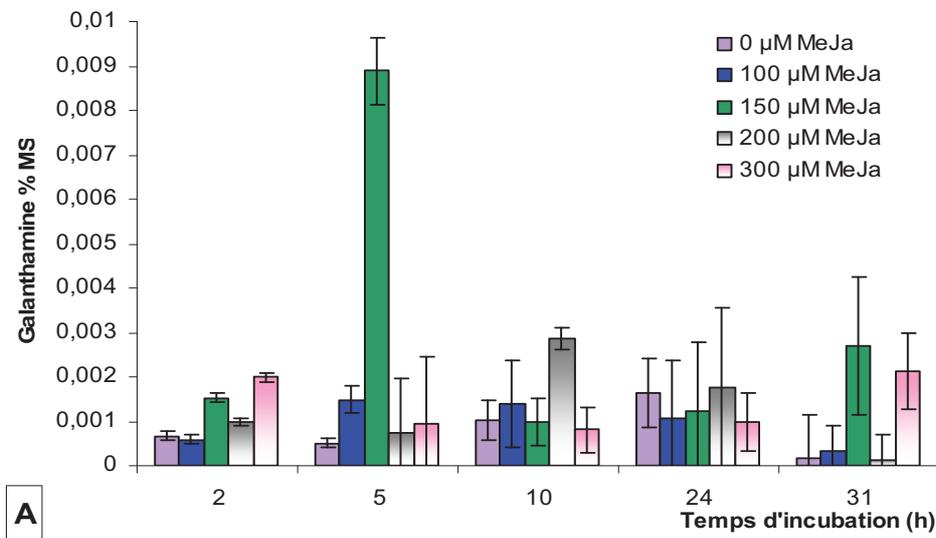


Figure 51 : Dosages par HPLC des teneurs en galanthamine (A) et en lycorine (B) dans les extraits des cals *in vitro* incubés avec différentes concentrations de MeJa.

b. Mesure de l'accumulation de la galanthamine et de la lycorine par LCMS

Afin de confirmer nos résultats obtenus par HPLC, et afin de quantifier les alcaloïdes présents en faibles quantités, nous avons eu recours à une autre méthode plus sensible et de haute résolution, la LCMS.

Les concentrations de galanthamine et de lycorine accumulées dans les cals *in vitro* et dans leurs milieux de culture en réponse aux applications du MeJa, sont illustrées dans la figure 52.

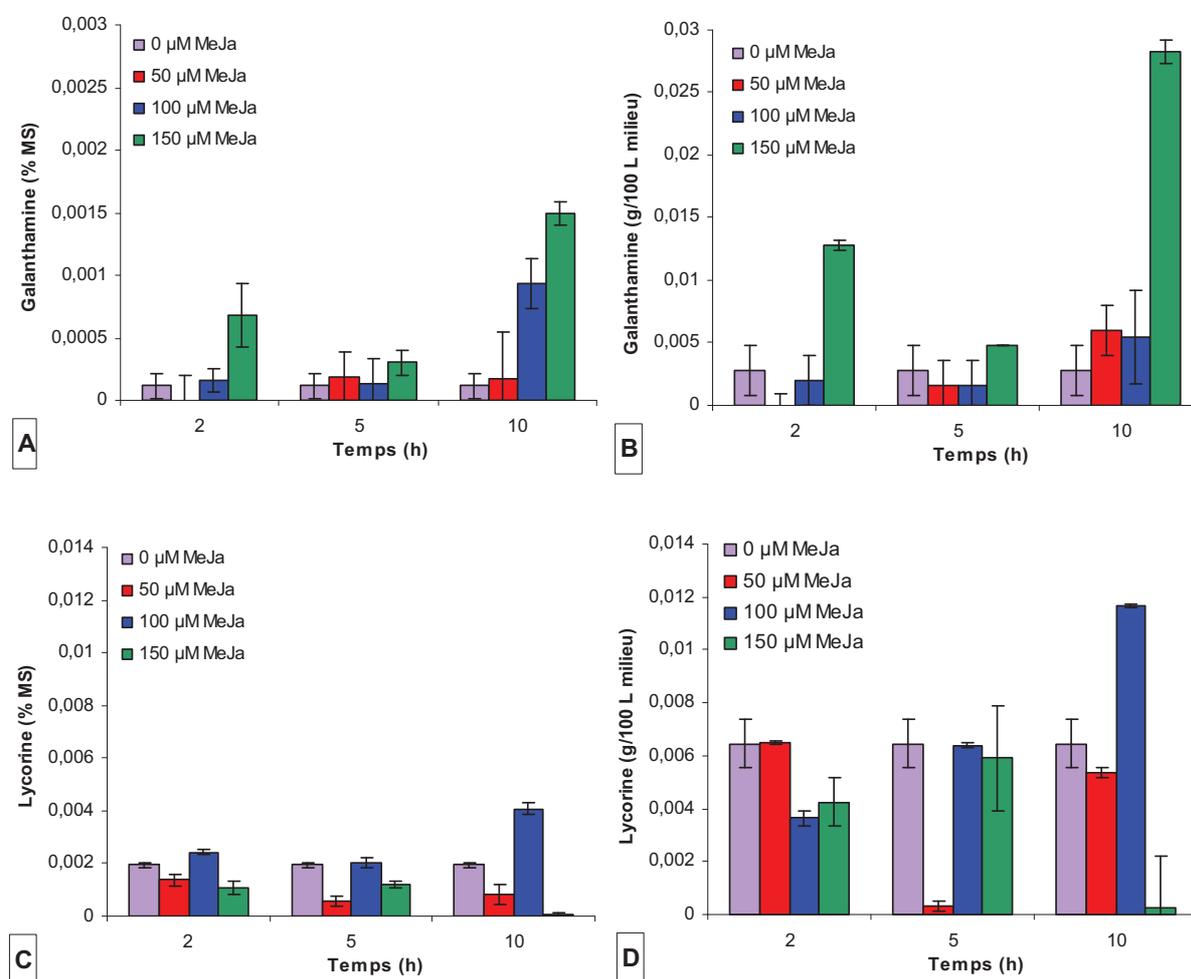


Figure 52 : Pourcentages de galanthamine et de lycorine dans les extraits (A et C) et les milieux de culture *in vitro* de cals (B et D) de *Leucojum aestivum* analysés par LCMS.

Les graphes représentant les teneurs en **galanthamine** dans les tissus et dans leurs milieux de culture (Figure 52AB) montrent une augmentation significative de l'accumulation de galanthamine dans les tissus après **10 h** d'incubation avec **150 μ M** de MeJa, (**0,0016 % MS**) (Figure 52A), et aussi dans le milieu de culture (**0,03 g/100 L milieu**) (Figure 52B). La plus forte concentration du MeJa (150 μ M) semble efficace pour l'induction de la synthèse de la galanthamine en favorisant ainsi son relargage dans le milieu de culture. Dans ces conditions et en se référant aux cals et leurs milieux de culture contrôles, l'augmentation de l'accumulation de galanthamine, en présence de 150 μ M de MeJa, est équivalente à un facteur de 12,6 dans les tissus, et de 10 dans le milieu de culture (Figure 52AB).

L'application de **100 μ M** de MeJa pendant **10 h** aux cultures des cals *in vitro*, stimule l'accumulation de la **lycorine** dans les tissus (**0,004 % MS**) (Figure 52C), et favorise son relargage dans le milieu de culture (**0,011 g/100 L milieu**) (Figure 52D). Dans ces conditions, l'augmentation de l'accumulation de la lycorine en présence de 100 μ M de MeJa, est supérieure à un facteur de 2 dans les tissus, et à un facteur de 1,7 dans le milieu de culture, par rapport aux cals et leurs milieux de culture contrôles.

Si on compare les teneurs en galanthamine avec les teneurs en lycorine, on observe des différences. L'ajout de 150 μ M de MeJa favorise la synthèse, après 10 h d'incubation, de la galanthamine et de son relargage au détriment de la lycorine, tandis que l'ajout de 100 μ M favorise la synthèse de la lycorine (0,0042 % MS) et son relargage (0,012 g/100 L milieu).

c. Comparaison des deux méthodes d'analyses

En comparant les résultats de quantification par LCMS aux résultats obtenus par HPLC, on observe des différences de pourcentages, qui peuvent être dues à la sensibilité et la haute résolution que la LCMS nous offre. Cette différence est remarquable surtout, pour les teneurs en galanthamine détectées après 5 h d'incubation avec 150 μ M de MeJa. La même quantité n'est pas retrouvée dans les extraits analysés en LCMS.

En HPLC, on détecte $0,009 \pm 0,001$ % MS de galanthamine dans les cals *in vitro* incubés pendant 5 h avec 150 μ M de MeJa (Figure 51A). En LCMS, les mêmes extraits analysés présentent une teneur égale à 0,0003 % MS de galanthamine (Figure 52A). Par contre, les teneurs détectées dans les autres conditions sont comparables, par exemple, après 10 h d'incubation avec 150 μ M, on détecte $0,001 \pm 0,001$ % MS de galanthamine en HPLC (Figure

52A), et 0,0015 % MS en LCMS (Figure 52A). On constate donc, que le pic considéré comme étant la galanthamine en HPLC peut renfermer plusieurs molécules différentes qui sont éluées au même temps de rétention que cette dernière. D'où l'avantage de la sélectivité de la spectrométrie de masse qui nous permet d'identifier les alcaloïdes grâce à leur masse moléculaire.

d. Conclusion partielle

Les effets de l'induction sont rapides et transitoires entre les heures d'incubation avec le MeJa. Les alcaloïdes sont relargués dans le milieu de culture en quantité plus importante que celle retenue dans les cals producteurs.

La synthèse (0,0016 % MS) et le relargage (0,03 g/100 L milieu) de la galanthamine sont stimulés après 10 h d'incubation des cals avec 150 μ M de MeJa. La synthèse (0,004 % MS) et le relargage (0,011 g/100 L milieu) de la lycorine sont stimulés après 10 h d'incubation des cals avec 100 μ M de MeJa.

L'appareil LCMS nous a permis de quantifier avec plus de sélection et de précision, la galanthamine et la lycorine, accumulées dans les cals *in vitro*, et relarguées dans le milieu de culture.

Nos résultats obtenus avec les cals embryogènes, ne sont pas comparables avec les travaux de la littérature. Les cals embryogènes traités, correspondent à des tissus moins organisés que les racines de *Datura*, et les tissus de *Narcissus*. Il est donc important, d'étudier l'effet du MeJa sur d'autres tissus plus organisés, comme les bulbilles *in vitro* de *L. aestivum*.

3. Application du MeJa aux cultures de bulbilles *in vitro*

Nous avons montré dans les expériences précédentes, le rôle de la différenciation cellulaire dans la production *in vitro* des alcaloïdes. Les bulbilles *in vitro*, constituent un matériel végétal plus organisé que les cals embryogènes. Notre objectif est d'appliquer du MeJa aux bulbilles *in vitro* de *L. aestivum*, et de comparer l'effet avec celui observé précédemment chez les cals. Pour cela, nous avons appliqué les mêmes concentrations de MeJa testées auparavant, aux bulbilles *in vitro* de *L. aestivum* âgés de 4 mois de culture.

a. Mesure de l'accumulation de la galanthamine et de la lycorine par HPLC

L'effet de chacune des concentrations de MeJa sur l'accumulation de la galanthamine (Figure 53A) et de la lycorine (Figure 53B) dans les bulbilles *in vitro* de *L. aestivum*, a été évalué en HPLC.

La figure 53A montre que le MeJa, à une concentration de **150 μM** , a la capacité de stimuler la synthèse de la galanthamine par les bulbilles *in vitro* de *L. aestivum*. L'accumulation de **galanthamine** est augmentée avec un **rapport de 22,27** comparativement aux cultures contrôles. Un maximum de galanthamine est observé après **10 h** de culture en présence de 150 μM de MeJa, cette accumulation est équivalente à **0,5 \pm 0,001 % MS**. Après 2 h d'incubation avec 150 μM de MeJa, l'induction de la synthèse de galanthamine est également significative (0,2 \pm 0,02 % MS), soit 10 fois l'accumulation en l'absence de MeJa (0,02 \pm 0,001 % MS).

L'application de **100 μM** de MeJa, aux bulbilles *in vitro* de *L. aestivum* (Figure 53B), a induit la synthèse de **lycorine** entre **5 et 10 h** de contact (0,01 \pm 0,004 % MS) avec un **rapport de 100**, comparé aux teneurs en lycorine dans les bulbilles *in vitro* contrôles (0,0001 % MS). La concentration de 50 μM de MeJa a exercé une induction moins significative sur la synthèse de la lycorine. Cette dernière est équivalente à 0,006 % MS après 5 h de contact avec 100 μM de MeJa, et tend à diminuer à 0,001 % MS après 10 h de culture. L'ajout de 150 μM de MeJa a stimulé l'accumulation de la lycorine, seulement après 10 h d'incubation. Dans cette condition, les teneurs en lycorine sont comparables à celles obtenues après 10 h d'incubation avec 100 μM de MeJa, soit un pourcentage de l'ordre de 0,006 % MS.

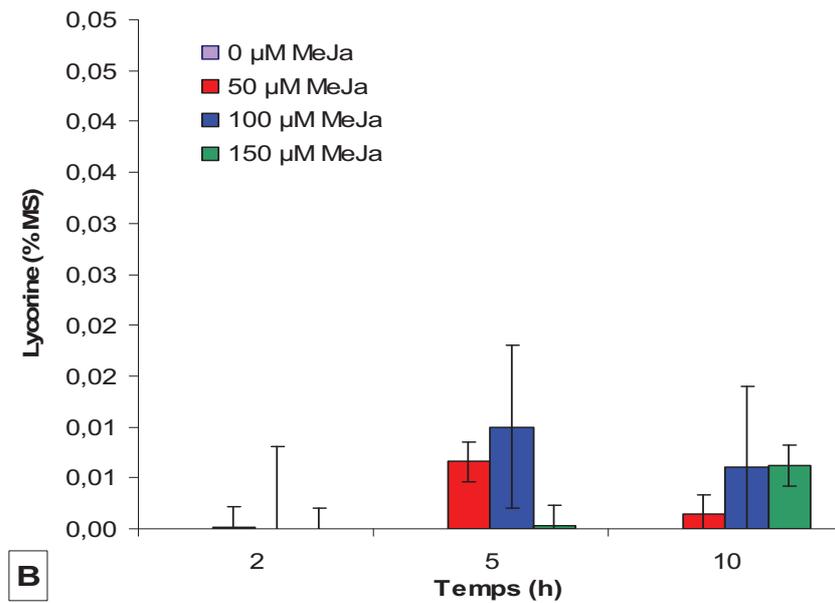
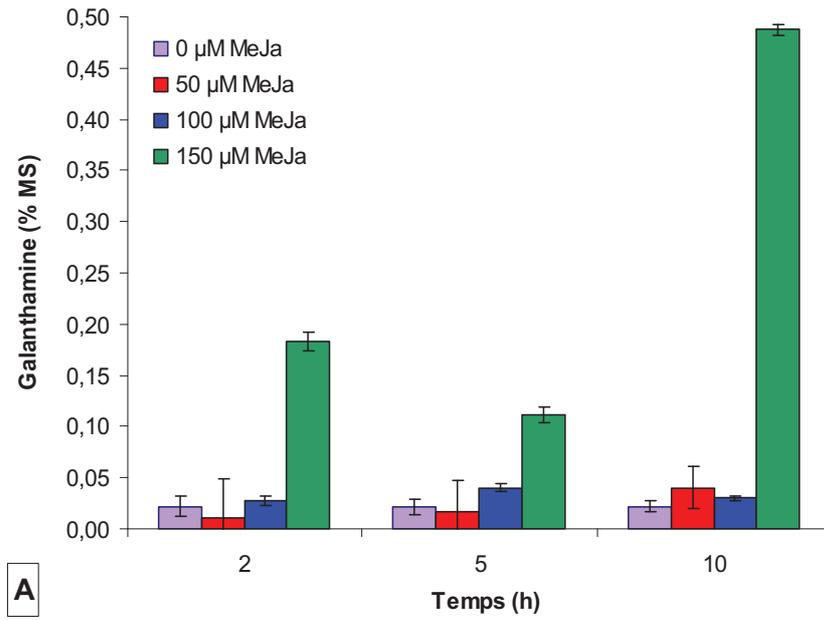


Figure 53 : Pourcentages de la galanthamine (A) et de la lycorine (B) obtenus par HPLC, dans les extraits de bulbilles *in vitro* traités pendant 10 h avec différentes concentrations de MeJa (0, 50, 100 et 150 μM).

b. Mesure de l'accumulation de la galanthamine et de la lycorine par LCMS

Les extraits de bulbilles *in vitro* et de leurs milieux de culture analysés précédemment en HPLC ont été ensuite analysés par LCMS. Notre objectif est de confirmer l'identité des pics de galanthamine et de lycorine, et de valider nos résultats quantitatifs avec une deuxième méthode plus sélective et plus précise. La LCMS nous permet aussi de quantifier les alcaloïdes dans les milieux de culture, inférieurs à la limite de quantification par HPLC. Les résultats des pourcentages de la galanthamine et de la lycorine obtenus par LCMS sont illustrés dans la figure 54.

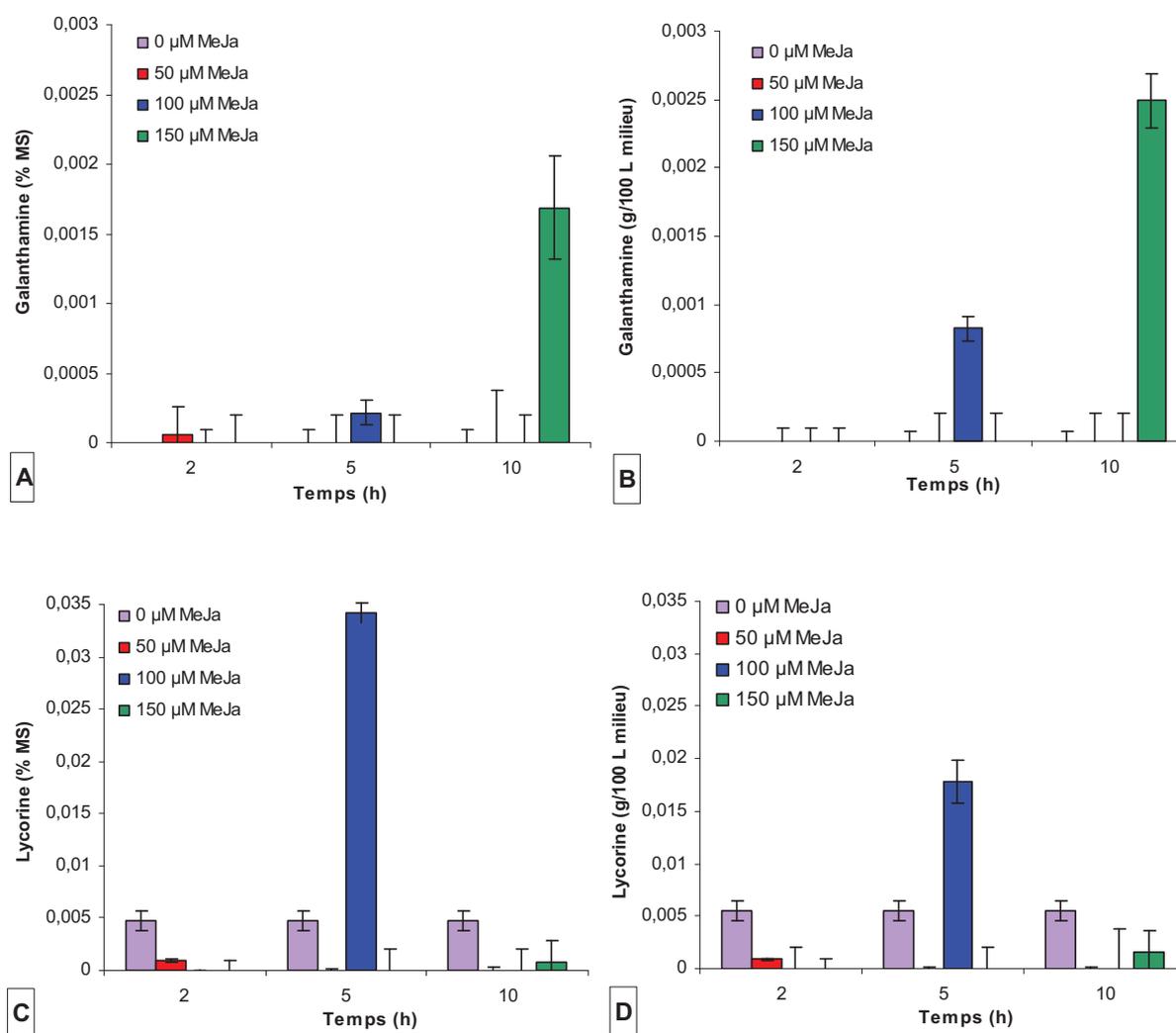


Figure 54 : Pourcentages de la galanthamine (AB) et de la lycorine (CD) obtenus par LCMS, dans les extraits et les milieux de culture des bulbilles *in vitro*, incubés pendant 10 h avec différentes concentrations de MeJa.

Le pourcentage de **galanthamine** ne dépasse pas la valeur de $0,003 \pm 0,0005$ % MS dans les extraits et dans les milieux de culture des bulbilles *in vitro* pour toutes les concentrations de MeJa appliquées (Figure 54AB). La concentration de **150 μ M** de MeJa a fortement stimulé la synthèse de la galanthamine (**0,0017 % MS**) après **10 h** d'incubation, soit **un rapport de 170** fois, comparé aux bulbilles *in vitro* contrôles ($0,00001$ % MS) (Figure 54A). Le relargage est également favorisé dans ces conditions ; un pourcentage de galanthamine d'environ **0,0025 g/100 L** de milieu est atteint en présence de 150μ M de MeJa (Figure 54B). L'application de 100μ M de MeJa a montré, après 5 h de culture, un effet moins significatif sur l'accumulation de la galanthamine dans les bulbilles *in vitro* ($0,0002$ % MS) et sur son relargage dans le milieu de culture ($0,0008$ g/100 L milieu). L'application de la faible concentration (50μ M) de MeJa n'a montré aucun effet significatif sur la synthèse de la galanthamine.

Les teneurs en **lycorine** détectées dans les extraits de bulbilles *in vitro* et dans leur milieu de culture sont 10 fois plus importantes que celles de la galanthamine (Figure 54). Une accumulation maximale de lycorine est atteinte après **5 h** d'incubation avec **100 μ M** de MeJa (Figure 54C). Cette accumulation est équivalente à **$0,035 \pm 0,0005$ % MS** dans les bulbilles *in vitro*, et $0,018 \pm 0,002$ g/100 L de milieu de culture, soient respectivement des rapports de 8,75 et de 3,6 comparés à l'accumulation dans les bulbilles *in vitro* et leurs milieux de culture témoins (Figure 54CD).

c. Comparaison des deux méthodes d'analyses

Un chromatogramme HPLC correspondant à l'un des extraits, de bulbilles *in vitro* traités avec 150 μM du MeJa, et renfermant le pic majoritaire de galanthamine ($\text{Tr} = 15,1$ min), est représenté sur la figure 55. En se référant aux chromatogrammes des étalons, le pic maximal détecté dans les extraits des bulbilles *in vitro* correspond au même temps de rétention que celui de la galanthamine.

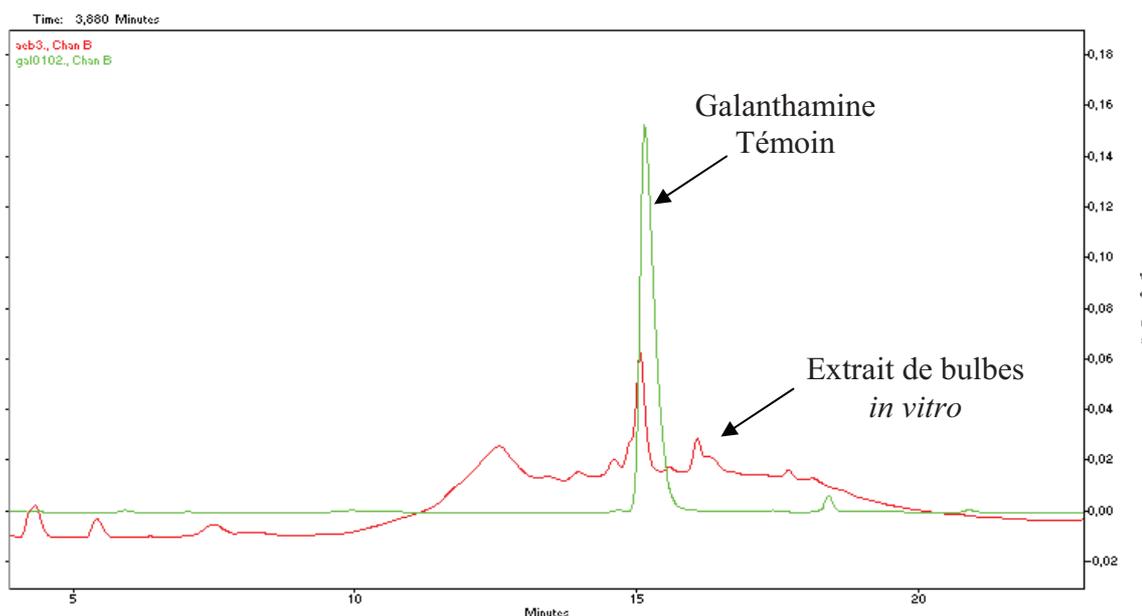


Figure 55 : Chromatogrammes obtenus par HPLC de la galanthamine ($\text{Tr} = 15,1$ min) et d'un extrait de bulbilles *in vitro* de *L. aestivum* incubé pendant 10 h avec 150 μM de MeJa.

La concentration en galanthamine est de 0,5 % MS. Après l'analyse de l'extrait en LCMS, nous avons constaté qu'il s'agissait d'une molécule ayant une masse moléculaire ne correspondant pas à celle de la galanthamine (Figure 56). Cette dernière a été détectée en LCMS avec des teneurs plus faibles (0,0017 % MS), le pic majoritaire étant compris dans le bruit de fond du chromatogramme (Figure 56b). Il s'agit donc, d'une erreur de $\pm 0,49$ ($0,5 - 0,0017 = 0,49$ % MS). En tenant compte de l'erreur calculée, on peut conclure que la galanthamine a été élicitée en présence de **150 μM** , d'un rapport de **170 fois** comparativement aux cultures contrôles.

Le pourcentage de la lycorine, possédant un temps de rétention égale à 6,9 min en HPLC (Figure 56), est de l'ordre de 0,006 % MS dans cet extrait. En LCMS, le pourcentage de cet alcaloïde est plus faible, de l'ordre de 0,0007 % MS (Figure 56) ; ce qui signifie une erreur de $\pm 0,005$ ($0,0007 - 0,006 = 0,005$ % MS). En tenant compte de l'erreur calculée, on constate finalement que la lycorine n'a pas été élicitée dans cette condition.

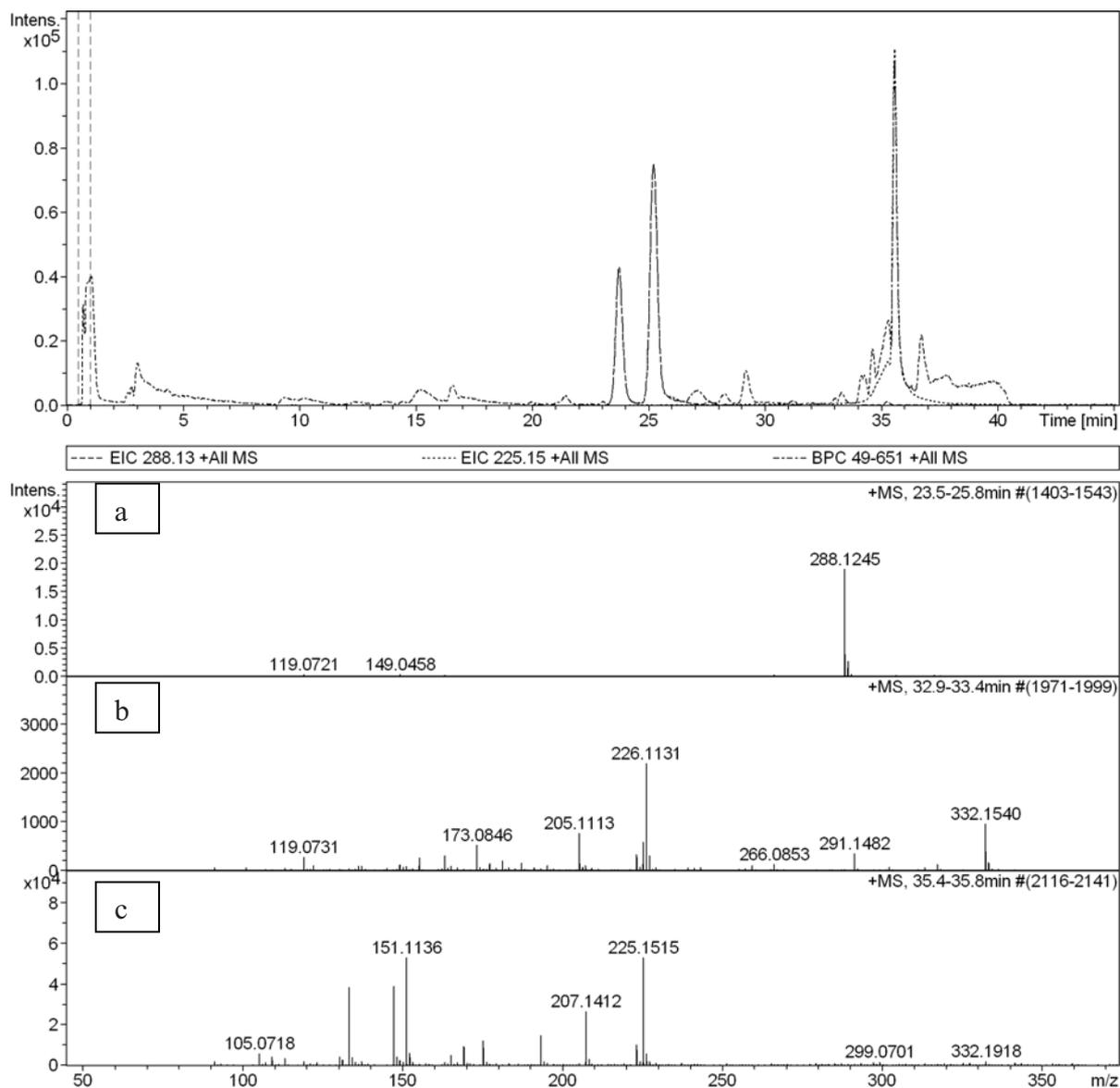


Figure 56 : Chromatogrammes obtenus par LCMS d'un extrait de bulbilles *in vitro* de *L. aestivum* incubé pendant 10 h avec 150 μ M de MeJa. a) Spectre de masse de la lycorine (Tr = 23,5 min ; $m/z = 288,1254$ $[M+H]^+$) ; b) spectre de masse de la galanthamine (Tr = 32,9 min ; $m/z = 288,1546$ $[M+H]^+$) ; c) spectre de masse du méthyljasmonate (Tr = 35,4 min ; $m/z = 225,1515$ $[M+H]^+$).

d. Conclusion partielle

Les travaux d'Al Balkhi ont montré une stimulation de la synthèse des alcaloïdes tropaniques (6 à 11 % MS) dans les racines transgéniques de *Datura innoxia*, à une concentration de 100 µM de MeJa dans les premières 10 h (Al Balkhi M, 2008). Très récemment, Stanilova et ses collaborateurs ont rapporté des teneurs maximales de galanthamine élicitée égale à 0,2 % MS suite à l'ajout de l'acide jasmonique aux tissus *in vitro* de *L. aestivum* (Stanilova *et al.*, 2010).

Durant cette expérimentation, nous avons respecté les mêmes conditions chromatographiques utilisées par Colque et ses collaborateurs dans le but de comparer nos résultats à ceux de la littérature. La seule différence réside dans le choix de l'espèce. Colque *et al.*, ont testé l'application du MeJa sur des tissus *in vitro* organisés de *N. confusus*, alors que nous avons choisi d'étudier le même effet sur des tissus *in vitro* de *L. aestivum*. En tenant compte de la variabilité au sein des espèces, et des conditions d'incubation, de culture *in vitro* et en se limitant aux analyses chromatographiques par HPLC, on remarque que nos résultats sont comparables à ceux de Colque *et al.*, 2004.

Colque et ses collaborateurs ont démontré, suite aux analyses par HPLC, que l'ajout de 25 µM de MeJa a stimulé l'accumulation de la galanthamine dans des tissus de *N. confusus* et son relargage dans le milieu de culture. Le pourcentage global de galanthamine, accumulée dans les tissus et relarguée dans le milieu est équivalent à 0,8 % MS après 10 j de contact avec le MeJa. Le relargage de la galanthamine dans le milieu de culture, est favorisé avec un pourcentage de 300 % comparé aux contrôles (Colque *et al.*, 2004). Il s'agit des teneurs maximales obtenus au terme de leur étude.

Au terme de notre étude, et en tenant compte des teneurs maximales de galanthamine accumulée dans les bulbilles *in vitro*, nous avons détecté en HPLC, un pourcentage de 0,5 % MS. Cette teneur est proche de celles rapportées par Colque *et al.*, 2004 (0,8 % MS) et par Stanilova *et al.*, 2010 (0,2 % MS).

Or, nous avons montré dans l'étude se rapportant aux bulbilles *in vitro*, que le pic considéré comme étant la galanthamine, n'en contient pas. Il s'agit de plusieurs molécules éluées avec le même temps de rétention que la galanthamine en HPLC, le même pic chromatographique. Grâce à la sélectivité et la haute précision de la méthode LCMS, nous avons pu distinguer ces molécules de la galanthamine. Il est à noter que les analyses

chromatographiques rapportées par Colque *et al.*, 2004 et Stanilova *et al.*, 2010, ont été faites par HPLC ce qui n'exclue pas les erreurs d'identification.

Nos résultats montrent que les analyses par HPLC uniquement ne doivent pas être prises en compte pour l'évaluation de l'effet du MeJa. La deuxième méthode LCMS nous a permis de mieux sélectionner les pics et de quantifier avec exactitude les teneurs en galanthamine et en lycorine.

Il en résulte donc, d'une induction de la synthèse alcaloïdique par le MeJa.

La concentration de **150 µM** de MeJa a fortement induit la synthèse de la **galanthamine** (0,0017 % MS) après **10 h** d'incubation, soit un rapport de 170 fois, comparé aux bulbilles *in vitro* contrôles (0,00001 % MS).

Une accumulation maximale de **lycorine** est atteinte après **5 h** d'incubation avec **100 µM** de MeJa. Cette accumulation est équivalente à $0,035 \pm 0,0005$ % MS dans les bulbilles *in vitro*, soit respectivement un rapport de 8,75 comparé à l'accumulation dans les bulbilles *in vitro* témoins.

Quant au relargage des deux alcaloïdes, il est 20 fois plus important pour la galanthamine en présence de 150 µM de MeJa, et 3,6 fois plus important pour la lycorine en présence de 100 µM de MeJa.

C- Conclusion du chapitre (Ptak A, El Tahchy A *et al.*, J Nat Prod 2009 ; Ptak A, El Tahchy A *et al.*, Plant Cell Tiss Organ Cult 2010)

Au terme de ce chapitre, nous avons pu montrer le rôle que joue l'éthylène, d'une part, dans l'organogenèse des tissus *in vitro* de *L. aestivum* et d'autre part sur l'accumulation et la diversité des alcaloïdes chez cette même espèce. L'accumulation des alcaloïdes et l'induction de leur biosynthèse sont dépendantes du stade de différenciation des cultures *in vitro*. L'accumulation de galanthamine et la diversité des alcaloïdes, la formation de cals, sont maximales quand les cals sont cultivés en présence de KMnO_4 et de STS 10 μM . Sept alcaloïdes ont été identifiés dans les cultures *in vitro* contenant du KMnO_4 et du STS, ainsi que dans les bulbes *in vivo*. Néanmoins, de nouveaux pics ont été détectés, et qui n'ont jamais été identifiés dans la littérature, ce qui ouvre la porte à des nouvelles perspectives pour approfondir cette étude.

Les effets de l'induction par le MeJa, sont rapides et transitoires. Les alcaloïdes sont relargués dans le milieu de culture en quantités plus importantes que celles retenues dans les bulbilles *in vitro* producteurs. Or, nous avons prouvé, surtout dans l'étude concernant les bulbilles *in vitro*, que le pic considéré comme étant la galanthamine, correspond à d'autres molécules qui sont éluées au même temps de rétention que la galanthamine. Les résultats obtenus par HPLC ne doivent pas être pris en compte, seuls, pour l'évaluation de l'effet du MeJa. Grâce à la sélectivité et à la haute précision de la méthode LCMS, nous avons pu quantifier avec plus de précision et de spécificité la galanthamine et la lycorine. Dans tous les cas, il en résulte une induction non négligeable de la synthèse alcaloïdique. Les inductions maximales sont obtenues après 10 h d'incubation en présence de 150 μM de MeJa, soit un pourcentage maximal, mesuré par LCMS, et qui est équivalent à 0,0017 % MS de galanthamine. Après 5 h d'incubation en présence de 100 μM de MeJa, le pourcentage maximal de lycorine est de 0,03 % MS.

Chapitre IV.

Biotransformation des précurseurs deutérés

Le principal objectif de nos travaux est d'augmenter la biosynthèse de la galanthamine dans nos cultures *in vitro*. L'utilisation d'un précurseur de biosynthèse a pour objectif de forcer la voie de biosynthèse en augmentant le flux global des précurseurs vers la molécule recherchée. Outre les paramètres que nous avons fait varier pour obtenir une meilleure accumulation alcaloïdique, nous avons envisagé des expériences de biotransformation. Celles-ci consistent à introduire un précurseur commun des alcaloïdes des Amaryllidaceae, en l'occurrence la 4'-*O*-méthylnorbelladine, et à suivre son incorporation dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes dérivés.

Des essais préliminaires ont été auparavant effectués au laboratoire (Diop MF, 2007), sur la biotransformation de la 4'-*O*-méthylnorbelladine non marquée, introduite dans les cultures *in vitro* de cals de *L. aestivum*. La meilleure accumulation de galanthamine dosée par HPLC était de 0,06 % MS en présence d'une concentration de $0,07 \cdot 10^{-3}$ g/L de 4'-*O*-méthylnorbelladine non marquée. La galanthamine est issue de la métabolisation du précurseur natif de la plante, et de celui introduit dans le milieu de culture. Par conséquent, la distinction des alcaloïdes issus du précurseur natifs et des alcaloïdes issus du précurseur introduit dans le milieu s'est révélée impossible.

Pour résoudre ce problème, nous avons eu recours au marquage du précurseur commun. Cependant, tous les travaux rapportés sur ce sujet dans la littérature, ont été réalisés en marquant les alcaloïdes au carbone radioactif. En 1997, Eichhorn *et al.*, ont étudié l'incorporation du même précurseur marqué au ^{13}C ou par le $^3\text{H}_3\text{C}$ dans les différentes parties d'organes de *Leucojum aestivum*.

Le marquage au ^{13}C limite la recherche à cause du coût élevé qu'on investit pour synthétiser quelques grammes. L'ajout de précurseurs biogénétiques deutérés n'a jamais été montré auparavant chez *Leucojum aestivum*. Le marquage au deutérium de la 4'-*O*-méthylnorbelladine permettra d'une part de suivre sa biotransformation avec le temps, et d'autre part d'identifier, grâce à la chromatographie couplée à la masse, les alcaloïdes dérivés comme la galanthamine et la lycorine, et de tracer ainsi les différentes étapes de la biosynthèse des alcaloïdes.

A - Synthèse des précurseurs deutérés

La synthèse de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine a été réalisée dans le groupe SUCRES de l'UMR 7565 – CNRS UHP Nancy-1 par le Dr. Michel Boisbrun. Celle-ci est composée de deux étapes, comme décrit dans la figure 57. Tout d'abord, le 3-hydroxy-4-méthoxy-d₃-benzaldéhyde (**isovanilline-d₃**) a été obtenu par alkylation sélective du 3,4-dihydroxybenzaldéhyde par CD₃I en présence de carbonate de potassium, en modifiant une procédure publiée (Markey *et al.*, 1980) avec un rendement de 49 %.

Puis, comme décrit par Szewczyk *et al.*, 1988 à propos du précurseur non marqué, une amination réductrice du dérivé précédent avec la tyramine en présence de NaBH₄ et un milieu acide (HCl) a donné le composé désiré, la **4'-O-méthyl-d₃-norbelladine** sous forme d'un hydrochlorure avec un rendement de 33 %.

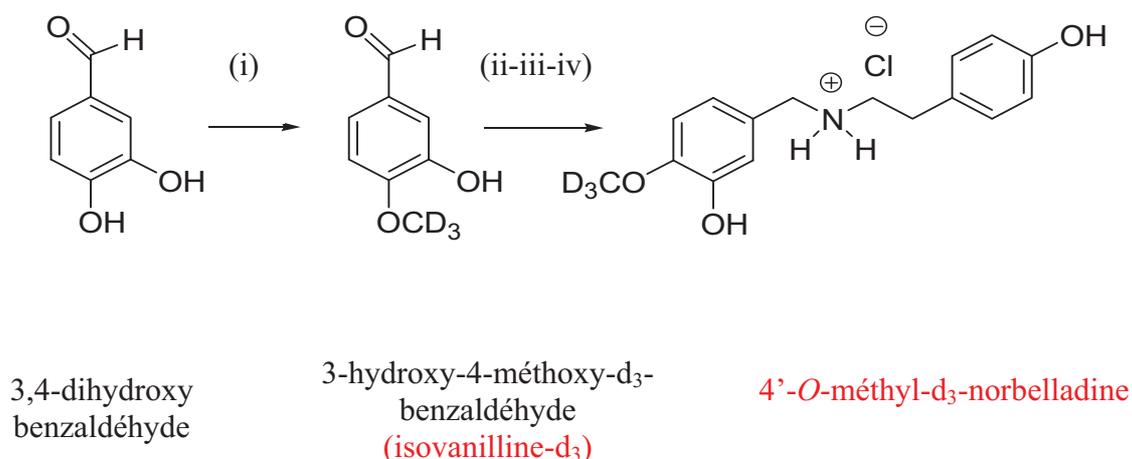


Figure 57 : Synthèse de l'isovanilline-d₃ et de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine. Réactifs et conditions: (i) CD₃I, K₂CO₃; (ii) Tyramine, tamis moléculaire; (iii) NaBH₄; (iv) HCl.

B - Effet de l'ajout de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine aux suspensions cellulaires de *L. aestivum*

2 g de cals embryogènes, initiés sur milieu MS30 solide additionné de 25 µM piclorame et de 0,5 µM BAP (Figure 58), ont été transférés dans des Erlenmeyers de 150 mL renfermant 20 mL du même milieu liquide. Les suspensions étaient maintenues sous agitation orbitale de 150 rpm, à l'obscurité et à 23 °C.

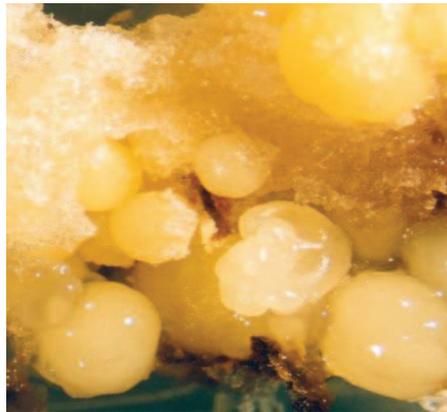


Figure 58: Cals embryogènes de *Leucojum aestivum* initiés sur milieu MS30 + 25 µM piclorame + 0,5 µM BAP.

La 4'-O-méthylnorbelladine deutérée (D3MN), est une poudre blanche synthétisée sous forme d'un hydrochlorure. Elle a été dissoute dans de l'eau ultrapure stérile et filtrée sur membrane 0,22 µm avant de l'ajouter au milieu de culture.

Trois concentrations différentes de D3MN ont été testées. L'étude, pour les cals de *Leucojum aestivum*, a été envisagée avec $0,02 \cdot 10^{-3}$; $0,07 \cdot 10^{-3}$ et $0,15 \cdot 10^{-3}$ g/L ; ces concentrations ont été choisies en référence à celles trouvées testées auparavant au laboratoire (Diop MF, 2007).

Notre protocole (Figure 59) a été conduit avec des arrêts aux jours 0, 14 et 28. Trois répétitions pour chacune des concentrations ainsi que des témoins ont été établis.

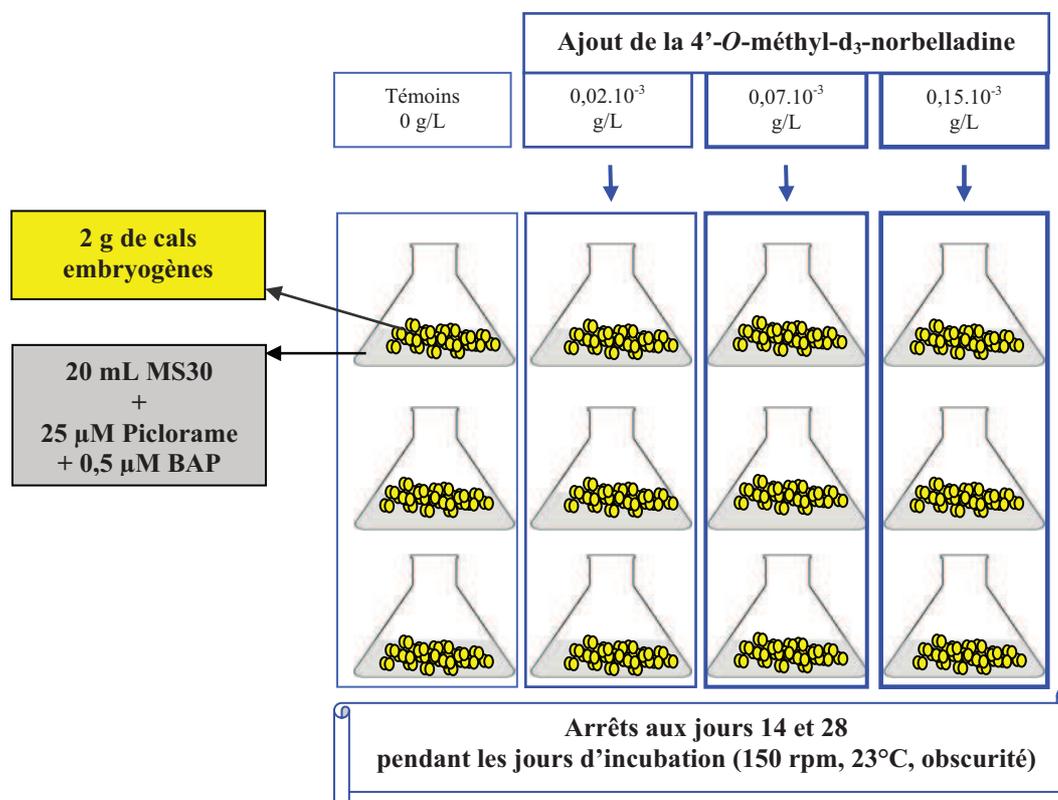


Figure 59 : Protocole expérimental de l'ajout de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine aux cultures *in vitro* de cals de *L. aestivum*.

Ce précurseur deutéré, commun à tous les alcaloïdes d'Amaryllidaceae, a été ajouté dans le milieu de culture des suspensions cellulaires de cals embryogènes, aux différentes doses indiquées. Le cycle de culture de ce matériel est de 28 jours. À l'issue de ce cycle de subculture, trois paramètres ont été évalués :

- l'impact de l'ajout du précurseur sur la croissance des cultures,
- l'incorporation du précurseur deutéré dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes,
- l'incidence sur la teneur en galanthamine et en lycorine dans les cellules.

1. Impact de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine sur la croissance des suspensions cellulaires

Le taux de croissance, qui représente la quantité de matière fraîche produite à un temps donné (MF_f) par gramme de matière fraîche inoculée (MF_i), a été suivi toutes les semaines durant un mois de culture en présence et en l'absence du D3MN (Figure 60). Le taux a été calculé selon la formule : $(MF_f - MF_i)/MF_i$.

A la fin du cycle de culture, les suspensions de cals embryogènes ont été centrifugées pendant 20 min à 4 000 rpm. Le surnageant a été récupéré et congelé à $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Le culot a été rincé trois fois successivement à l'eau stérile afin d'éliminer toute trace de D3MN adhérente sur la membrane cellulaire. Les cellules ont été récupérées après une deuxième centrifugation et la cinétique de croissance a été évaluée en comparant la masse fraîche en fin de culture à la masse fraîche à l'inoculum. Ensuite les cellules et leur milieu de culture initial ont été congelés en vue des analyses chromatographiques. La recherche de l'éventuelle toxicité du précurseur aux différentes concentrations, vis-à-vis des cellules, a été étudiée (Figure 60).

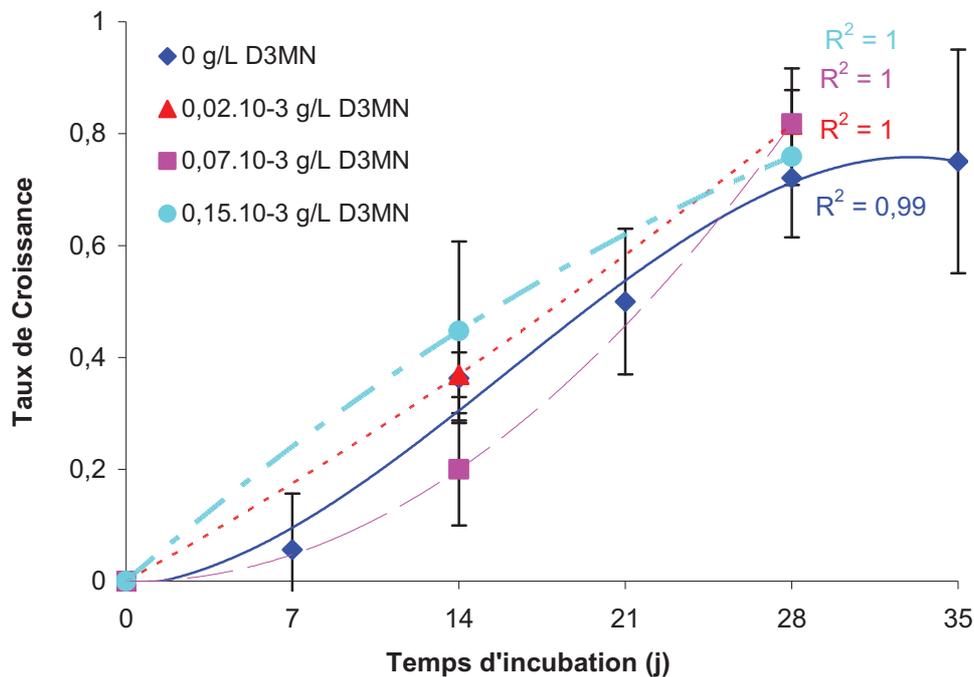


Figure 60: Effet de l'ajout de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine sur la croissance des suspensions cellulaires de *Leucojum aestivum* L. après 14 et 28 jours de culture.

La mesure de la biomasse a été effectuée pendant 35 jours pour les suspensions cellulaires cultivées en l'absence du précurseur. Or, cela n'a pas pu être réalisé en présence du D3MN, à cause de l'insuffisance du milieu de culture liquide au-delà de 28 jours de culture.

Dans la figure 60 on observe, chez les cultures contrôles, une cinétique de croissance lente pendant la première semaine de culture. À partir du septième jour de culture, on remarque une augmentation rapide de la croissance jusqu'à atteindre un plateau au bout de 28 jours de culture. C'est à ce moment là qu'il faut repiquer les cellules sur un milieu neuf afin de ne pas entraver la croissance.

L'ajout de la 4'-*O*-méthylnorbelladine deutérée n'a pas provoqué une chute importante de la biomasse. On constate une légère augmentation du taux de croissance en présence de $0,02 \cdot 10^{-3}$ et $0,15 \cdot 10^{-3}$ g/L de D3MN comparativement à la courbe témoin (Figure 60). Il est à noter une légère diminution de la biomasse en présence de la concentration moyenne de D3MN ($0,07 \cdot 10^{-3}$ g/L), pendant les deux premières semaines de culture. Cette croissance tend à augmenter après 14 jours de culture.

Après 28 jours de culture, les cinétiques sont comparables dans toutes les conditions de culture. En moyenne, la biomasse fraîche des cellules augmente d'un taux de 0,2 après chaque semaine de culture.

2. Incorporation de la 4'-*O*-méthyl-d₃-norbelladine dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes

Le précurseur marqué a été ajouté aux suspensions cellulaires aux trois concentrations testées ($0,02 \cdot 10^{-3}$; $0,07 \cdot 10^{-3}$; et $0,15 \cdot 10^{-3}$ g/L) et la métabolisation a été suivie à 0, 14 et 28 jours de culture.

Les suspensions cellulaires et les milieux de culture ont été lyophilisés et ont subi une extraction méthanolique. Les extraits alcaloïdiques ont été ensuite analysés par HPLC ; GCMS ; et LCMS afin de suivre la diffusion du D3MN du milieu de culture dans les cellules, et son incorporation dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes.

a. Analyses des extraits par HPLC :

Les résultats obtenus suite aux analyses HPLC des extraits alcaloïdiques des suspensions cellulaires et de leur milieu de culture, sont présentés dans les chromatogrammes ci-dessous (Figure 61).

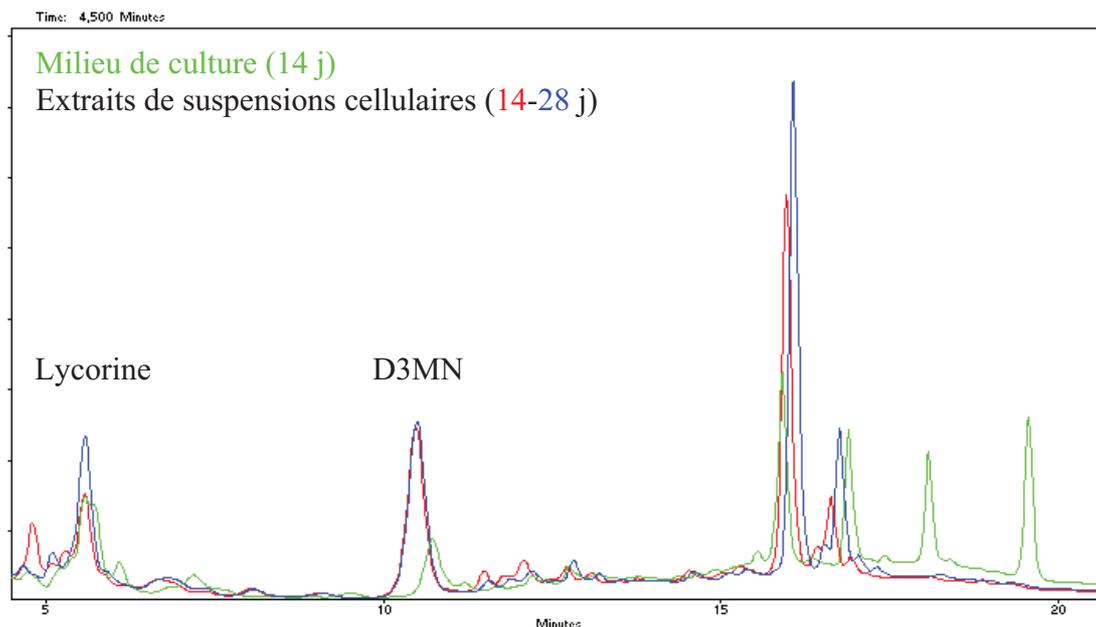


Figure 61 : Chromatogrammes des extraits de cals et de leur milieu de culture après 14 et 28 jours de culture en présence du précurseur deutéré (D3MN : Tr = 11 min).

Les résultats des analyses par HPLC montrent une diffusion du précurseur dans les cellules, celui-ci reste sous forme de trace dans le milieu de culture analysé (Figure 61). Par manque de sensibilité, nous étions limité pour la détection de la galanthamine (Tr = 15,1 min) et de la lycorine (6,2 min) en HPLC. Les teneurs présentes sont inférieures à la limite de détection de la méthode. D'autre part, cette dernière nous ne permet pas de distinguer les molécules deutérées des molécules natives, car les deux formes possèdent le même temps de rétention. Pour cela, nous avons eu recours à des appareils couplés à la spectrométrie de masse pour leur sélectivité et leur haute résolution. En premier lieu, nous avons eu recours à la GCMS.

b. Analyses des extraits par GCMS :

Nous avons procédé à un criblage des alcaloïdes natifs et deutérés présents à la fois dans les extraits cellulaires et dans le milieu de culture. Leur identification a été réalisée en comparant leur temps de rétention et leur spectre de fragmentation à ceux des témoins positifs. Pour les alcaloïdes dont on ne possède pas les témoins positifs, leur identification a été réalisée en comparant, dans les mêmes conditions chromatographiques, le temps de rétention et le spectre de fragmentation des pics obtenus, à ceux décrits et identifiés auparavant dans la littérature (Berkov *et al.*, 2005). L'identification des alcaloïdes deutérés a été effectuée en rajoutant à leur masse moléculaire + 1 ; + 2 ; et + 3. Le précurseur est deutéré avec trois atomes de deutérium, mais il est possible qu'il soit transformé en des dérivés ayant incorporé un, deux ou trois atomes. Par exemple, pour la galanthamine native on recherche son ion majoritaire (286) et son spectre de fragmentation ((286 (100 %) ; 287 (83 %), 244 (23 %), 230 (12 %), 216 (31 %), 174 (28 %)). Pour détecter cette molécule à l'état deutéré qui, selon sa structure, conserve le même groupement deutéré du précurseur, on recherche son ion majoritaire (286 + 3) et on rajoute + 3 à toutes les masses de son spectre de fragmentation (286 + 3 (100 %) ; 287 + 3 (83 %), 244 + 3 (23 %), 230 + 3 (12 %), 216 + 3 (31 %), 174 + 3 (28 %)). Cette technique a été validée en comparant le spectre de la galanthamine deutérée détectée dans les extraits, à celui de la galanthamine deutérée standard. Selon la masse de la molécule éluée au même temps de rétention, nous avons pu séparer par exemple la galanthamine native ($m/z = 286,20$) de la galanthamine deutérée ($m/z = 289,20$).

Après 28 jours de mise en culture des suspensions cellulaires en présence de $0,07 \cdot 10^{-3}$ g/L de précurseur marqué, la crinine (Figure 62AB) semble être le seul alcaloïde natif présent dans les cellules et dans le milieu de culture ($Tr = 24,14$ min ; $m/z = 271,15$ [M+]). L'anhydrolycorine- d_3 est le seul alcaloïde deutéré, ($Tr = 23,21$ min ; $m/z = 253,10$ [M+]) (Figure 62A). Cette concentration de D3MN ($0,07 \cdot 10^{-3}$ g/L) semble donc être efficace. Il est à noter l'absence de galanthamine et de lycorine dans les suspensions cellulaires contrôles. La méthode GCMS présente une limite de détection de $0,03 \mu\text{g/mL}$ pour la galanthamine et pour la lycorine.

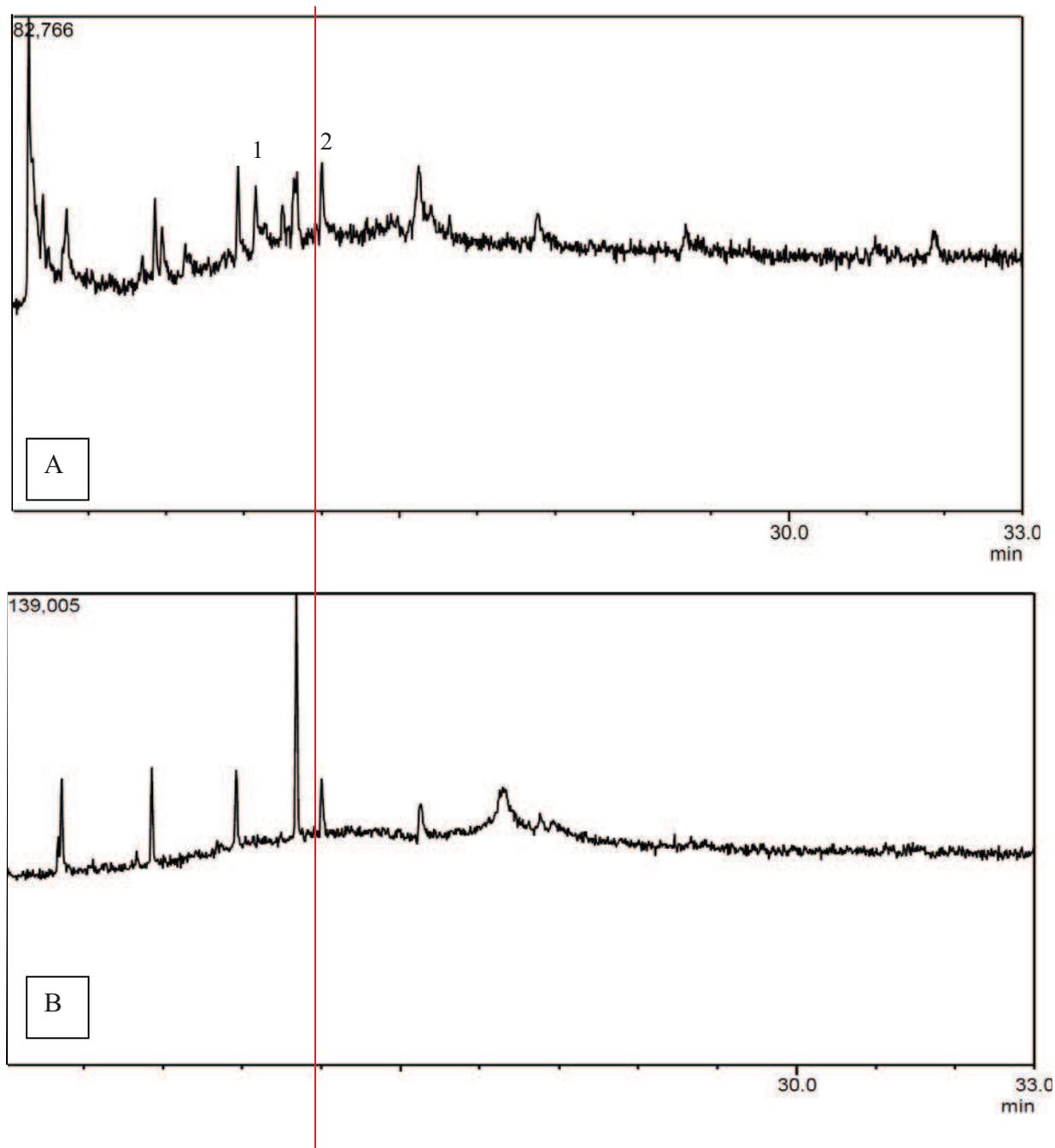


Figure 62 : Chromatogramme par GCMS d'un extrait des suspensions cellulaires (**A**) et du milieu de culture (**B**) incubés pendant 28 jours en présence de $0,07 \cdot 10^{-3}$ g/L D3MN. 1 : Anhydrolycorine- d_3 (Tr = 23,21 min, m/z = 253,10 [M⁺]) ; 2 : Crinine (Tr = 24,14 min, m/z = 271,15 [M⁺]).

D'autres molécules ont été détectées mais l'absence de standards et de données dans la littérature, limite leur identification.

Le D3MN standard (Figure 63) a été identifié avec un pic majoritaire ($m/z = 140$ [M^+]) et un temps de rétention égale à 24,5 min. On remarque l'absence du D3MN dans les suspensions cellulaires et dans le milieu de culture après 28 jours de culture (Figure 63AB).

Pour surmonter le problème de limite de détection nous avons eu recours à la chromatographie à haute résolution (LC-HRMS).

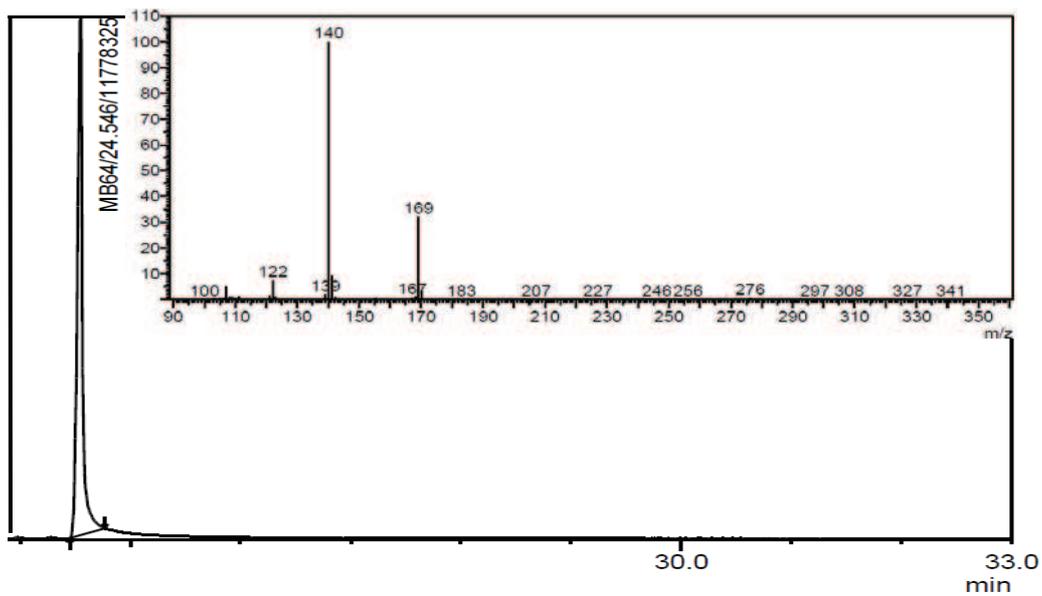


Figure 63: Chromatogramme et spectre de masse par GCMS de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine standard (Tr = 24,5 min ; $m/z = 140$ [M^+]).

c. Analyses des extraits par LC-HRMS :

Le chromatogramme LCMS (Figure 64AB) présente un pic correspondant à la 4'-*O*-méthyl- d_3 -norbélladine ($T_r = 31,1$ min) détectée dans la suspension cellulaire. Or les analyses précédentes en GCMS (Figure 62A) par manque de sensibilité, n'avaient pas permis sa détection. Grâce à la chromatographie liquide à haute résolution couplée à la spectrométrie de masse (LC-HRMS) nous avons pu détecter le précurseur deutéré dans les suspensions cellulaires et dans le milieu de culture (Figure 64AB). Ce qui confirme sa diffusion dans les cellules.

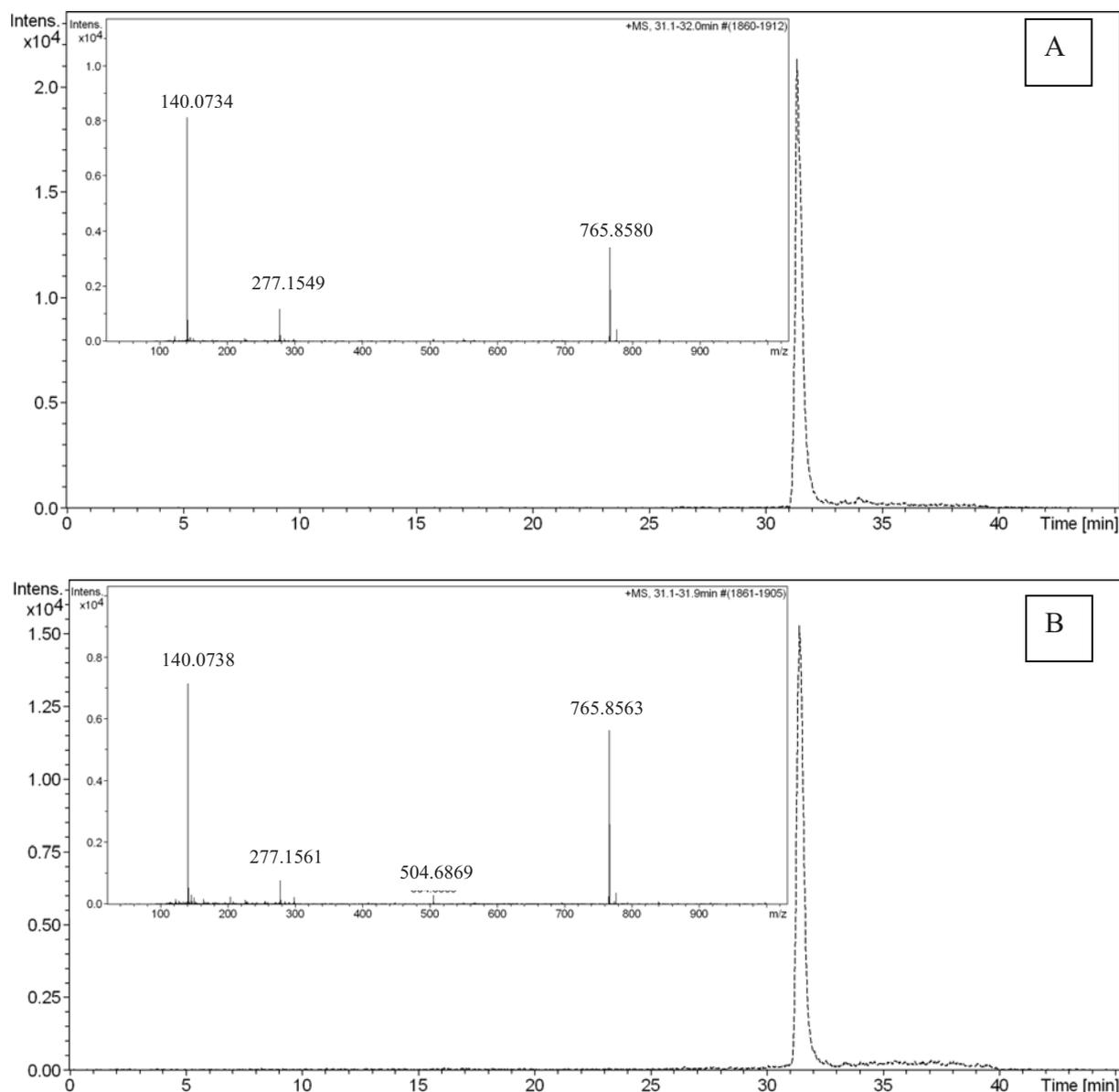


Figure 64 : Chromatogrammes et spectres de masse de la 4'-*O*-méthyl- d_3 -norbélladine ($T_r = 31,1$ min ; $m/z = 140,07 [M+H]^+$) détectée dans les suspensions cellulaires (A) et dans le milieu de culture (B) incubés pendant 28 jours en présence de $0,07 \cdot 10^{-3}$ g/L D3MN.

3. Incidence de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine sur les teneurs en galanthamine et en lycorine.

Afin d'évaluer la métabolisation du précurseur deutéré, nous avons procédé à la quantification des alcaloïdes dont on dispose des témoins positifs ; la galanthamine, et la lycorine sous leurs formes native et deutérée. Les résultats du dosage par LC-HRMS des deux alcaloïdes natifs et deutérés sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Concentrations en galanthamine et en lycorine natives et deutérées mesurées en LC-HRMS dans les extraits des suspensions cellulaires de *L. aestivum*.

Jours	[D3MN] (g/L)	[Alcaloïdes] (µg/L)*			
		Galanthamine deutérée	Galanthamine native	Lycorine deutérée	Lycorine native
14	Contrôles	0	0	0	0
14	0,02.10 ⁻³	0	0	0	0
14	0,07.10 ⁻³	1,06	0	0,08	0
14	0,15.10 ⁻³	0	0	0	0
28	Contrôles	0	0	0	0
28	0,02.10 ⁻³	0	0	0,06	0
28	0,07.10 ⁻³	0,94	0	0,07	0
28	0,15.10 ⁻³	0	0	0	0
LDD**		0,90	0,70	0,05	1,6

*Les résultats sont la moyenne de trois répétitions. **LDD : limite de détection.

Le tableau 16 montre des teneurs en galanthamine et en lycorine deutérées détectées dans les extraits cellulaires. Par contre, aucun alcaloïde n'a été détecté dans le milieu de culture. On remarque que les extraits des suspensions cellulaires contrôles ne renferment ni galanthamine ni lycorine. Dans les travaux précédents, nous avons démontré que l'accumulation des alcaloïdes est dépendante de la différenciation cellulaire et de l'âge des cultures *in vitro*. En revanche, le tableau 16 montre une stimulation de la synthèse alcaloïdique en fonction de la concentration du précurseur. Le fait de détecter la galanthamine et la lycorine deutérées confirme que le précurseur a diffusé dans les cellules, qu'il a été incorporé dans la voie de biosynthèse, et qu'il a été métabolisé en galanthamine, lycorine et en autres alcaloïdes. Le manque de témoins positifs des autres alcaloïdes a empêché leur identification et leur quantification.

Il est à noter que les teneurs en alcaloïdes deutérés présentées dans le tableau ci-dessus, sont proches de la limite de détection. Les accumulations maximales de galanthamine (1,06 $\mu\text{g/L}$) et de lycorine (0,08 $\mu\text{g/L}$) deutérées, sont atteintes en présence de $0,07 \cdot 10^{-3}$ g/L de D3MN à partir de 14 jours de culture. Les ajouts de $0,02 \cdot 10^{-3}$ et de $0,15 \cdot 10^{-3}$ g/L de D3MN n'ont pas montré des effets significatifs vis-à-vis de l'accumulation des alcaloïdes (Tableau 16).

4. Conclusion partielle

L'ajout de la 4'-*O*-méthylnorbelladine deutérée n'a pas d'effet toxique puisqu'il n'a pas provoqué une chute importante de la biomasse.

Les résultats d'analyses par HPLC montrent une diffusion du précurseur dans les cellules, celui-ci reste sous forme de trace dans le milieu de culture analysé.

En GCMS, l'anhydrolycorine- d_3 est le seul alcaloïde deutéré, détecté dans les extraits.

Le fait de détecter la galanthamine et la lycorine deutérées en LCMS, confirme que le précurseur a diffusé dans les cellules, qu'il a été incorporé dans la voie de biosynthèse, et qu'il a été métabolisé en galanthamine, lycorine et en autres alcaloïdes.

La concentration de $0,07 \cdot 10^{-3}$ g/L de D3MN a conduit à la synthèse et à l'accumulation maximales de galanthamine (1,06 $\mu\text{g/L}$) et de lycorine (0,08 $\mu\text{g/L}$) deutérées après 14 jours de culture. Néanmoins, ces concentrations sont proches de la limite de quantification de la LCMS. Les suspensions cellulaires contrôles ont montré des teneurs faibles en galanthamine et en lycorine, ce qui indique que le matériel végétal choisi n'est pas suffisamment différencié.

C - Effet de l'ajout de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine aux cultures de bulbilles *in vitro* de *L. aestivum*

Afin d'atteindre notre objectif initial, d'optimiser l'accumulation en galanthamine, nous avons décidé de choisir un matériel végétal organisé et d'augmenter les doses de D3MN ajoutées au milieu de culture, ainsi que les durées d'incubation.

L'étude réalisée avec les suspensions cellulaires de *Leucojum aestivum*, a été faite avec $0,02 \cdot 10^{-3}$; $0,07 \cdot 10^{-3}$ et $0,15 \cdot 10^{-3}$ g/L de D3MN. Les concentrations choisies pour cette expérimentation avec les bulbilles *in vitro* sont environ 1000 fois plus élevées. 0,05 ; 0,1 ; et 0,02 g/L de ce précurseur deutéré ont été ajoutés au milieu de culture des bulbilles *in vitro* de *L. aestivum* (Figure 65) selon le protocole décrit dans la figure 67. La durée d'incubation s'étale sur 40 jours dans les mêmes conditions de culture *in vitro* que précédemment. A chaque fois, nous avons contrôlé l'éventuelle toxicité du précurseur en suivant la croissance cellulaire à travers le temps dans les différentes conditions. Trois répétitions pour chacune des concentrations ainsi que des témoins ont été établis (Figure 66).

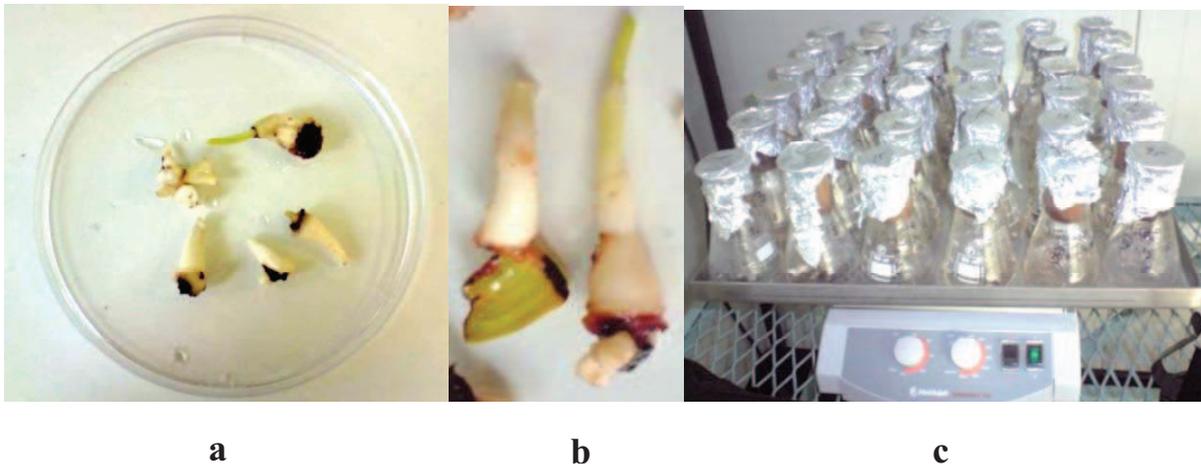


Figure 65: Cultures *in vitro* de bulbilles de *L. aestivum*. a-b) bulbilles *in vitro* de *Leucojum aestivum*. c) Ensemble des incubations des bulbilles avec le précurseur deutéré maintenus sous agitation orbitale (150 rpm).

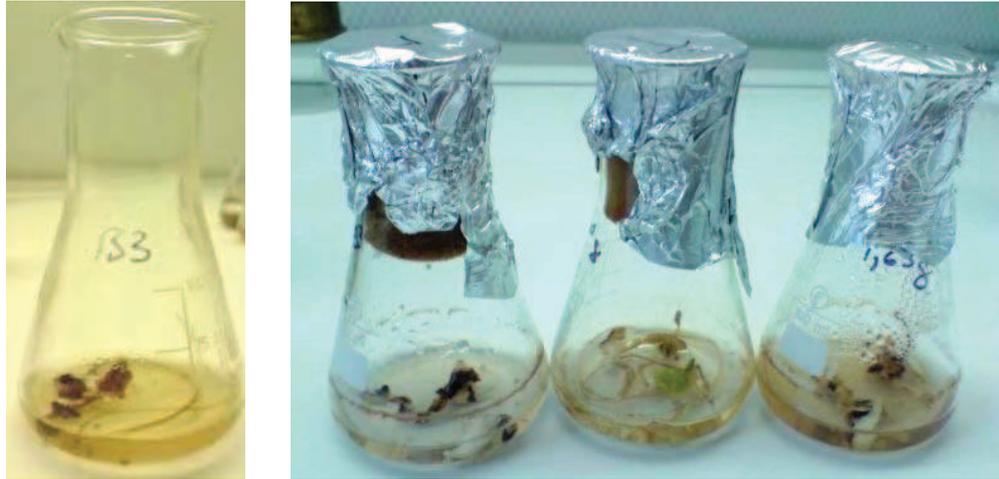


Figure 66 : Des cultures témoins et trois répétitions pour chaque concentration de précurseur deutéré.

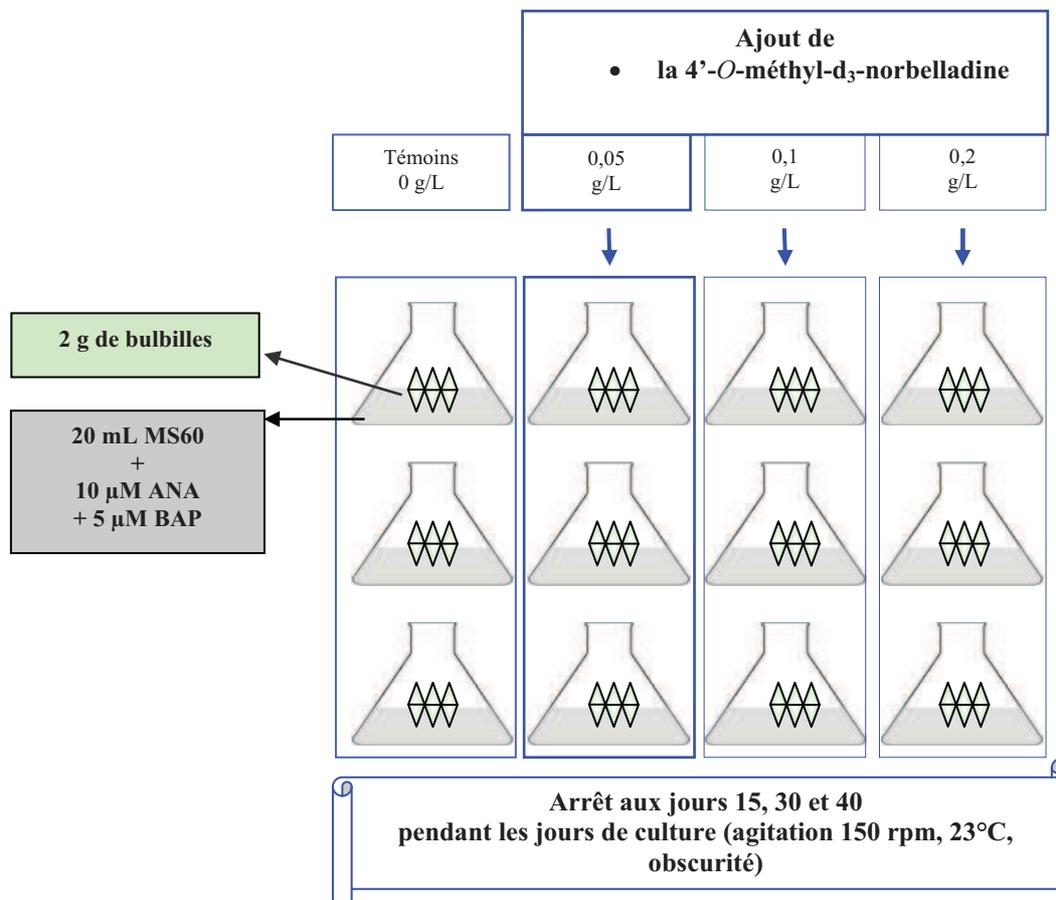


Figure 67: Protocole expérimental de l'ajout de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine aux cultures *in vitro* de bulbilles de *L. aestivum*.

Ce précurseur deutéré a été ajouté dans le milieu de culture des bulbilles *in vitro* de *L. aestivum*, aux différentes doses indiquées. Le cycle de culture de ce matériel est de 40 jours.

À l'issue de ce cycle de subculture, trois paramètres ont été évalués :

- l'impact de l'ajout du précurseur sur la croissance des cultures,
- l'incorporation du précurseur dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes,
- l'incidence sur la teneur en galanthamine et en lycorine des cellules.

1. Impact de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine sur la croissance des bulbilles *in vitro*

A la fin du cycle de culture, les milieux de culture ont été récupérés. Les bulbilles *in vitro* ont été rincés trois fois successivement à l'eau stérile afin d'éliminer toute trace de D3MN adhérente sur la membrane cellulaire. La cinétique de croissance a été évaluée en comparant la masse fraîche en fin de culture à la masse fraîche à l'inoculum. Le taux a été mesuré selon la formule $(MF_f - MF_i)/MF_i$. Ensuite les bulbilles et leur milieu de culture initial ont été congelés en vue des analyses chromatographiques. La recherche de l'éventuelle toxicité du précurseur aux différentes concentrations, vis-à-vis des bulbilles a été étudiée. Les résultats des cinétiques de croissance sont illustrés dans la figure 68.

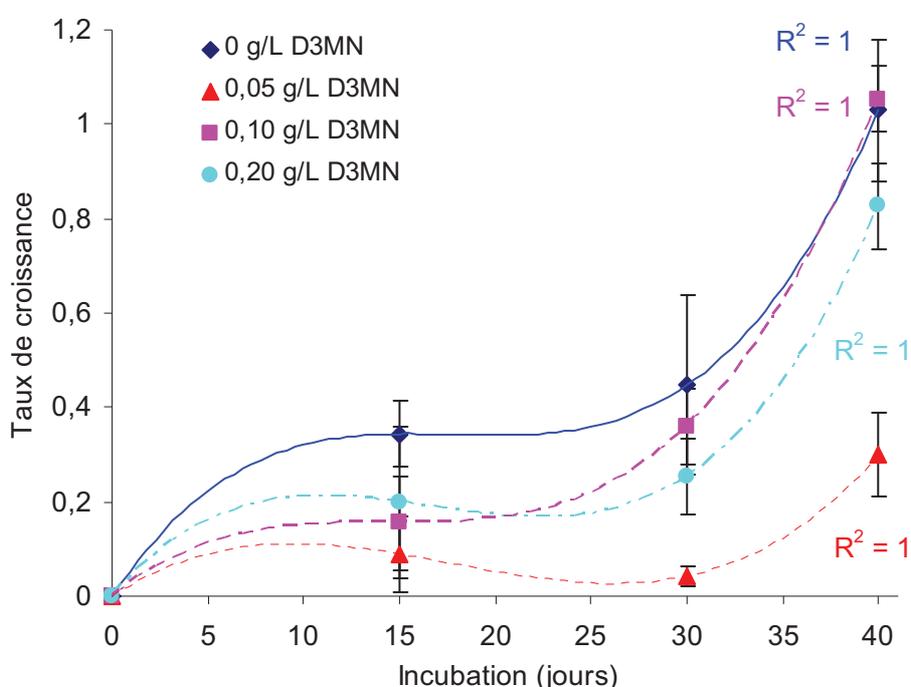


Figure 68: Effet de l'ajout de 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine sur la croissance des bulbilles *in vitro* de *Leucojum aestivum* L., après 15, 30 et 40 jours de culture avec 0,05 ; 0,1 et 0,2 g/L de D3MN.

Dans la figure 68, on observe que le taux de croissance des bulbilles augmente lentement pendant les 30 premiers jours de culture en milieu liquide. Après un mois de culture, on remarque une augmentation exponentielle de la biomasse des bulbilles jusqu'au jour 40 de subculture.

En présence des trois concentrations du précurseur D3MN, on remarque une chute importante de biomasse entre 15 et 30 jours. Cette chute est suivie après 30 jours de culture, par une augmentation rapide de la croissance. La cinétique de croissance la plus élevée est observée chez les cultures des bulbilles qui sont cultivés en présence de la concentration moyenne de D3MN (0,1 g/L). Cette cinétique est similaire à la courbe des bulbilles contrôles après 40 jours d'incubation. Le taux maximal de croissance est égale à 1, après 40 jours de culture des bulbilles contrôles et des bulbilles traités par 0,1 g/L D3MN.

De façon inattendue, on observe la plus faible cinétique de croissance en présence de la concentration minimale de D3MN (0,05 g/L). Le taux de croissance reste inférieur à 0,4 durant toute la période d'incubation avec 0,05 g/L de D3MN. Cela indique que le précurseur deutéré n'est pas directement responsable de la diminution de la croissance. En effet, ce dernier, à forte dose, n'a pas provoqué une chute de la croissance.

Il a été démontré, que les alcaloïdes ne sont pas toxiques vis-à-vis de la plante productrice, quand ils sont stockés dans les vacuoles. Mais, lorsqu'ils sont libérés à l'extérieur des vacuoles, leur structure chimique ainsi que leur activité biologique sont modifiées en fonction du changement du pH cellulaire (Tadeusz Aniszewski, 2007). La chute de la croissance peut être liée à une corrélation entre l'ajout du précurseur et l'accumulation des alcaloïdes synthétisés.

Les trois concentrations du précurseur ajoutées aux milieux de culture des bulbilles sont 1000 fois plus importantes que celles testées sur les suspensions cellulaires. En effet, les bulbilles sont des tissus plus organisés comparativement aux suspensions cellulaires étudiées précédemment. La métabolisation est plus importante dans les bulbilles que dans les cals, ce qui entraîne une accumulation de métabolites secondaires qui sont toxiques pour la plante productrice, une fois libérés dans le milieu de culture. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons procédé à des analyses chromatographiques, en suivant l'incorporation de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine dans la voie de biosynthèse et en étudiant son influence sur l'accumulation de différents alcaloïdes.

2. Incorporation de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelleadine dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes

L'ajout du précurseur marqué, aux bulbilles *in vitro* avec les trois concentrations (0,05 ; 0,1 ; et 0,2 g/L), a été suivi pendant 40 jours de culture.

Les bulbilles *in vitro* et leur milieu de culture ont été lyophilisés. La matière sèche récupérée a subi une extraction méthanolique. Les extraits alcaloïdiques ont été ensuite analysés en chromatographie afin de suivre l'incorporation du précurseur marqué dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes en criblant ses dérivés alcaloïdiques deutérés.

Les résultats d'analyses par HPLC montrent une diffusion du précurseur dans les cellules, celui-ci reste sous forme de trace dans le milieu de culture analysé. Comme pour le cas des cals, par manque de sensibilité, nous n'avons pas pu quantifier la galanthamine, la lycorine, et le précurseur deutéré en HPLC. Les teneurs présentes sont inférieures à la limite de quantification de cet appareil. D'autre part, l'HPLC nous ne permet pas de distinguer les molécules deutérées de celles natives car celles-ci possèdent le même temps de rétention. Pour cela, nous avons eu recours à des appareils couplés à la spectrométrie de masse. Il s'agit en premier lieu de la GCMS, pour le criblage des alcaloïdes natifs et des alcaloïdes deutérés dérivés du précurseur.

Les extraits de bulbilles et leurs milieux de culture ont été analysés en parallèle afin de déterminer leur contenu en alcaloïdes et leur éventuel relargage dans le milieu de culture.

Comme pour les analyses des extraits de cals et leur milieu de culture, seuls quelques alcaloïdes ont été identifiés dans les bulbilles et leur milieu de culture. Nous rappelons, que la méthode GCMS ne nous a pas permis de détecter le D3MN dans les suspensions cellulaires ni dans leur milieu de culture. Cependant, dans les extraits de bulbilles *in vitro* et de leur milieu de culture, la présence du D3MN est à noter. Ce résultat peut être lié à la limite de détection de la méthode. Notre choix d'ajouter des concentrations plus élevées est donc justifié.

Les résultats obtenus par GCMS, du criblage qualitatif des alcaloïdes natifs et deutérés dans les extraits des bulbilles *in vitro* et leur milieu de culture, incubés pendant 40 jours avec les trois concentrations de D3MN, sont présentés dans le tableau 17.

Dans le tableau 17, on observe la diffusion du D3MN dans les tissus après son ajout aux milieux de culture. Après 15 jours d'incubation avec le précurseur deutéré, on détecte des

alcaloïdes natifs et deutérés dans le milieu de culture et dans les bulbilles *in vitro*. La diversité des alcaloïdes est variable en fonction de la durée d'incubation et de la concentration du précurseur. Cela montre d'une part, que le précurseur a été incorporé dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes et qu'il a été métabolisé en divers alcaloïdes. Les alcaloïdes détectés sous forme deutérée ont été retrouvés aussi à l'état natif. La *N*-formylnorgalanthamine est le seul alcaloïde détecté à l'état natif uniquement, et qui n'a pas été deutéré. Parmi les alcaloïdes deutérés dérivés du D3MN on cite : la galanthamine-d₃, la *N*-déméthylnarwédine-d₃, la *N*-déméthylgalanthamine-d₃, la lycorine-d₂, la crinine-d₂, et la déméthylmarithidine-d₃.

On observe que les extraits correspondants aux bulbilles *in vitro* et à leur milieu de culture incubés avec 0,1 g/L de précurseur, renferment la diversité maximale d'alcaloïdes deutérés quelque soit la durée d'incubation.

En général, tous les extraits de bulbilles *in vitro* et de leurs milieux de culture, ont montré la présence d'alcaloïdes. Ce qui indique que les alcaloïdes ont été relargués dans le milieu de culture après leur accumulation dans les tissus.

La *N*-déméthylnarwédine deutérée a été détectée dans les milieux de culture des bulbilles *in vitro* cultivés pendant 15 et 40 jours en présence de 0,1 et de 0,2 g/L de D3MN. La galanthamine deutérée est apparue à partir du quinzième jour d'incubation, alors que la lycorine deutérée n'est détectée qu'à partir du jour 40 d'incubation.

Nous avons remarqué que l'incorporation du précurseur dans la voie de biosynthèse et sa métabolisation sont dépendantes du type de couplage oxydo-phénolique (Figure 69). Dans le tableau 17, on remarque la présence des alcaloïdes deutérés avec trois atomes de deutérium, c'est notamment le cas des alcaloïdes du type galanthamine (la galanthamine, la *N*-déméthylnarwédine, la *N*-déméthylgalanthamine) et du type marithidine. Ces derniers sont issus d'un couplage *para-ortho*' et *para-para*' qui leur permet de conserver le même groupement deutéré du D3MN. Dans d'autre cas, il s'agit de l'incorporation de deux atomes de deutérium, c'est le cas des alcaloïdes du type lycorine et crinine. Ces derniers sont issus d'un couplage *ortho-para*' qui permet l'incorporation de deux atomes de deutérium seulement (Figure 69).

Tableau 17 : Criblage par GCMS des alcaloïdes natifs et deutérés dans les extraits de bulbilles *in vitro* et de leur milieu de culture. D3MN : 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine, NAR : narwédine, GAL : galanthamine, LYC : lycorine, CRI : crinine, TRIS : trispériidine, MAR : maritidine. (+/- : présence ou absence d'alcaloïdes natifs ; D2/D3 : présence d'alcaloïdes deutérés avec 2 ou 3 atomes de deutérium).

	D3MN	N-déméthyl NAR	N-déméthyl GAL	NAR	N-formyl norGAL	LYC	Anhydro LYC	CRI	TRIS	Déméthyl MAR
Masses moléculaires										
[M+]	-	271	273	285	301	287	251	271	223	273
[MD2+]	-	-	-	-	-	289	253	273	225	-
[MD3+]	312	274	276	288	304	-	-	-	-	276
J 15										
Bulbilles contrôles	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Milieu de culture	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
Bulbilles + 0,05 g/L D3MN	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+, D3
Milieu de culture	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+, D3
Bulbilles + 0,1 g/L D3MN	+	-	+, D3	-	-	+	-	+, D2	-	+, D3
Milieu de culture	+	D3	-	-	-	+	-	+	-	+, D3
Bulbilles + 0,2 g/L D3MN	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Milieu de culture	+	D3	-	-	-	+	-	-	-	-
J 30										
Bulbilles contrôles	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Milieu de culture	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+
Bulbilles + 0,05 g/L D3MN	+	-	+, D3	-	-	+	-	D2	-	+, D3
Milieu de culture	+	-	+	-	-	+	-	D2	-	D3
Bulbilles + 0,1 g/L D3MN	+	-	+, D3	-	-	+	-	+, D2	-	+, D3
Milieu de culture	+	-	+, D3	-	-	+	-	+, D2	-	+, D3
Bulbilles + 0,2 g/L D3MN	+	-	+, D3	-	+	+	-	+, D2	-	+, D3
Milieu de culture	+	-	+, D3	-	-	+	-	+, D2	-	+, D3

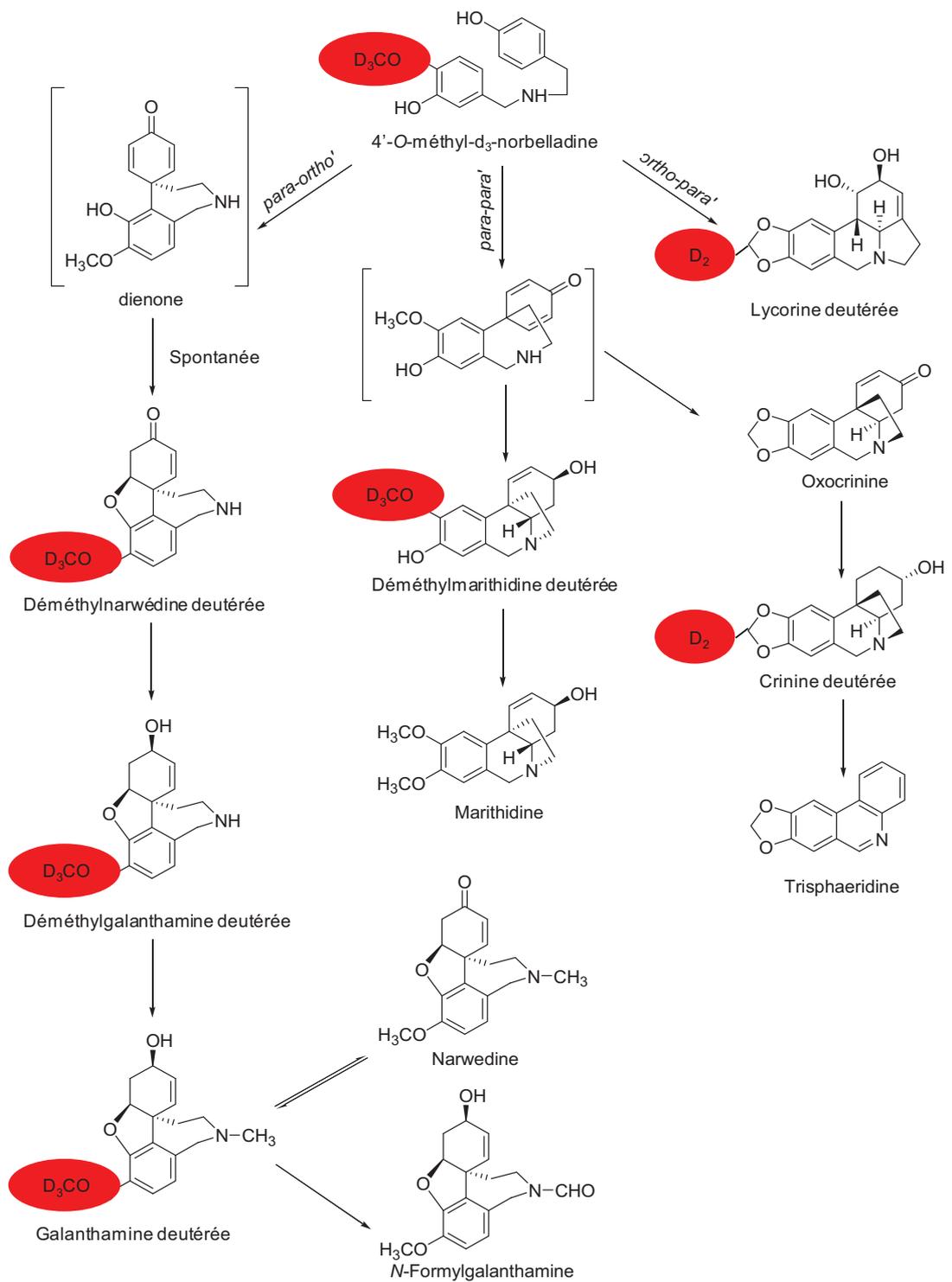


Figure 69 : Alcaloïdes deutérés après ajout de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine dans le milieu de culture.

3. Incidence de l'ajout de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine sur les teneurs en galanthamine et en lycorine.

Nous avons réalisé des analyses LCMS pour la quantification des molécules natives et deutérées, et pour la quantification du précurseur diffusé dans les tissus. En premier lieu, nous avons suivi la diffusion du précurseur deutéré dans les bulbilles *in vitro*, ensuite nous avons évalué sa métabolisation en galanthamine et lycorine deutérées et nous avons étudié son influence sur l'accumulation des molécules natives également.

a. Suivi de la diffusion de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine

L'incorporation de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine a été suivie pendant 40 jours de culture. Cette incorporation dans les tissus des bulbilles *in vitro* de *Leucojum aestivum* a été évaluée à l'aide des analyses quantitatives effectuées en LC-HRMS. Les analyses des extraits de bulbilles et de leur milieu de culture ont été réalisées durant 0, 15, 30 et 40 jours de culture. Les résultats quantitatifs sont illustrés dans la figure 70.

Dans la figure 70A, on observe au bout de 15 jours une diminution rapide des trois concentrations de D3MN (0,05 ; 0,1 ; et 0,2 g/L). Cette diminution du D3MN dans le milieu de culture est accompagnée d'une augmentation dans les bulbilles *in vitro* (Figure 70B). Après 30 jours de culture le précurseur est entièrement absorbé par les tissus *in vitro* (Figure 70B), seules quelques traces ont été détectées dans le milieu de culture. L'absorption maximale du précurseur ($0,3 \pm 0,1$ % MS) est notée au jour 15 d'incubation dans les tissus incubés avec la concentration moyenne 0,1 g/L de D3MN. Après 15 jours d'incubation on remarque une chute drastique du pourcentage du D3MN dans les tissus *in vitro* quelque soit la concentration du précurseur (Figure 70B).

Cela montre que le précurseur a été métabolisé en d'autres molécules, comme la galanthamine, la lycorine et d'autres alcaloïdes deutérés. Cela vient donc confirmer les résultats du criblage par GCMS des différents alcaloïdes recherchés et décrits précédemment dans le tableau 17.

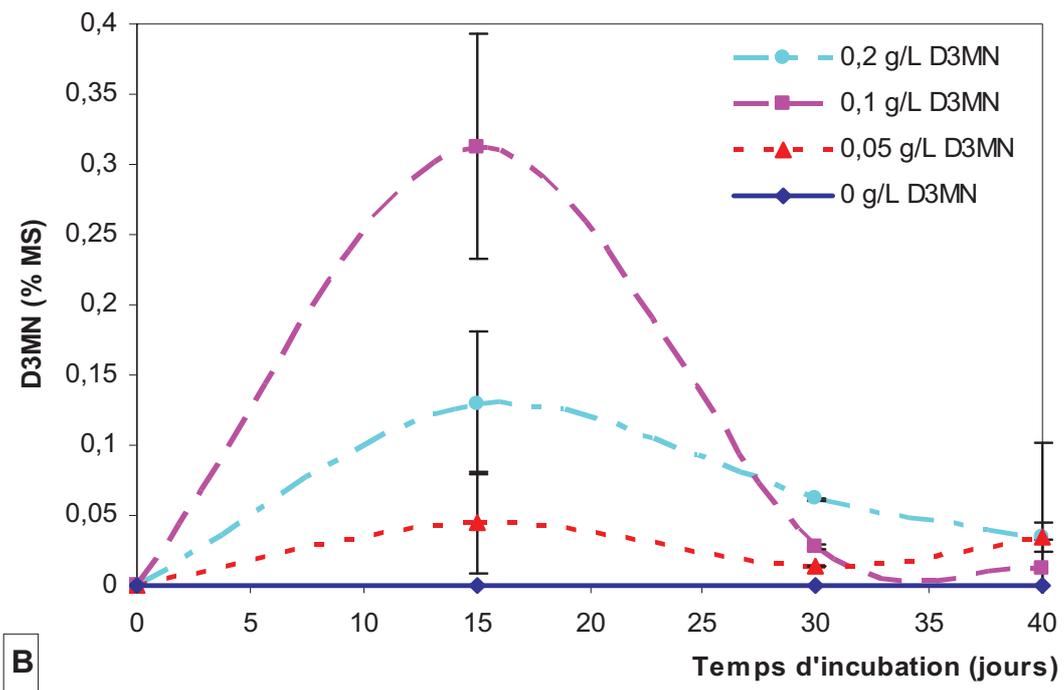
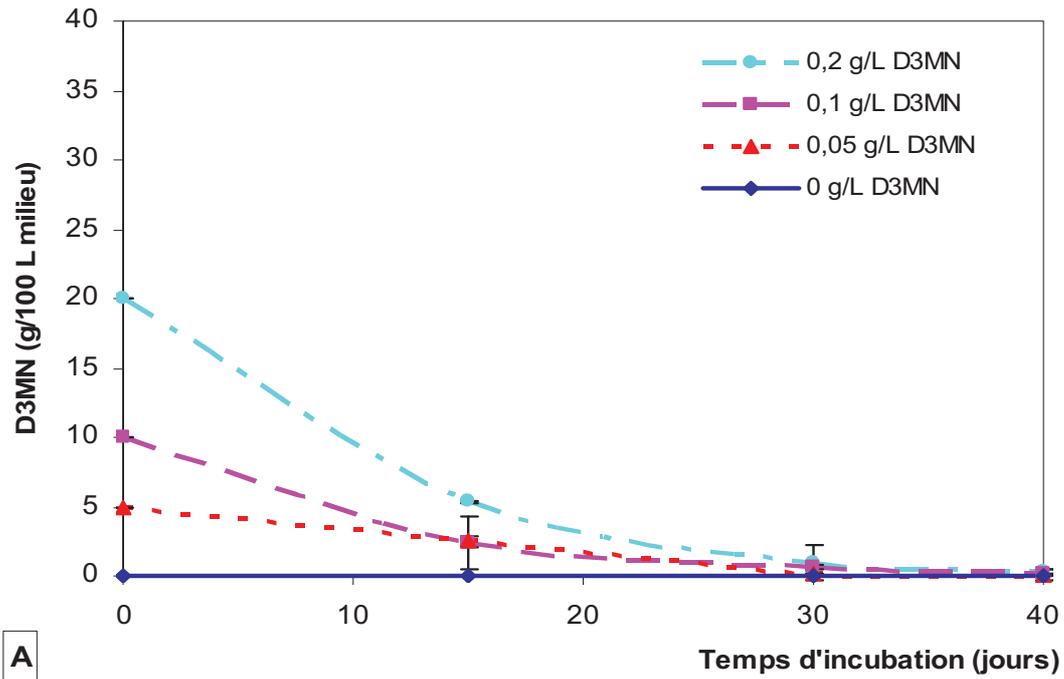


Figure 70: Suivi de la diffusion du D3MN du milieu de culture (A) dans les tissus *in vitro* (B) durant 40 jours de culture.

b. Métabolisation de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelleadine en galanthamine et lycorine deutérées

Nous avons quantifié la galanthamine et la lycorine deutérées par LC-HRMS, dans les extraits de bulbillles et de leur milieu de culture.

La quantification de la galanthamine-d₃ a été réalisée en se référant à la galanthamine deutérée standard, synthétisée par Dr. Guillou à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN, GIF SUR YVETTE). La synthèse est réalisée selon le protocole décrit par Rouleau *et al.*, 2008.

La galanthamine est deutérée avec trois atomes de deutérium, et présente un temps de rétention égal à 34 min, et une fragmentation à $m/z = 291,1783$ [MD3+H]⁺.

La lycorine possède deux atomes de deutérium, un temps de rétention égal à 25,5 min et une fragmentation à $m/z = 290,1356$ [MD2+H]⁺.

Les masses moléculaires de ces deux molécules deutérées peuvent être confondues avec les isotopes de la galanthamine et de la lycorine qui existent naturellement avec un pourcentage de 2 %. Les résultats de quantification sont donc soustraits de 2 %, et ne sont significatifs que si le pourcentage du fragment majoritaire dépasse les 2 %. Par exemple pour la galanthamine qui présente un fragment majoritaire à 100 % ($m/z = 288,1650$ [M+H]⁺; $310,1533$ [M+Na]⁺) à l'état natif (Figure 71A), doit montrer un fragment majoritaire d'une intensité supérieure à 2 % à l'état deutéré ($m/z = 291,1822$ [M+H]⁺; $313,1726$ [M+Na]⁺) (Figure 71B).

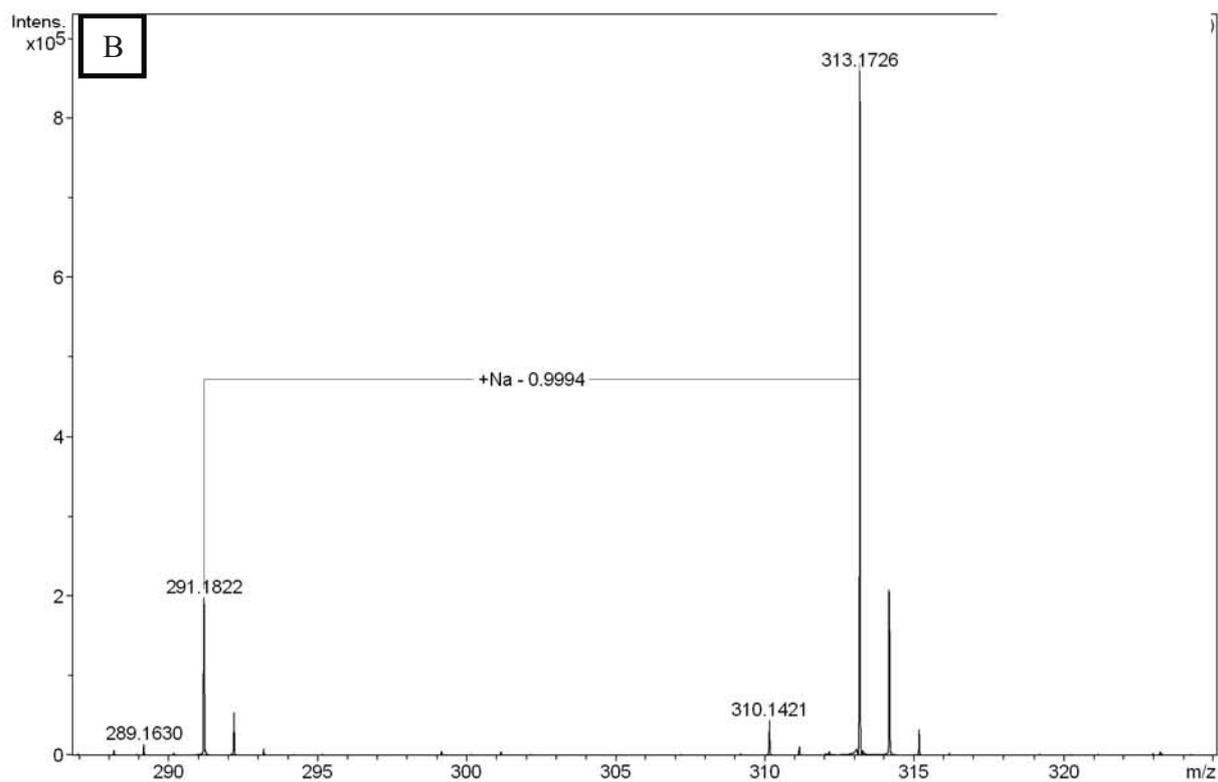
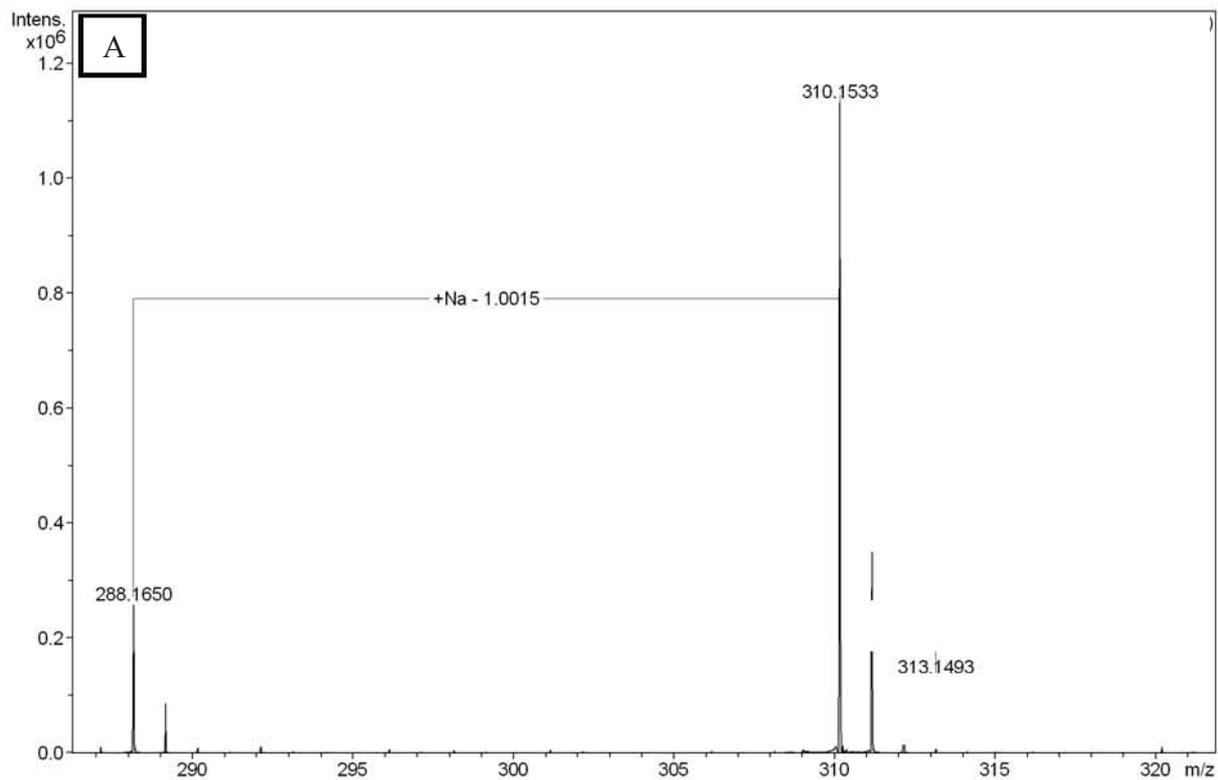


Figure 71 : Spectres de masse de la galanthamine native (A) et deutérée (B) obtenus en LC-HRMS en mode positif $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$.

En tenant compte des détails décrits précédemment, la quantification des deux molécules deutérées a été effectuée dans les extraits de bulbilles et de leur milieu de culture. Les résultats sont représentés dans la figure 72.

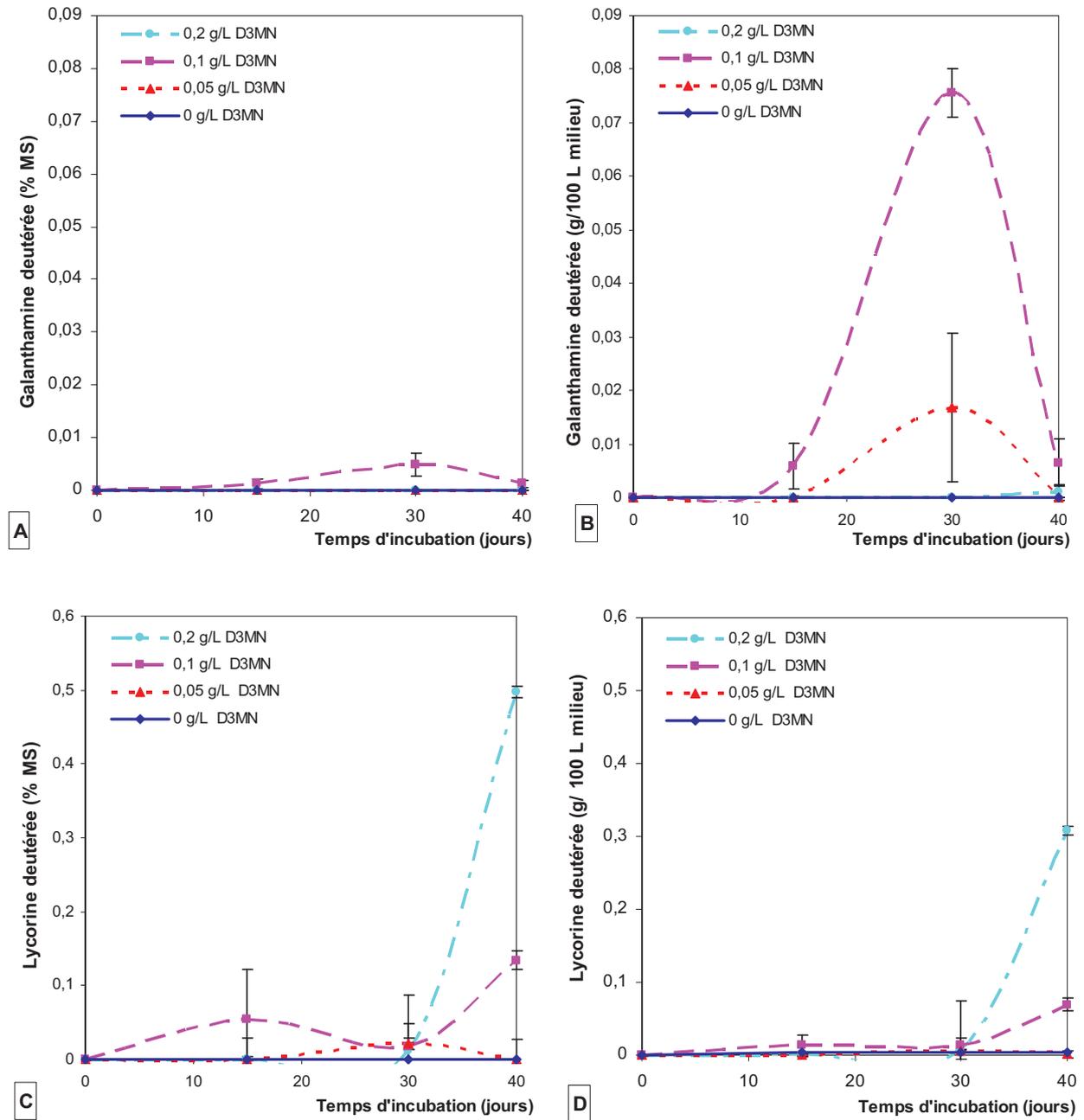


Figure 72 : Pourcentages de galanthamine et de lycorine deutérées dans les extraits de bulbilles *in vitro* et de leur milieu de culture en fonction des concentrations de D3MN.

Les courbes ci-contre, montrent des réponses de l'accumulation des molécules deutérées qui sont significatives et variables en fonction de la concentration du D3MN.

- Concernant la galanthamine deutérée : au bout de **30 jours** d'incubation avec **0,1 g/L** D3MN, une accumulation (**0,0049 ± 0,001 % MS**) est observée dans les extraits de bulbilles *in vitro* (Figure 72A) ; elle est 10 fois plus importante dans le milieu de culture (**0,07 ± 0,01 g/100 L milieu**) (Figure 72B). Ce résultat indique que la galanthamine deutérée est directement relarguée dans le milieu de culture après sa synthèse dans les tissus. Cette accumulation maximale, diminue après 30 jours de culture dans le milieu de culture et dans les bulbilles. Seules quelques traces de galanthamine deutérée ont été détectées aux jours 15 et 40. Les deux autres concentrations de D3MN ont montré un effet moins remarquable.

- Quant à la lycorine deutérée : elle apparaît à partir de 30 jours de culture en présence de 0,2 g/L de précurseur. Les teneurs trouvées dans les tissus sont comparables à celles relarguées dans le milieu. Le seuil maximal d'accumulation n'a pas été atteint, les cultures ayant été arrêtées au jour 40 à cause de l'insuffisance du milieu de culture liquide. Les teneurs optimales obtenues, après **40 jours** d'incubation avec **0,2 g/L** de D3MN, sont égales à **0,5 % MS** (Figure 72C) et **0,3 g/100 L de milieu** de culture (Figure 72D). La concentration moyenne de D3MN (0,1 g/L) a montré, au bout de 15 jours d'incubation, un effet moins significatif comparativement au résultat précédent.

En comparant les pourcentages des deux molécules deutérées, on remarque que l'accumulation de la lycorine deutérée est 10 fois plus importante que celle de la galanthamine deutérée. Cependant, on observe aussi que la synthèse de l'une se fait au détriment de l'autre. Ce phénomène peut être lié aux deux modes de couplage oxydophénolique, *ortho-para'* donnant lieu à la galanthamine, et *para-ortho'* conduisant à la lycorine. Les deux voies de synthèse semblent être compétitives en fonction de la concentration du D3MN appliquée.

c. Influence de l'ajout de la 4'-O-méthyl-d₃-norbélladine sur l'accumulation de la galanthamine et de la lycorine natives

Notre objectif est de rechercher un éventuel effet inducteur de la synthèse des alcaloïdes des Amaryllidaceae, par l'ajout d'un précurseur de biosynthèse. Pour cela, nous avons quantifié la galanthamine et la lycorine natives dans les extraits de bulbilles *in vitro* et de leur milieu de culture traités par le précurseur deutéré. Les résultats de quantification sont illustrés dans la figure 73.

Dans la figure 73, on remarque que les teneurs en galanthamine et en lycorine natives augmentent à partir du jour 30 dans les tissus contrôles cultivés en l'absence de précurseur marqué (Figure 73AC). Le relargage des deux molécules dans le milieu de culture s'est réalisé en parallèle à leur synthèse (Figure 73BD).

- Concernant l'accumulation de la galanthamine native : en présence du précurseur marqué, on remarque que la synthèse de la galanthamine native a été stimulée. Le pourcentage de galanthamine native a atteint un optimum ($0,16 \pm 0,01$ % MS) au jour 15 de subculture avec 0,1 g/L de précurseur (Figure 73A). Les concentrations 0,05 et 0,2 g/L ont montré un effet moins remarquable. Le relargage de la galanthamine dans le milieu de culture a eu lieu parallèlement à sa synthèse. La concentration 0,1 g/L de D3MN a favorisé le relargage dans le milieu liquide ($0,16 \pm 0,03$ g/100 L milieu) (Figure 73B). On en conclut que **15 jours** d'incubation avec **0,1 g/L** de D3MN constituent les conditions de culture efficaces qui ont conduit, à l'obtention de **0,15 %** en plus de galanthamine dans les tissus *in vitro* (0,16 % MS), et **0,16 %** en plus de galanthamine relarguée dans le milieu (0,16 g/100 L milieu) comparativement au témoin (0,004 % MS ; 0,0004 g/100 L milieu).

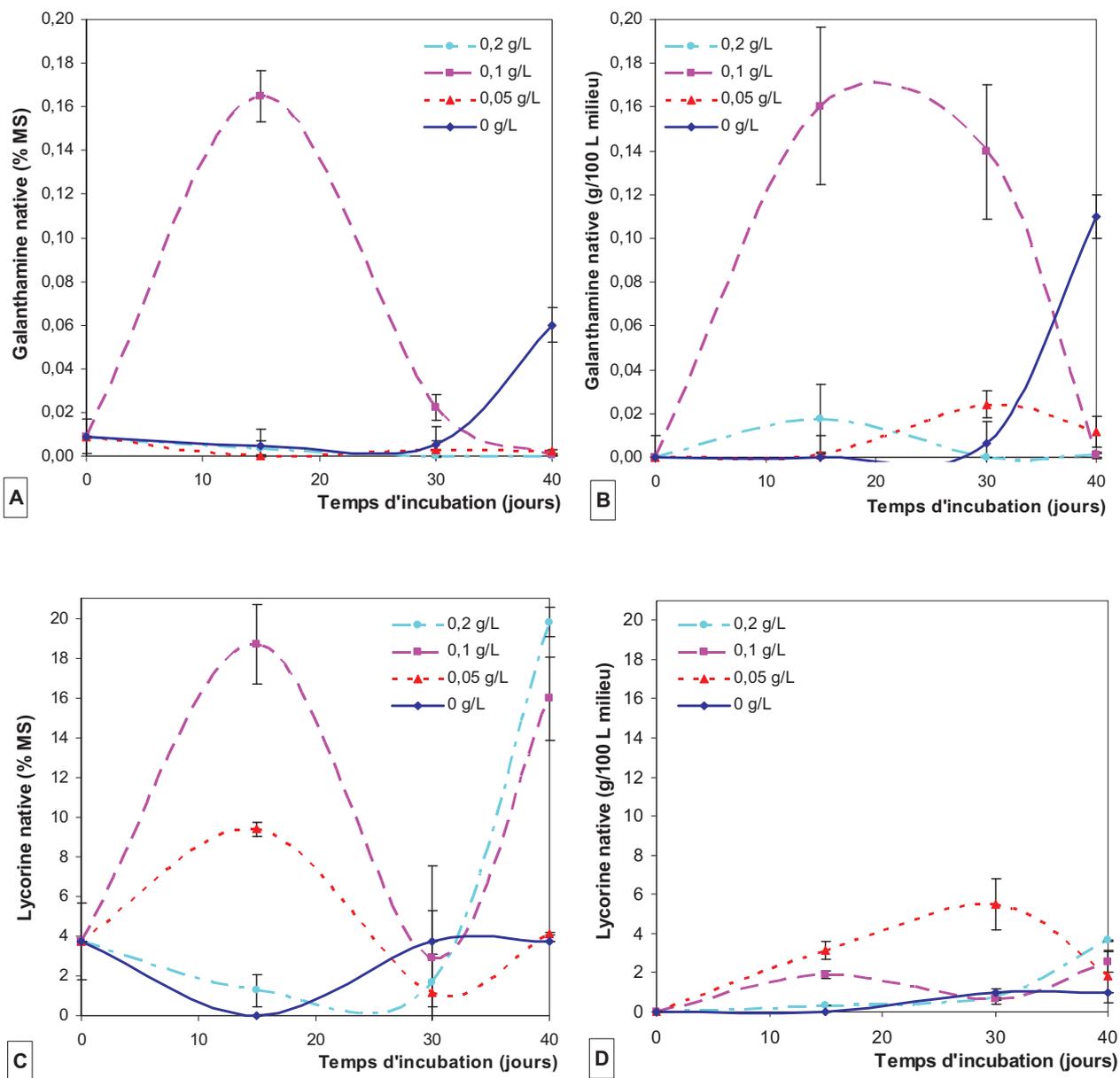


Figure 73 : Pourcentages de galanthamine et de lycorine natives détectées dans les extraits de bulbilles *in vitro* et de leur milieu de culture en fonction des concentrations de D3MN.

- Quant à l'accumulation de la lycorine native : en présence du précurseur marqué, on observe une accumulation optimale en lycorine native au bout de 15 jours d'incubation en présence de 0,1 g/L de précurseur ($18,7 \pm 2$ % MS), et au bout de 40 jours en présence de 0,2 g/L ($19,8 \pm 1$ % MS) (Figure 73C). Le relargage dans le milieu de culture est parallèle à l'accumulation dans les tissus (Figure 73D). Par contre au jour 30 de culture, on observe une baisse de synthèse dans les tissus (2 ± 1 % MS). Le relargage de la lycorine native dans le milieu de culture est maximal aux jours 15 et 30 de culture ($5,5 \pm 1$ g/100 L milieu) avec une concentration de 0,05 g/L de D3MN, et au jour 40 ($3,6$ g/100 L milieu) avec l'ajout de 0,2 g/L de précurseur (Figure 73CD). Au jour 30 de culture avec 0,05 g/L de D3MN, le pourcentage de la lycorine native ($5,5 \pm 1$ g/100 L milieu) dans le milieu de culture est plus élevé que celui des milieux de culture témoins ($0,97$ g/100 L milieu). On en conclut que **15 jours** d'incubation avec **0,1 g/L** de D3MN et **40 jours** d'incubation avec **0,2 g/L** de D3MN constituent les conditions de culture efficaces qui ont conduit à l'obtention de **15 à 19 %** en plus de lycorine dans les tissus *in vitro* (18 ± 1 % MS), et **2 %** en plus de lycorine relarguée dans le milieu (2 ± 1 g/100 L milieu) comparativement au témoin ($2 \cdot 10^{-5}$ % MS ; 0,005 g/100 L milieu).

En comparant les cultures en présence et en l'absence du précurseur, on remarque que la synthèse se fait durant les 15 premiers jours de culture en présence de 0,1 g/L du précurseur, alors qu'en l'absence du précurseur cette synthèse a lieu après 30 jours de subculture. Cet effet stimulateur de synthèse en terme de quantité de relargage, et en terme de durée de culture nécessaire pour atteindre une quantité optimale, est observé en présence de 0,1 g/L de D3MN. Ce dernier présente un double effet, d'une part précurseur de biosynthèse des alcaloïdes des Amaryllidaceae, et d'autre part éliciteur de la synthèse de la galanthamine et de la lycorine natives.

4. Conclusion partielle

En ce qui concerne l'effet de l'ajout du précurseur sur la croissance des bulbilles, on remarque entre 15 et 30 jours une chute importante de biomasse en présence des trois concentrations de D3MN. Cette chute est suivie après 30 jours de subculture, par une augmentation rapide de la croissance.

Ensuite, nous avons démontré que la synthèse de la galanthamine est décalée dans le temps de la synthèse de la lycorine. Ce phénomène peut être lié aux deux modes de couplage oxydo-phénolique, *ortho-para'* donnant lieu à la galanthamine, et *para-ortho'* conduisant à la lycorine. Les deux voies de synthèse semblent être compétitives en fonction de la concentration du D3MN. Il est à noter que l'incorporation du précurseur dans la voie de biosynthèse et sa métabolisation sont dépendantes du type du couplage oxydo-phénolique. De ce fait, on détecte des alcaloïdes dérivés avec deux ou trois atomes de deutérium selon le mode du couplage *para-ortho'* ou *ortho-para'*.

- Concernant l'accumulation de la galanthamine native, une durée d'incubation de 15 jours avec 0,1 g/L de D3MN a conduit à l'obtention de 0,15 % en plus de galanthamine dans les tissus *in vitro* (0,16 % MS), et 0,16 % en plus de galanthamine relarguée dans le milieu (0,16 g/100 L milieu) comparativement au témoin (0,004 % MS ; 0,0004 g/100 L milieu).

- Quant à l'accumulation de la lycorine native, des durées d'incubation de 15 jours avec 0,1 g/L de D3MN et de 40 jours avec 0,2 g/L de D3MN, ont conduit à l'obtention de 15 à 19 % en plus de lycorine dans les tissus *in vitro* (18 ± 1 % MS), et 2 % en plus de lycorine relarguée dans le milieu (2 ± 1 g/100 L milieu) comparativement au témoin ($2 \cdot 10^{-5}$ % MS ; 0,005 g/100 L milieu).

- La galanthamine deutérée apparaît au bout de 30 jours d'incubation avec 0,1 g/L D3MN, son accumulation ($0,005 \pm 0,001$ % MS) est observée dans les extraits de bulbilles *in vitro*, qui est 10 fois plus importante dans le milieu de culture ($0,07 \pm 0,01$ g/100 L milieu).

- Les teneurs optimales de lycorine deutérées sont obtenues après 40 jours d'incubation avec 0,2 g/L de D3MN. Ces teneurs sont égales à 0,5 % MS, et 0,3 g/100 L de milieu de culture.

Les teneurs en galanthamine native (0,16 % MS) sont 2 fois plus élevées que les teneurs en galanthamine deutérée (0,08 % MS). La lycorine native a été détectée avec des teneurs (18

% MS) qui sont 60 fois plus élevées que les teneurs de la lycorine deutérée (0,3 % MS). Le précurseur D3MN présente donc un double effet. Il s'agit d'une part, d'un précurseur commun de biosynthèse des alcaloïdes des Amaryllidaceae, et d'autre part, d'un éliciteur de la synthèse de la galanthamine et de la lycorine natives. Ce double effet du précurseur deutéré, s'explique par la stimulation de la cellule à métaboliser son propre précurseur présent à l'état natif dans les tissus, et à s'incorporer lui-même dans la voie de biosynthèse. Ce mécanisme permet entre 0 et 30 jours de culture, une synthèse des molécules natives et, entre 15 et 40 jours de culture, une synthèse des molécules deutérées. De ce fait, l'accumulation de la galanthamine ou de la lycorine est dépendante de la concentration du D3MN ajoutée et de la durée d'incubation.

Les alcaloïdes accumulés suite à l'ajout du précurseur, sont instables au cours du temps. On observe souvent une chute de la teneur en alcaloïdes après leur accumulation maximale. Ce phénomène peut être expliqué par leur dégradation, ou leur transformation suite aux réactions spontanées ou réversibles, c'est le cas notamment de la galanthamine qui se transforme réversiblement en narwédine.

Les accumulations maximales en alcaloïdes aux jours 15 et 30 dans les tissus et surtout dans les milieux liquides, peuvent être impliquées dans la diminution inattendue de la croissance cellulaire remarquée pendant ces jours de culture. Les alcaloïdes sont des métabolites secondaires, toxiques pour la plante elle-même, une fois libérés à l'extérieur des vacuoles.

D - Effet de l'ajout de l'isovanilline-d₃ (3-hydroxy-4-méthoxy-d₃-benzaldéhyde) aux cultures *in vitro* de *L. aestivum*

L'isovanilline-d₃ (D3ISO) est le précurseur de synthèse de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine, elle-même le précurseur commun de biosynthèse des alcaloïdes des Amaryllidaceae. Il est probable que l'isovanilline soit également le précurseur naturel de la 4'-O-méthyl-norbelladine endogène, cependant cette hypothèse n'a pas été confirmée dans la littérature. Dans la partie précédente nous avons démontré que la 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine s'est incorporée dans la voie de biosynthèse et a conduit à l'obtention d'alcaloïdes deutérés, et à la stimulation de l'accumulation de la galanthamine et de la lycorine natives. Le D3ISO a été ajouté aux cultures *in vitro* de *L. aestivum* selon le protocole décrit dans la figure 74.

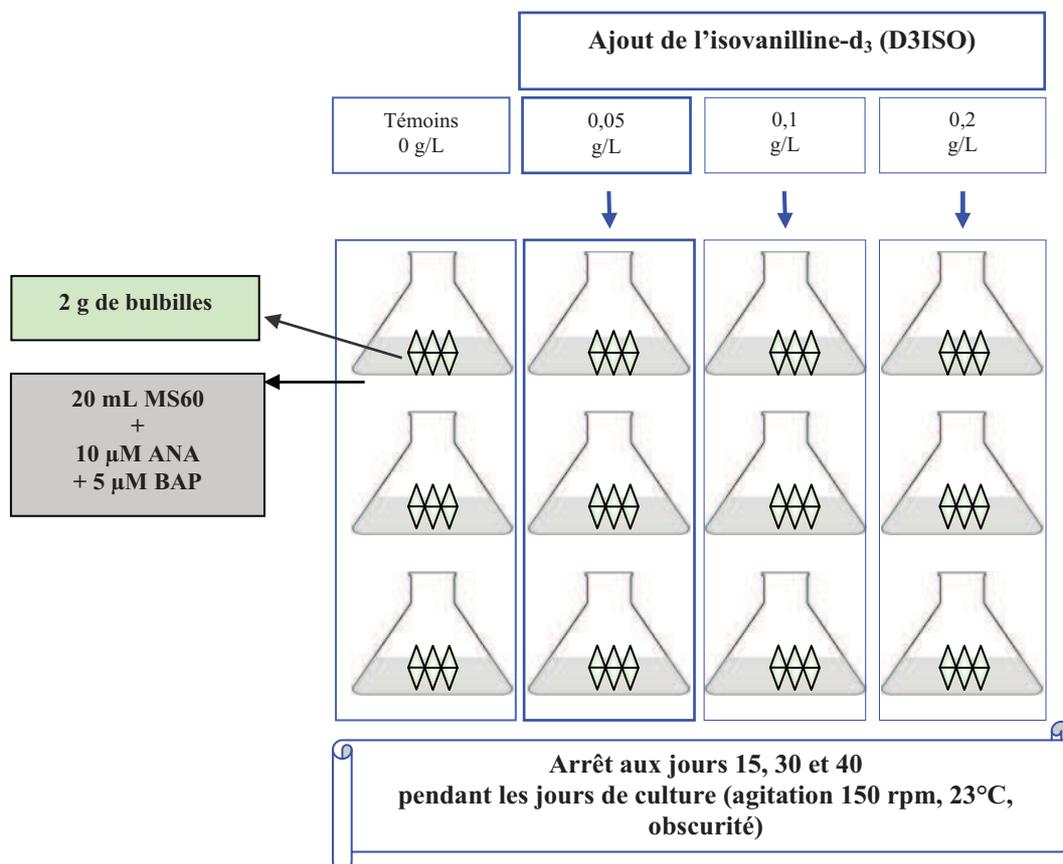


Figure 74 : Protocole expérimental de l'ajout de l'isovanilline deutérée aux cultures *in vitro* de bulbilles de *L. aestivum*.

Il s'agit du même protocole et des mêmes conditions de culture utilisés dans l'étude de la biotransformation du D3MN. L'objectif de cette étude, est de comparer l'effet de l'ajout de l'isovanilline-d₃ aux milieux de culture des bulbilles *in vitro* aux résultats de la biotransformation du D3MN. Pour cela, trois paramètres ont été étudiés :

- l'impact de l'ajout du D3ISO sur la croissance des bulbilles *in vitro*,
- l'incorporation du D3ISO dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes,
- l'incidence sur la teneur en galanthamine et en lycorine natives et deutérées.

1. Impact de l'isovanilline-d₃ (D3ISO) sur la croissance des bulbilles *in vitro*

A la fin du cycle de culture, les milieux de culture ont été récupérés. Les bulbilles *in vitro* ont été rincés trois fois successivement à l'eau stérile afin d'éliminer toute trace de D3ISO adhérente sur la membrane cellulaire. La cinétique de croissance a été évaluée en comparant la masse fraîche en fin de culture à la masse fraîche à l'inoculum. Le taux a été mesuré selon la formule $(MF_f - MF_i)/MF_i$. Ensuite les bulbilles et leur milieu de culture ont été congelés en vue de réaliser les analyses GCMS. L'éventuelle toxicité du précurseur vis-à-vis des cellules a été étudiée. Les résultats des cinétiques de croissance sont illustrés dans la figure 75.

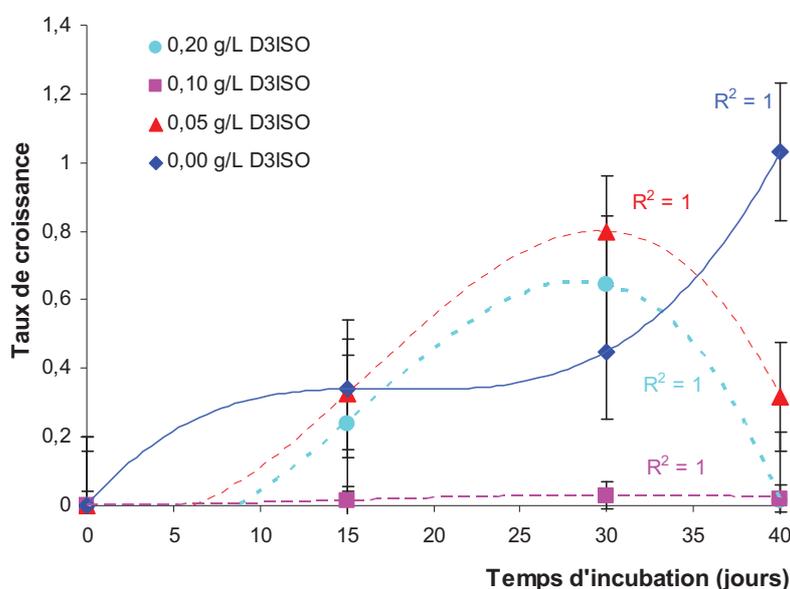


Figure 75 : Effet de l'ajout de l'isovanilline-d₃ (D3ISO) sur la croissance des bulbilles *in vitro* de *Leucojum aestivum* L., après 15, 30 et 40 jours de culture avec 0,05 ; 0,1 et 0,2 g/L de D3ISO.

La croissance des bulbilles *in vitro* a été évaluée en fonction de la concentration du D3ISO ajoutée aux milieux de culture liquides (0 ; 0,05 ; 0,1 et 0,2 g/L) et en fonction du temps d'incubation (15, 30 et 40 jours).

Dans la figure 75 on observe, qu'en absence du D3ISO, les bulbilles contrôles ont montré une cinétique de croissance lente, pendant les 30 premiers jours de culture. Après 30 jours de culture en milieu liquide, les bulbilles ont tendance à croître rapidement, la croissance devient exponentielle. Le taux de croissance contrôle a augmenté de 0,4 à 1, pendant les dix derniers jours de culture (30 à 40 j). Cette cinétique de croissance contrôle est similaire à celle des bulbilles témoins utilisés précédemment lors de l'étude du D3MN.

En présence de 0,05 et 0,2 g/L de D3ISO, on remarque que la croissance des bulbilles *in vitro* augmente de 10 à 30 jours de culture d'un facteur égal à $0,8 \pm 0,2$. Pour cette croissance maximale au jour 30 diminue brusquement entre 30 et 40 jours de culture. On remarque dans les Erlenmeyers un noircissement et une décomposition des bulbilles dans leur milieu de culture (Figure 76).

Il est à noter que l'ajout de 0,1 g/L de D3ISO n'a pas été favorable à la croissance des bulbilles *in vitro*. En effet, la croissance des bulbilles *in vitro* a été inhibée pendant toute la durée d'incubation.

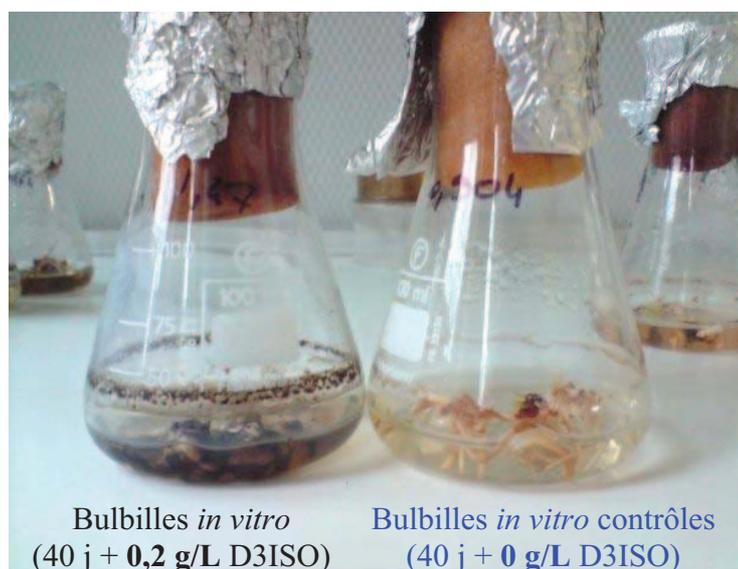


Figure 76: Aspects des bulbilles *in vitro* cultivées pendant 40 jours de culture en absence d'isovanilline-d₃ (D3ISO) et en présence de 0,2 g/L de D3ISO.

Tous ces résultats montrent un effet nocif de ce précurseur deutéré pour les cultures de bulbilles. La cause peut être due à la présence du D3ISO, ou à l'accumulation des alcaloïdes suite à l'ajout du précurseur. Afin de répondre à ces hypothèses, nous avons eu recours aux analyses phytochimiques par GCMS pour un criblage des divers alcaloïdes, et pour la quantification de la galanthamine et de la lycorine natives et deutérées.

2. Incorporation de l'isovanilline-d₃ (D3ISO) dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes

Comme pour l'étude du D3MN, l'ajout du D3ISO, aux trois concentrations testées (0,05 ; 0,1 ; et 0,2 g/L), aux cultures de bulbilles *in vitro*, a été étudié pendant 40 jours de culture. Les extraits de bulbilles et leurs milieux de culture ont été analysés en parallèle afin de déterminer les teneurs en alcaloïdes et leur éventuel relargage dans le milieu de culture.

Les résultats obtenus par GCMS, du criblage qualitatif des alcaloïdes dans les extraits des bulbilles *in vitro* et de leurs milieux de culture, incubés pendant 40 jours avec les trois concentrations de D3ISO, sont présentés dans le tableau 18. Seuls quelques alcaloïdes natifs ont été identifiés dans les extraits de bulbilles. La trisphéridine, la lycorine, la galanthamine, la déméthylnarwédine, la déméthylmarithidine et l'anhydrolycorine ont été détectés (Tableau 18). On note l'absence d'alcaloïdes dans les milieux de culture. Il est à noter qu'aucun alcaloïde deutéré n'a été détecté.

L'absence d'alcaloïdes dans le milieu de culture indique que le relargage n'a pas eu lieu pendant l'incubation des bulbilles *in vitro* avec le D3ISO. L'absence d'alcaloïdes deutérés dans les extraits de bulbilles *in vitro* et de leurs milieux de culture signifie que l'isovanilline-d₃ n'a pas été métabolisée contrairement à son produit de synthèse, la 4'-O-méthyl-d₃-norbélladine. Nous rappelons que l'isovanilline-d₃ représente le précurseur de synthèse chimique de la 4'-O-méthyl-d₃-norbélladine. L'isovanilline est probablement un précurseur naturel de la 4'-O-méthyl-norbélladine, cependant la molécule deutérée n'a pas été reconnue comme substrat pour les enzymes de la plante.

Tableau 18 : Criblage par GCMS des alcaloïdes natifs et deutérés dans les extraits de bulbilles *in vitro* et de leur milieu de culture incubés en présence de l'isovanilline-d₃ (D3ISO). NAR : narvédine, GAL : galanthamine, LYC : lycorine, CRI : crinine, TRIS : trispéthridine, MAR : marthidine. (+/- : présence ou absence d'alcaloïdes natifs ; D2/D3 : présence d'alcaloïdes deutérés avec 2 ou 3 atomes de deutérium).

	NAR	N-déméthyl GAL	GAL	NAR	N-formyl norGAL	LYC	Anhydro LYC	CRI	TRIS	Déméthyl MAR
Masses moléculaires [M+]	271	273	287	285	301	287	251	271	223	273
[MD2+]	-	-	-	-	-	289	253	273	225	-
[MD3+]	274	276	290	288	304	-	-	-	-	276
J 15										
Bulbilles contrôles Milieu de culture	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
Bulbilles + 0,05 g/L D3ISO Milieu de culture	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Bulbilles + 0,1 g/L D3ISO Milieu de culture	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Bulbilles + 0,2 g/L D3ISO Milieu de culture	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
J 30										
Bulbilles contrôles Milieu de culture	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
Bulbilles + 0,05 g/L D3ISO Milieu de culture	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Bulbilles + 0,1 g/L D3ISO Milieu de culture	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bulbilles + 0,2 g/L D3ISO Milieu de culture	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-

Précédemment, nous avons démontré que divers agents exogènes, comme le MeJa, les régulateurs d'éthylène, et le précurseur biogénétique (D3MN), ont significativement influencé la diversité des alcaloïdes chez *L. aestivum*. Ce n'est pas le cas pour ce précurseur plus en amont de la voie de biosynthèse.

Dans les bulbilles *in vitro* contrôles, seules la lycorine, la déméthylmarithidine et la galanthamine ont été détectées. Dans le tableau 18, on remarque une variabilité des alcaloïdes en fonction des concentrations du D3ISO (0,05 ; 0,1 ; 0,2 g/L) et de la durée d'incubation (15, 30 et 40 j). La diversité la plus élevée a été notée dans les extraits de bulbilles cultivés en présence de **0,2 g/L** de D3ISO durant **15 et 30** jours d'incubation. Dans ces conditions, **trois** alcaloïdes ont été identifiés, la lycorine, la galanthamine, et l'anhydrolycorine. Les autres concentrations de D3ISO semblent être moins efficaces vis-à-vis de la diversité des alcaloïdes.

La galanthamine est présente dans les extraits des bulbilles cultivés pendant **15** jours avec **0,1 g/L** et **0,2 g/L** D3ISO. Il s'agit des conditions uniques qui ont conduit à la détection de cet alcaloïde, celui-ci n'a pas été retrouvé à 30 jours ni à 40 jours quelque soit la concentration de D3ISO appliquée (Tableau 18). La lycorine a souvent été détectée, sauf dans les extraits des bulbilles cultivés pendant 30 jours en présence de 0,1 g/L D3ISO, et pendant 40 jours en présence de 0,05 g/L D3ISO (Tableau 18).

La diversité des alcaloïdes est variable d'un tissu cultivé à un autre, et d'une condition de culture à l'autre. Il est important de noter que les résultats sont issus des répétitions de plusieurs cultures et représentent la moyenne de 6 bulbilles *in vitro* au moins pour chacune des conditions testées. L'anhydrolycorine et la trisphéridine par exemple, n'ont jamais été détectées dans les extraits de bulbilles cultivés en présence de la 4'-*O*-méthyl-d₃-norbelladine. De même, ces deux alcaloïdes n'ont pas été détectés dans les bulbilles contrôles. Cependant, dans cette étude, on note la présence unique de la trisphéridine dans les extraits des bulbilles *in vitro* cultivés pendant 30 jours en présence de 0,05 g/L D3ISO. L'anhydrolycorine a été détectée dans les extraits des bulbilles cultivés en présence de 0,2 g/L pendant 15 et 30 jours d'incubation. La déméthylnarwédine a été détectée dans une condition unique, à 30 jours de culture en présence de 0,2 g/L D3ISO.

On en conclut que certains alcaloïdes ne sont pas présents dans les bulbes contrôles, mais en présence de D3ISO leur présence a été remarquée. En général, la concentration **0,2 g/L** D3ISO a conduit à la plus grande diversité des alcaloïdes après **15 et 30** jours de contact avec les bulbilles *in vitro*.

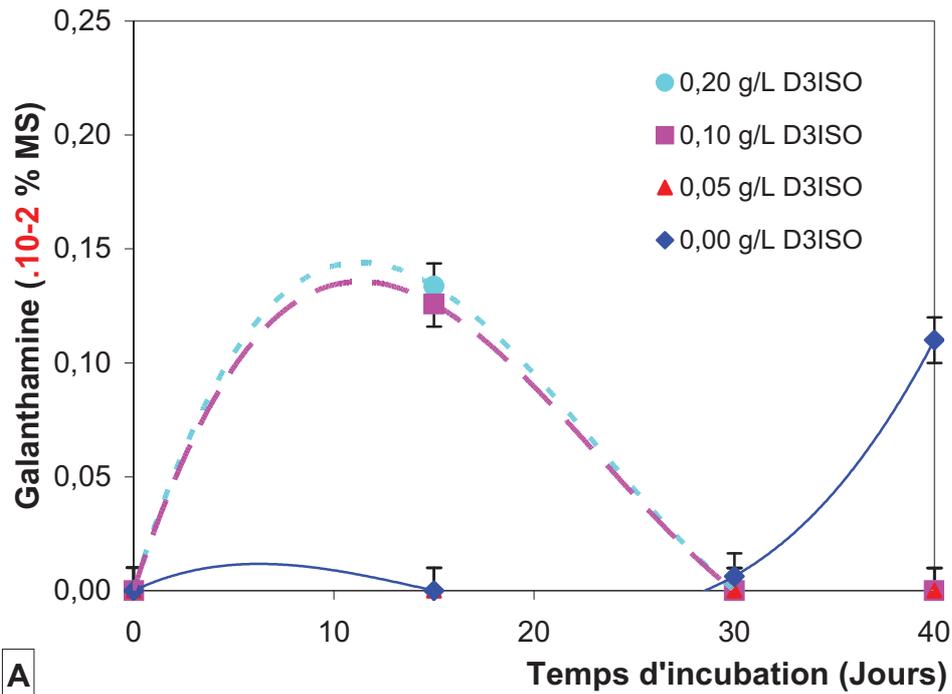
3. Incidence de l'ajout de l'isovanilline-d₃ (D3ISO) sur les teneurs en galanthamine et en lycorine

Nous tenons compte de l'absence des alcaloïdes deutérés, observée lors du criblage précédent par GCMS. Dans l'objectif d'étudier l'influence de l'ajout de ce précurseur exogène sur l'accumulation de la galanthamine et de la lycorine natives, nous avons quantifié ces deux alcaloïdes par GCMS dans les extraits des bulbilles *in vitro* seulement. Nous rappelons, que lors du criblage phytochimique, aucun alcaloïde n'a été détecté dans les milieux de culture.

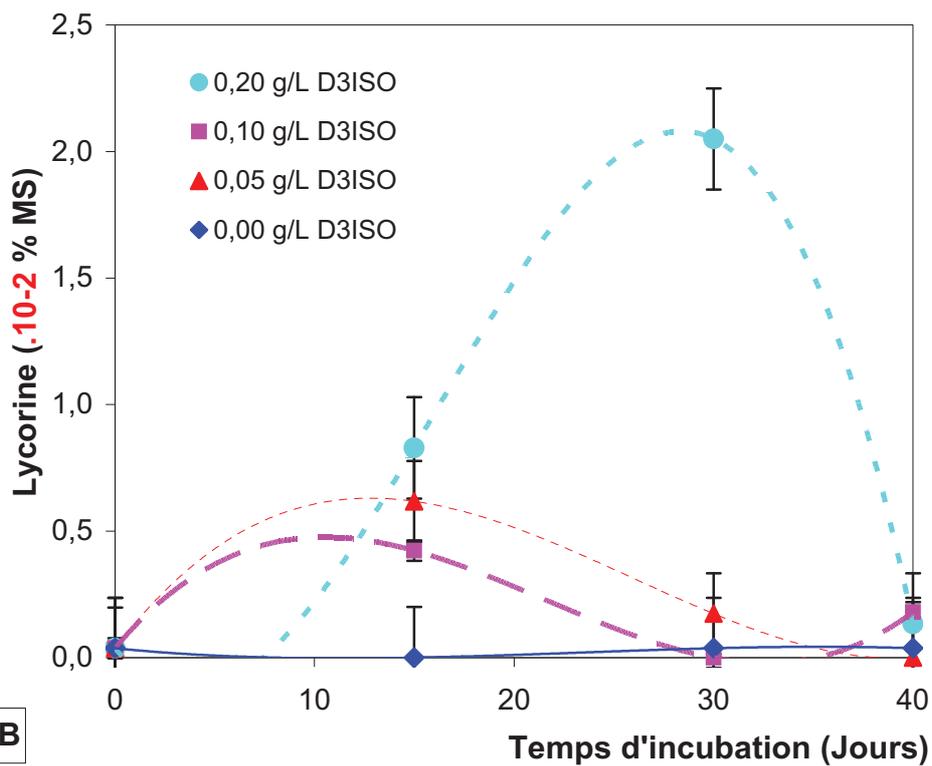
Les résultats de quantification des deux alcaloïdes ont montré des teneurs en lycorine dix fois plus élevées que les teneurs en galanthamine (Figure 77).

Un pourcentage maximal de $0,0013 \pm 0,0005$ % MS de galanthamine, est détecté dans les extraits de bulbilles *in vitro* cultivés pendant 15 jours avec 0,1 et 0,2 g/L D3ISO (Figure 77A). La concentration 0,05 g/L D3ISO n'a pas montré d'effet stimulateur de la synthèse de la galanthamine. Les bulbilles contrôles accumulent de la galanthamine à partir du jour 30 de culture en absence de D3ISO. Au jour 40 on détecte un pourcentage de galanthamine équivalent à 0,0011 % MS en absence de D3ISO. Les pourcentages de galanthamine obtenus en présence de 0,1 et 0,2 g/L D3ISO sont comparables à ceux obtenus dans les bulbes contrôles. L'effet de l'ajout du D3ISO s'est révélé important en terme de vitesse d'accumulation, et moins important en terme de quantité de galanthamine accumulée. En présence de D3ISO on observe une accumulation de galanthamine maximale (0,0013 % MS) au jour 15 de culture, alors qu'en absence de D3ISO une accumulation équivalente (0,001 % MS) s'effectue à partir du jour 30.

Un pourcentage maximal de lycorine ($0,02 \pm 0,01$ % MS) est observé au bout de 30 jours d'incubation des bulbilles *in vitro* avec 0,2 g/L D3ISO (Figure 77B). Dans les bulbilles contrôles seulement quelques traces de lycorine ont été détectées. Les concentrations de 0,05 et 0,1 g/L D3ISO ont montré un effet stimulateur de la synthèse moins remarquable après 15 jours d'incubation. Avec ces deux concentrations les pourcentages de lycorine varient entre 0,004 et 0,006 % MS. L'ajout du D3ISO aux milieux de culture a conduit à l'obtention des pourcentages plus élevés de lycorine comparativement aux bulbilles contrôles (0,00004 % MS).



A



B

Figure 77 : Pourcentages de la galanthamine et de la lycorine natives dans les extraits de bulbilles *in vitro* et de leur milieu de culture en fonction des concentrations diverses de D3ISO.

4. Conclusion partielle

Le criblage des alcaloïdes a montré l'absence d'alcaloïdes deutérés. Ce résultat s'explique par le fait que le D3ISO n'a pas été métabolisé par les tissus végétaux. Toutefois, une influence sur la diversité des alcaloïdes natifs a été observée après 15 et 30 jours de culture avec 0,2 g/L de D3ISO. Certains alcaloïdes n'existant pas dans les bulbilles *in vitro* contrôles, ont été détectés suite à l'ajout du D3ISO.

Les teneurs maximales en alcaloïdes sont atteintes avec 0,0013 % MS de galanthamine, et 0,02 % MS de lycorine. L'accumulation maximale de galanthamine est observée au jour 15 de culture avec 0,1 et 0,2 g/L D3ISO. L'accumulation maximale de lycorine est notée au jour 30 de culture avec 0,2 g/L D3ISO.

La croissance des bulbilles *in vitro* est très lente entre 10 et 15 jours de culture, et maximale au jour 30. Elle diminue brusquement entre 30 et 40 jours de culture avec deux concentrations de D3ISO (0,1 et 0,2 g/L). On remarque dans les Erlenmeyers un noircissement et une décomposition des bulbilles dans leur milieu de culture. À l'issue de notre étude, on remarque qu'en présence de D3ISO l'accumulation des alcaloïdes s'effectue entre 10 et 15 jours ce qui peut expliquer l'effet négatif sur la croissance des bulbilles. Cependant après 30 jours de culture, les teneurs en lycorine sont maximales en présence de 0,2 g/L D3ISO, où la croissance des bulbilles s'est révélée comparable à celle des bulbilles contrôles.

La croissance cellulaire semble dépendante d'autres facteurs. L'ajout du D3ISO a contribué à la diminution de la croissance des bulbilles *in vitro* comparativement à la courbe témoin. Mais, cette contribution reste néanmoins ambiguë, du fait que le nombre des métabolites secondaires est très vaste, et leur criblage par GCMS est limité aux données rapportées dans la littérature et dans la librairie NIST08.LIB.

E - Conclusion du chapitre (El Tahchy *et al.*, Acta Biochim Pol 2010)

La réaction chimique donnant lieu aux deux précurseurs deutérés, a été réalisée en deux étapes. La première étape vise à l'obtention du 3-hydroxy-4-methoxy-d₃-benzaldéhyde (isovanilline-d₃) avec 49 % de rendement. La deuxième étape conduit à l'obtention de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelleadine avec un rendement de 33 %. Nous avons étudié l'effet de l'ajout des deux composés deutérés, sur la croissance des cultures, leur incorporation dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes, et leur incidence sur la teneur en galanthamine et en lycorine.

La biotransformation des précurseurs a été mise en évidence chez les calcs embryogènes et chez les bulbilles *in vitro* de *L. aestivum*, ces derniers constituant un matériel végétal beaucoup plus organisé que les calcs embryogènes. Les calcs embryogènes testés au début du chapitre ont montré de très faibles teneurs en alcaloïdes natifs et deutérés.

L'ajout de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelleadine aux cultures *in vitro* de bulbilles de *L. aestivum* a permis d'acquérir de nouvelles informations concernant la voie de biosynthèse de la galanthamine. On constate d'abord que le précurseur deutéré, commun aux alcaloïdes des Amaryllidaceae, a été incorporé dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes. Sa métabolisation est dépendante du type du couplage oxydo-phénolique La galanthamine est deutérée avec trois atomes de deutérium, et la lycorine avec deux atomes de deutérium. Concernant la galanthamine deutérée, au bout de **30 jours** d'incubation avec **0,1 g/L** D3MN, une accumulation maximale (**0,0049 ± 0,001 % MS**) a été observée dans les extraits de bulbilles *in vitro*. Cette accumulation est 10 fois plus importante dans le milieu de culture (**0,07 ± 0,01 g/100 L milieu**). Quant à la lycorine deutérée, les teneurs optimales obtenues après **40 jours** d'incubation avec **0,2 g/L** de D3MN, sont égales à **0,5 % MS**, et **0,3 g/100 L** de milieu de culture. Concernant l'accumulation de la galanthamine native, une durée d'incubation de **15 jours** avec **0,1 g/L** de D3MN a conduit, à l'obtention de **0,15 %** en plus de galanthamine dans les tissus *in vitro* (0,16 % MS), et **0,16 %** en plus de galanthamine relarguée dans le milieu (0,16 g/100 L milieu) comparativement aux témoins (0,004 % MS ; 0,0004 g/100 L milieu). Les teneurs en galanthamine native (0,15 % MS) sont 2 fois plus élevées que les teneurs en galanthamine deutérée (0,08 % MS). Quant à l'accumulation de la lycorine native, des durées d'incubation de **15 jours** avec **0,1 g/L** de D3MN et de **40 jours** avec **0,2 g/L** de D3MN, ont conduit à l'obtention de **15 à 19 %** en plus de lycorine dans les tissus *in vitro* (18 ± 1 % MS), et **2 %** en plus de lycorine relarguée dans le milieu (2 ± 1 g/100 L milieu) comparativement aux témoins (2.10⁻⁵ % MS; 0,005 g/100 L milieu). Aux jours 15 et 30, les accumulations

maximales de ces alcaloïdes dans les tissus et surtout dans le milieu liquide, peuvent être à l'origine de la diminution de la croissance cellulaire remarquée pendant ces jours de culture. Le précurseur D3MN présente donc un double effet. Il s'agit d'une part d'un précurseur commun de biosynthèse des alcaloïdes des Amaryllidaceae qui est métabolisé par les cellules végétales, et d'autre part il agit comme un éliciteur de la synthèse de la galanthamine et de la lycorine natives.

L'ajout du D3ISO, aux cultures de bulbilles *in vitro* de *L. aestivum*, a été effectué dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment. Le criblage des alcaloïdes a montré l'absence d'alcaloïdes deutérés, ce qui s'explique par l'absence de métabolisation du D3ISO par les cellules végétales. Toutefois, une influence sur la diversité des alcaloïdes natifs a été observée après 15 et 30 jours de culture en présence de 0,2 g/L de D3ISO. Certains alcaloïdes comme l'anhydrolycorine et la trisphéridine, n'existant pas dans les bulbilles *in vitro* témoins, ont été détectés suite à l'ajout du D3ISO. Les teneurs maximales en alcaloïdes détectés sont **0,0013 % MS** de galanthamine, et **0,02 % MS** de lycorine. L'accumulation maximale de galanthamine est observée au **jour 15** de culture avec **0,1 et 0,2 g/L** D3ISO. L'accumulation maximale de lycorine est notée au **jour 30** de culture avec **0,2 g/L** D3ISO. L'ajout du D3ISO a contribué à la diminution de la croissance des bulbilles *in vitro* comparativement à la courbe témoin, laissant suggérer un effet toxique de ce précurseur pour la croissance cellulaire.

En comparant les résultats obtenus à l'issue des deux études, on remarque une grande différence au niveau des teneurs alcaloïdiques. La stimulation de la synthèse de la galanthamine et de la lycorine natives est plus importante en présence du D3MN. Ces résultats s'expliquent par le fait que ce dernier est le précurseur commun des alcaloïdes des Amaryllidaceae. Le D3ISO est soit un précurseur naturel très en amont dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes, soit un composé exogène à la voie de biosynthèse. Dans ce cas, l'effet stimulateur de ce dernier peut être comparé à tout autre effet stressant comme les agents pathogènes.

Chapitre V.

Identification d'une enzyme clé intervenant dans la voie de biosynthèse de la galanthamine

Dans la synthèse bibliographique, nous avons remarqué que la recherche des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes des Amaryllidaceae est, à ce jour, peu étudiés. Nous rappelons, que l'étape clé de la formation de la galanthamine, qui était le couplage phénolique de la 4'-*O*-méthylnorbelladine pour donner une diénone (Figure 78), pouvait être catalysée par des Cytochromes P450 (Eichhorn *et al.*, 1998). Cette hypothèse a été formulée par Eichhorn *et al.*, en référence aux travaux menés par Zenk en 1989 et Kutchan en 1995 sur la biosynthèse des alcaloïdes morphiniques (Zenk MH, 1989 ; Kutchan TM, 1995 ; Ikezawa *et al.*, 2008 ; Gesell *et al.*, 2009). Ils ont montré que le couplage intramoléculaire *para-ortho*' de la (R)-réticuline conduisant à la salutaridine diénone est catalysé par une enzyme à Cytochrome P450, la salutaridine synthétase. Notre objectif est d'identifier une enzyme clé intervenant dans la voie de biosynthèse de la galanthamine en vue de réaliser une synthèse biomimétique de cette dernière (Figure 78).

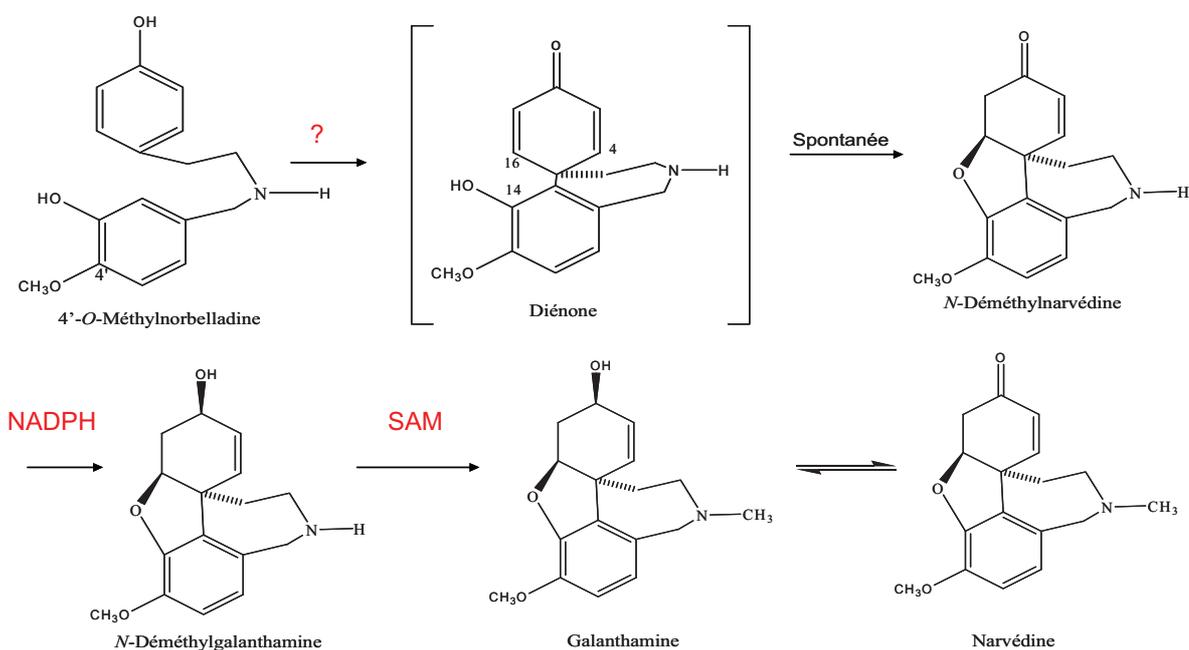


Figure 78 : Voie de biosynthèse de la galanthamine chez *L. aestivum* d'après Eichhorn *et al.*, 1998, et Tadeusz Aniszewski, 2007.

Avant d'initier la recherche des gènes codants pour des cytochromes P450s potentiellement impliqués dans la voie de biosynthèse de la galanthamine nous avons initié des expérimentations préliminaires. Une première étape va donc consister à vérifier que la métabolisation de la 4'-*O*-méthylnorbelladine peut être réalisée en présence de microsomes préparés à partir de bulbes. Lorsque cette étape aura été caractérisée, nous vérifierons l'implication des cytochromes P450s dans la réaction en inhibant la réaction avec des inhibiteurs spécifiques de ces enzymes.

A - Mise en place du protocole d'extraction des microsomes

L'extraction des microsomes à partir de tissus végétaux est, à ce jour, peu étudiée. Seuls quelques travaux ont été rapportés dans la littérature. La difficulté de l'extraction réside dans la grande quantité de matière fraîche nécessaire pour l'obtention des microsomes en quantité suffisante. Nous avons adapté le protocole décrit par Hamerski et Matern, 1988 (Hamerski et Matern, 1988).

2 g de bulbilles *in vitro* ont été découpés en petits morceaux à l'aide d'un scalpel et ont été transférés dans un tube falcon de 50 mL contenant 20 mL de tampon d'extraction composé des éléments suivants :

- Tris HCl 50 mM pH 7,5 ;
- EDTA (Éthylène diamine tétraacétate) 1 mM ;
- Sorbitol 0,6 M ;
- BSA (bœuf sérum albumine) 1 % ;
- β -mercaptoéthanol (BME) 20 mM;
- 40 mM Na-ascorbate.

Le mélange est broyé à l'ultraturax jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène. Ce broyage est intercalé de plusieurs bains de glace afin d'éviter la dégradation des protéines microsomales. La suspension obtenue est ensuite centrifugée pendant 10 min à 10 000 g et sous une température de 4 °C. Après la centrifugation, le culot obtenu est éliminé. Le

surnageant est additionné de 2,5 mL de MgCl₂ (1 mM) nécessaire pour la précipitation des microsomes. Le volume est ensuite complété à 50 mL avec du tampon d'extraction.

Le mélange est laissé sur la glace pendant 30 min, puis centrifugé pendant 20 min à 15 000 g. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et le culot obtenu est solubilisé dans 500 µL du tampon TEG (tétraéthylèneglycol). Celui-ci est constitué des éléments suivants :

- Tris HCl 50 mM pH 7,5 ;
- EDTA 1 mM ;
- Glycérol 30 %.

Suite à ce protocole d'extraction, nous avons obtenu un culot de microsomes très faible. Pour cela, nous avons procédé par une augmentation de la matière fraîche du départ. Le tampon d'extraction a été modifié, ainsi que la vitesse de centrifugation. Ce protocole renferme les étapes suivantes :

Environ 10 g de bulbilles *in vitro* de chacun des genres *Narcissus* et *Galanthus*, âgés de deux ans, ont été découpés en petits morceaux, et ont ensuite été transférés dans deux tubes Falcon de 50 mL contenant chacun 10 mL de tampon préparé selon la composition suivante :

- NaPi 100 mM pH7,
- Saccharose 250 mM,
- BME 10 mM,
- Acide ascorbique 40 mM.

Les deux mélanges ont ensuite été broyés à l'ultraturrax pendant 1 min. Après l'étape de broyage, les suspensions ont été centrifugées pendant 10 min à 30 000 g. Les deux surnageants ont été filtrés et ont été ensuite centrifugés pendant 1 h à 100 000 g chacun. À l'issue de l'étape de centrifugation, les deux culots ont été grattés et solubilisés chacun dans 1 mL de tampon TEG. Les solutions des microsomes sont stockées à – 20 °C jusqu'à leur utilisation. Le protocole a été mis en place et a conduit à l'obtention de 50 µg de microsomes.

B - Mise en place du protocole d'incubation avec le NADPH

L'incubation des microsomes avec un précurseur deutéré, la 4'-*O*-méthyl-d₃-norbelladine, a pour but de localiser la ou les enzymes transformant ce précurseur en dérivés de type galanthamine (Figure 78).

Si la réaction est à Cytochrome P450, l'ajout d'un coenzyme tel que le NADPH à la solution d'incubation nous permet de vérifier s'il s'agit d'une réaction dépendante ou indépendante du NADPH. Pour cela, différents essais ont été mis en place en faisant varier plusieurs paramètres :

- Le temps d'incubation : différents temps d'incubation ont été testés, de 10 min à 30 jours, avec l'ajout de 10 µL de microsomes à chaque arrêt afin de garder stable l'activité des protéines.
- Le pH des solutions d'incubation : il a varié entre le pH 4, et le pH 7. Il a été ajusté à l'aide d'une solution de NaOH (0,5 N) ou d'une solution de H₂SO₄ (0,5 N).
- Présence ou absence du NADPH : pour chaque condition testée, deux séries ont toujours été réalisées. Une série d'échantillons additionnés du NADPH, et une deuxième série d'échantillons privée du NADPH.
- Présence ou absence du précurseur marqué : le précurseur marqué a été ajouté à trois concentrations, 0, 100 et 1000 µM.

-

Le volume final des incubations a varié selon les conditions étudiées. Celui-ci a été compris entre 150 et 300 µL. Pour chaque condition un volume final a été respecté pour l'ensemble des échantillons. Les incubations ont été réalisées à 30 °C sous agitation orbitale de 150 rpm. À chaque arrêt, les incubations arrêtées étaient directement stockées dans un bain de glace, et filtrées sur membrane de 0,22 µm ou à l'aide des filtres (Spin850cap filter 0,22 µm Cellulose Acétate – Interchim). Ces Spins permettent la microfiltration des solutions de faibles volumes (50 à 250 µL) afin d'éliminer les impuretés et les protéines de grosses tailles pouvant obstruer les colonnes chromatographiques lors des analyses par HPLC et LCMS.

C - Résultats de la métabolisation du précurseur par les microsomes

Dans le chapitre précédent nous avons démontré que la 4'-*O*-méthylnorbelladine deutérée a été incorporée dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes des Amaryllidaceae. Sa métabolisation en alcaloïdes deutérés a été observée entre 15 et 30 jours de culture des bulbilles. Pour cette étude, le précurseur était en contact direct avec les microsomes cellulaires. Toutefois, les incubations des microsomes avec leur substrat (D3MN) ont été réalisées sur une durée de 30 jours, en ajoutant après chaque arrêt une quantité de microsomes constantes (10 µL) afin d'éviter la perte de l'éventuelle activité enzymatique, et la dégradation des protéines en question.

Les incubations ont été réalisées avec les microsomes issus des deux genres d'Amaryllidaceae, *Narcissus* et *Galanthus*. À l'issue de chaque incubation, les solutions ont été injectées en chromatographie (HPLC, GCMS et LCMS) après leur filtration.

Dans un premier lieu, nous avons procédé à un criblage des alcaloïdes en fonction des différents paramètres d'incubation (temps d'incubation, pH du milieu, et présence ou absence du NADPH). Les résultats du criblage par GCMS sont résumés dans le tableau 19.

Dans le tableau 19 on remarque que le pH du milieu d'incubation n'a pas montré un effet direct sur la diversité des alcaloïdes. Les réponses sont aléatoires variable quelque soit le pH du milieu en présence et en l'absence du NADPH. La réaction enzymatique semble être indépendante du NADPH.

Tableau 19 : Criblage par GCMS des alcaloïdes natifs et deutérés détectés dans les solutions d'incubation des microsomes selon plusieurs paramètres (Temps d'incubation, pH, et présence et absence du NADPH). GAL : galanthamine, LYC : lycorine, CRI : crinine, TRIS : trisphéridine, MAR : maritidine, D3MN : 4'-O-méthyl-d₃-norbelladine. (+/- : présence ou absence d'alcaloïdes natifs ; D2/D3 : présence d'alcaloïdes deutérés avec 2 ou 3 atomes de deutérium).

Paramètres d'incubation		Alcaloïdes											
Temps d'incubation	Type +/- NADPH	P H	TRIS	CRI	N-déméthylINAR	NAR	FormylnorGAL	N-FormylnorGAL	Anhydro LYC	GAL	LYC	D3MN	
1h	+ NADPH	4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
		5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
		6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	- NADPH	7	-	+	+	D3	-	-	-	-	-	-	-
		4	-	-	+	D3	-	-	-	-	-	-	-
		5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		6	-	-	+	D3	-	-	-	-	-	-	-
3 h	+ NADPH	4	-	-	+	D3	-	-	-	-	-	-	
		5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	- NADPH	7	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
		4	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
		5	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
		6	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
6 h	+ NADPH	7	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	
		4	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	
		5	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	
	- NADPH	6	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
		7	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
		4	-	-	-	-	D3	-	+	-	+	+	+
		5	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+

Seuls deux alcaloïdes deutérés ont été identifiés, il s'agit de la crinine-d₂ et de la *N*-déméthylnarwédine-d₃. Ils ont été détectés entre 1 h et 24 h d'incubation en présence et en l'absence du NADPH et quelque soit le pH du milieu d'incubation (Tableau 19). Après 48 h d'incubation aucun alcaloïde deutéré n'a été détecté, ce qui semble être dû à la dégradation des protéines enzymatiques. La majorité des alcaloïdes natifs, a été détectée après 3 h d'incubation excepté la crinine et la *N*-déméthylnarwédine. Ces derniers ont été détectés à l'état natif après 1 h d'incubation.

On remarque que la présence des alcaloïdes deutérés était accompagnée de l'absence d'alcaloïdes natifs. Par exemple, la crinine deutérée a été détectée en l'absence de sa forme native. Cela explique l'absence de la majorité des alcaloïdes à l'état natif pendant les premières heures d'incubation, lorsque les alcaloïdes deutérés sont majoritairement détectés. Il est probable que les alcaloïdes natifs, existant déjà dans le milieu d'incubation, aient été transformés en d'autres alcaloïdes en présence des microsomes et des complexes enzymatiques. D'où l'absence du D3MN entre 1 et 3 h d'incubation. Celui-ci a été métabolisé en crinine et en *N*-déméthylnarwédine deutérée.

La détection des molécules deutérées avec 2 ou 3 atomes de deutérium est liée aux structures chimiques des alcaloïdes issus des deux types de couplage oxydo-phénolique du précurseur. Et ces résultats sont conformes à ceux que nous avons déjà observés à l'issue de l'étude de biotransformation de ce précurseur dans les bulbilles *in vitro*.

Au cours du criblage par GCMS la détection des alcaloïdes natifs et deutérés a été difficile à réaliser. Les intensités des pics correspondants aux molécules présentées dans le tableau 19 ont été très proches de la limite de détection. Ces résultats restent donc à confirmer.

De ce fait, deux essais ont été réalisés. Le premier consiste à traiter un lot de microsomes avec le monoxyde de carbone, avant l'ajout du substrat (D3MN). Le deuxième essai consiste à l'exposition à la lumière bleue, du lot des microsomes traités avec le CO avant l'ajout du substrat (D3MN). Le traitement avec le monoxyde de carbone vise à inhiber l'activité enzymatique, et la lumière d'excitation bleue permet la réactivation de cette dernière.

Notre objectif est de vérifier s'il s'agit d'une réaction à Cytochrome P450. À l'issue des incubations, les solutions ont été filtrées et injectées en chromatographie liquide (LCMS) afin

de quantifier le D3MN, la galanthamine et la lycorine natives et deutérées. L'évaluation de l'intensité du précurseur dans les différentes solutions d'incubation est présentée dans le tableau 20.

Tableau 20 : Pourcentages relatifs du D3MN dans les solutions d'incubation en présence et en absence du NADPH.

Echantillons		Hauteur du pic ($\cdot 10^5$)	Pourcentage relatif D3MN (%)
Sans microsomes	- NADPH	2,2	81
	+ NADPH	2,4	89
Avec microsomes			
Traités avec le CO + lumière bleue	- NADPH	2,7	100
	+ NADPH	2,6	96
Traités avec le CO - lumière bleue	- NADPH	2,6	96
	+ NADPH	1,8	66

Dans le tableau 20 on observe que le pourcentage relatif du D3MN calculé en LCMS, n'a pas été influencé par les paramètres étudiés. En l'absence des microsomes, les incubations ont été constituées d'un tampon NaPi renfermant le substrat D3MN (10 mM) et additionné ou non du NADPH. Le volume final a été ajusté pour toutes les incubations avec le même tampon NaPi dans le but de pouvoir comparer la variation de la concentration du D3MN.

Les pourcentages ont été compris entre 66 et 100 %. La différence n'a pas été significative. Celle-ci semble être négligeable si on compare l'intensité des pics du D3MN détectés par LCMS dans les échantillons correspondants (Figure 79). L'intensité de ces pics a été comprise entre $1,8 \cdot 10^5$ et $2,7 \cdot 10^5$. L'intensité la plus faible correspond aux incubations des microsomes, traités par le CO et sans être exposés à la lumière bleue, avec le D3MN, en présence du NADPH. Les incubations ont été répétées trois fois pour chacune des conditions testées. Ce résultat paraît contradictoire puisque les microsomes ont été inhibés par le CO, ils ne devraient donc pas métaboliser le précurseur, or 44 % de ce dernier ont été métabolisés. Ce résultat peut être lié à un défaut technique d'inhibition par le CO ou par une perte durant l'expérimentation. En effet, nous avons rencontré des problèmes divers lors des analyses par LCMS. Les échantillons d'incubations sont de faibles volumes (420 μ L), et ils sont constitués d'une solution tampon. La présence des sels de phosphate, de sodium ainsi que d'autres composés peut conduire à la dégradation de la colonne chromatographique. Or la méthode LCMS utilisée a été adaptée pour la séparation des alcaloïdes extraits dans une solution de

méthanol. Il a donc fallu lyophiliser les solutions d'incubation, afin de remplacer la solution tampon par le MeOH. L'étape de lyophilisation pourrait donc conduire à une perte de matière, d'où le pourcentage faible du D3MN (66 %).

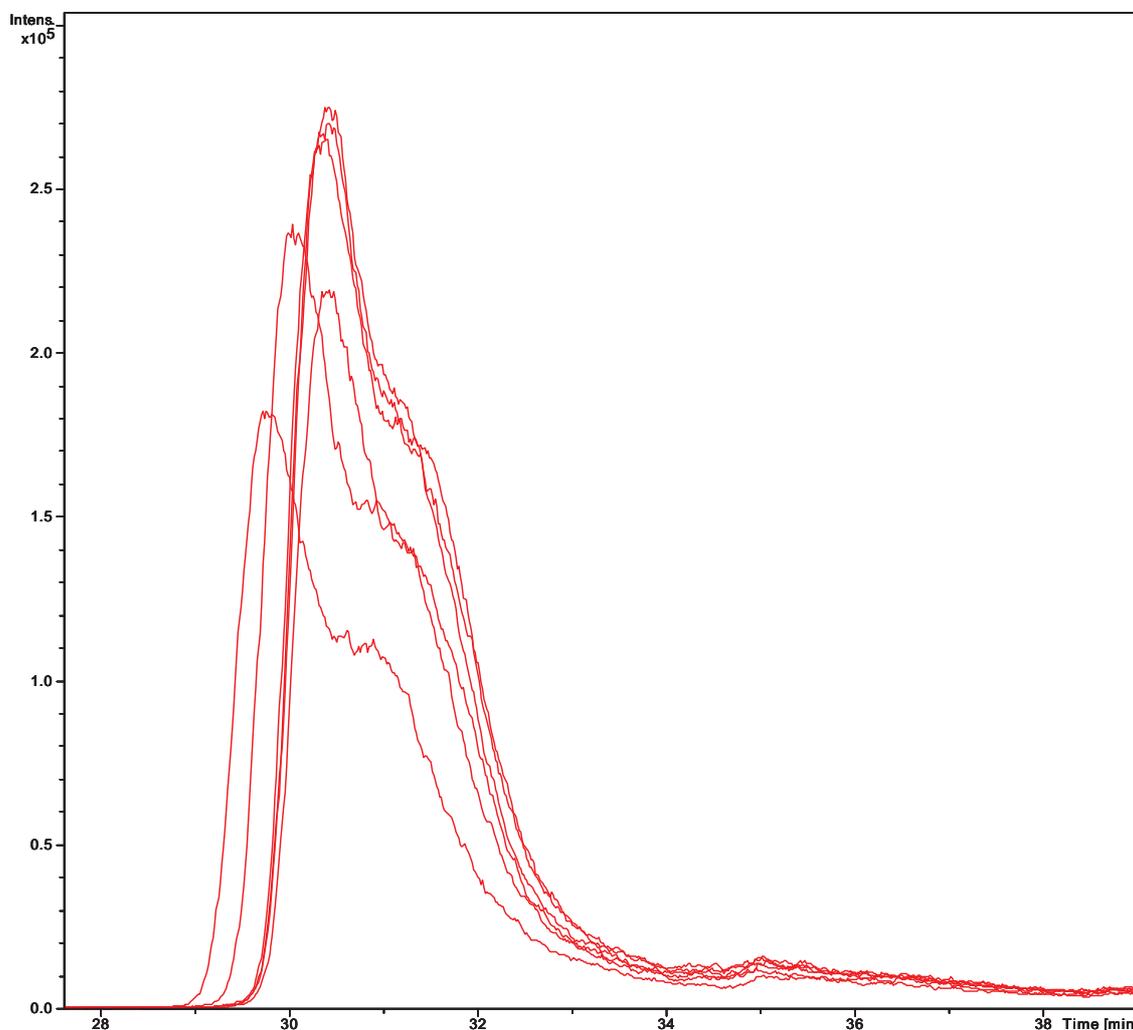


Figure 79 : Chromatogrammes correspondant aux pics du D3MN détectés dans les échantillons analysés en LCMS.

Pour faire face aux problèmes techniques et afin d'éviter la dégradation de la colonne LCMS et les pertes lors de la microfiltration et de la lyophilisation, nous avons eu recours à la chromatographie sur couche mince.

Pour cela, nous avons réalisé des incubations des microsomes nouvellement extraits, avec le substrat (D3MN) en présence ou en l'absence du NADPH. Les incubations ont été maintenues pendant 60 minutes, à 30 °C et sous agitation orbitale de 150 rpm. 10 µL de

microsomes ont été ajoutés chaque 10 min. À l'issue des incubations, les solutions ont été soumises aux ultrasons pendant 15 min pour augmenter le rendement de l'extraction des alcaloïdes à partir des microsomes.

15 µL de chaque échantillon ont été déposés sur la plaque HPTLC. Les témoins du précurseur D3MN, les galanthamines native et deutérée, et la lycorine ont été déposés en volume équivalent (Figure 80). La migration a été réalisée avec deux solvants successifs selon le protocole décrit par Ingkaninan *et al.*, 2000.

- Solvant 1: CHCl₃/MeOH 9:1 (v/v)
- Solvant 2: Acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau 100:11:11:27 (v/v/v/v)

La révélation des taches par le réactif du Dragendorff (Figure 80a) nous a permis de comparer la séparation des alcaloïdes. Dans le but d'analyser les taches par la spectrométrie de masse à l'aide de l'interface CAMAG (Figure 80d), la lecture des plaques a été effectuée, après l'étape de migration, sous fluorescence à 254 nm (Figure 80b), et sous lumière UV à 365 nm (Figure 80c). Les taches ont été entourées et analysées en LCMS.

Dans la figure 80, on observe les taches du précurseur témoin ($R_F = 0,90 \pm 0,05$), de la galanthamine native ($R_F = 0,54 \pm 0,1$) et de la galanthamine deutérée ($R_F = 0,57 \pm 0,1$). Dans les échantillons, on note la présence d'une tache commune. Il faut noter que les solvants de migration utilisés sont adaptés aux extraits alcaloïdiques méthanoliques (Ingkaninan *et al.*, 2000). Or dans notre étude, il s'agit de solutions d'incubation aqueuses. On remarque sur les plaques TLC, après révélation par le Dragendorff (Figure 80a) ou après lecture sous lumière fluorescente ou UV, que les produits n'ont pas migré. Les taches sont concentrées au niveau du dépôt. Grâce au couplage TLC-MS, nous avons pu détecter les galanthamines native et deutérée, le précurseur et la *N*-déméthylarwédine dans certains échantillons. La localisation des taches a été réalisée en se référant aux R_F des standards (Figure 80d). Les résultats sont présentés dans le tableau 21.

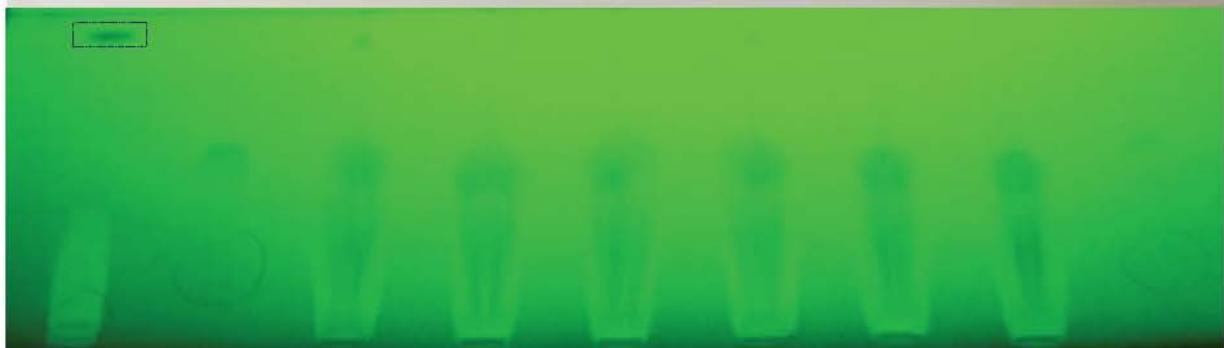
Tableau 21 : Identification par TLC-MS des taches correspondant aux alcaloïdes natifs et deutérés. GAL : galanthamine, LYC : lycorine, GD3 : galanthamine deutérée, LD2 : lycorine deutérée, D3MN : précurseur deutéré, *N*-DMNV : *N*-déméthylarwédine. +/- : absence ou présence des alcaloïdes natifs, LDD : limite de détection, (U) : traitements aux ultrasons.

Echantillons	GAL	GD3	LYC	LD2	D3MN	<i>N</i> -DMNV
1 (U)	+	+	-	-	LDD	-
2 (U)	+	+	-	-	-	+

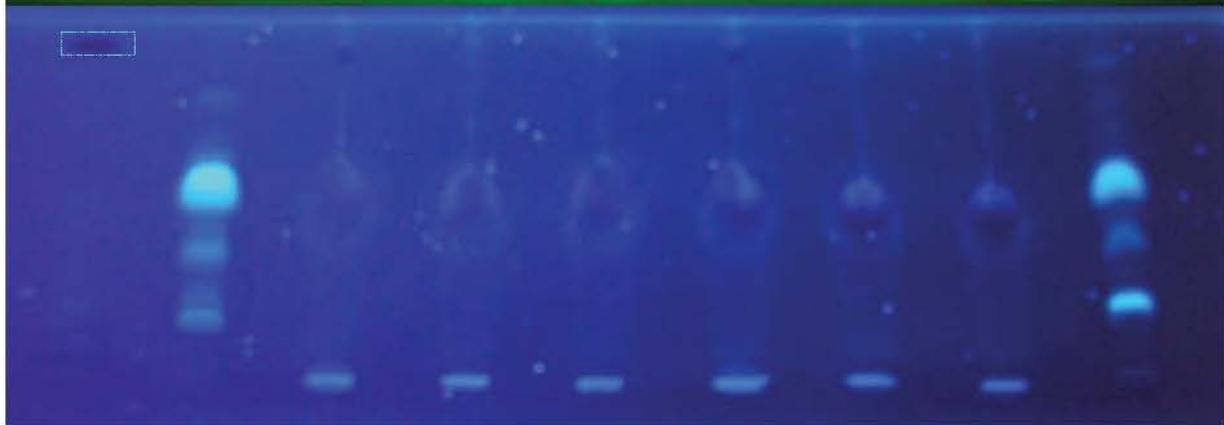
3 (U)	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	LDD	-	-
2	+	+	-	-	-	-	+
D3MN	GAL	- 1(U)	2(U)	3(U)-	1 -	2 -	3 GD3



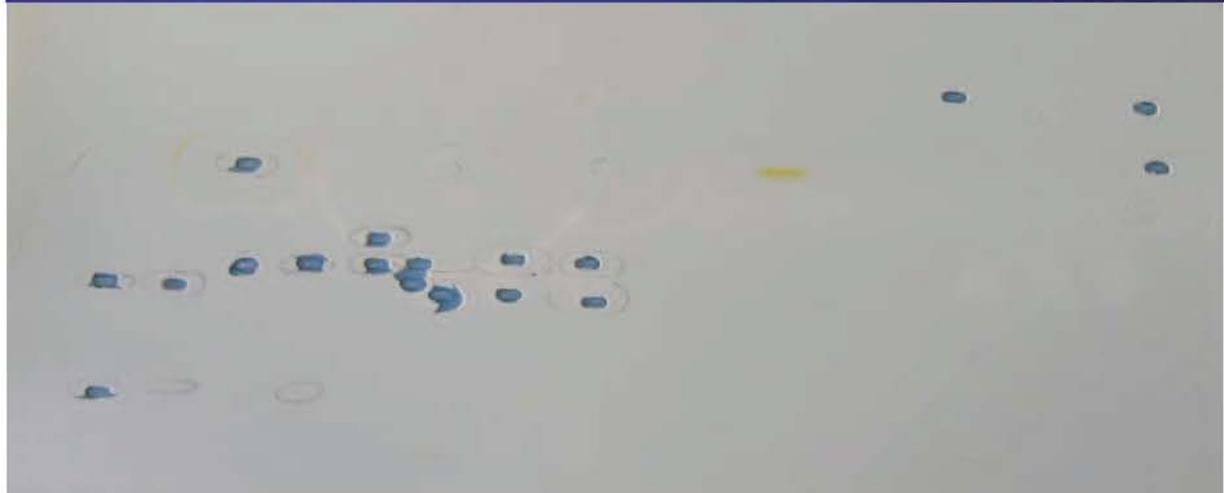
a



b



c



d

Figure 80 : Migration sur plaque TLC des solutions d'incubation des microsomes avec le précurseur deutéré, en présence et en l'absence du NADPH. a) Révélation par le Dragendorff, b) lecture sous lumière fluorescente à 254 nm, c) lecture sous lumière UV à 365 nm, d) taches analysées en LCMS après le couplage avec l'interface CAMAG. 1 : Ajout du NADPH, 2 : absence de NADPH, 3 : microsomes contrôles. (U) : Exposition aux ultrasons.

Dans le tableau 21, on note la présence de galanthamine deutérée dans les échantillons traités aux ultrasons et correspondant aux incubations des microsomes avec le précurseur deutéré en présence et en l'absence du NADPH (échantillons 1(U) et 2(U)). La galanthamine deutérée a aussi été détectée dans les échantillons non traités aux ultrasons, et correspondant à l'incubation des microsomes avec le précurseur seulement en présence du NADPH (échantillon 2). La galanthamine deutérée a été accompagnée de la galanthamine native dans les mêmes solutions d'incubation. On remarque l'absence de lycorines deutérée et native. Le précurseur a été détecté avec une faible intensité dans les échantillons 1(U) seulement. La *N*-déméthylnarwédine est un alcaloïde issu du couplage *para-ortho* et synthétisé en amont de la galanthamine (Figure 78). Cet alcaloïde a été détecté dans les solutions d'incubation des microsomes avec le précurseur et en présence du NADPH (échantillons 2 et 2(U)). On note l'absence d'alcaloïdes dans les échantillons numéro 3. Nous rappelons que ces échantillons correspondent aux incubations des microsomes contrôles ne renfermant pas de précurseur ni de NADPH. La présence des alcaloïdes natifs et deutérés détectés dans les solutions d'incubation, en présence du précurseur, montre que les microsomes sont actifs. L'ajout du précurseur deutéré a activé la voie de biosynthèse d'où l'accumulation de la galanthamine deutérée. La présence des alcaloïdes deutérés peut être expliquée par la présence dans le milieu incubateur d'autres métabolites natifs se transformant réversiblement en d'autres composés alcaloïdiques, c'est notamment le cas de la galanthamine native et de la narwédine. La perte spontanée des groupements organiques peut aussi se produire, ce qui peut conduire à la perte de l'un des atomes deutérium par exemple. Ce phénomène peut être dépendant de la présence des enzymes et du métabolisme énergétique, comme par exemple les enzymes transférases ou méthyltransférases. Il a été démontré que la réaction de métabolisation de la *N*-déméthylnarwédine en norgalanthamine est dépendante du NADPH (Figure 81). Cependant, la nature des réactions chimiques transformant la 4'-*O*-méthyl-d₃-norbelleadine en *N*-déméthylnarwédine, et celles donnant lieu à la galanthamine à partir de la norgalanthamine, demeurent toujours inconnues (Figure 82).

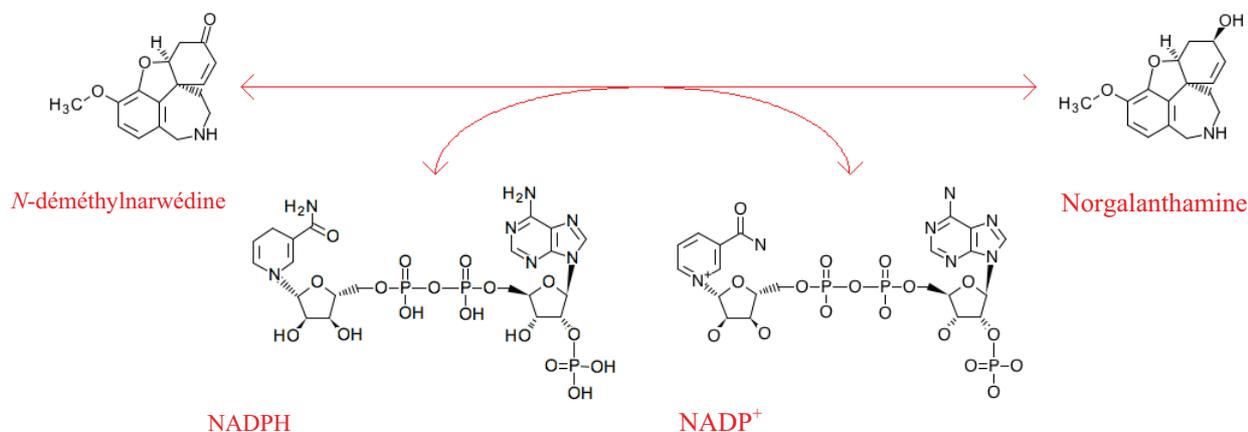


Figure 81 : Réaction chimique de la transformation de la *N*-déméthylnarwédine en norgalanthamine (base de données KEGG, réaction R08442).

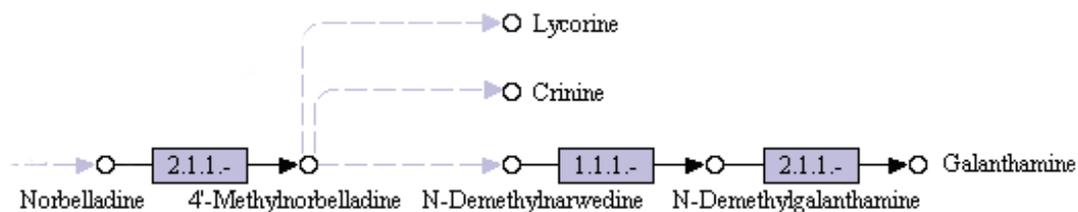


Figure 82 : Voie de biosynthèse de la galanthamine. 2.1.1. : Enzymes méthyltransférases, 1.1.1. : Enzymes oxydoréductases dépendantes du NADPH. (Base de données KEGG, réaction R08442).

D - Conclusion du chapitre

Au terme de ce chapitre, nous avons pu démontrer, pour la première fois, que la **métabolisation du précurseur commun des alcaloïdes a lieu au niveau des microsomes**. Toutefois, l'extraction de ces derniers s'est révélée difficile à réaliser. Des difficultés ont été rencontrées pour l'obtention de microsomes de plantes en quantité suffisante, et pour la reproductibilité des réponses du matériel végétal d'une expérimentation à une autre. La détection des alcaloïdes deutérés dérivés du précurseur indique sa métabolisation en présence des microsomes. Les réponses ont été souvent obtenues en présence et en l'absence du NADPH, ce qui indiquerait que les réactions de biosynthèse seraient indépendantes du NADPH.

Les résultats sont à confirmer. Néanmoins nous avons pu apporter de nouvelles informations sur la voie de biosynthèse des alcaloïdes des Amaryllidaceae et nous avons mis au point de nouvelles méthodes pour l'obtention des microsomes de plantes, pour leur incubation avec le précurseur commun des alcaloïdes, et enfin pour les analyses chromatographiques et l'interprétation des résultats d'incubation.

À ce jour, aucun travail n'a été rapporté dans la littérature sur l'étude des enzymes clé impliquées dans ces étapes de biosynthèse à partir du précurseur commun. Cela constitue donc, un des axes forts de ce travail qui nécessite d'être poursuivi.

Chapitre VI.

Étude phytochimique des alcaloïdes de quelques Amaryllidaceae provenant du Liban

Dans ce chapitre on s'intéresse à trois espèces d'Amaryllidaceae récoltées au Liban : *Pancreatium maritimum*, *Narcissus tazetta* et *Narcissus poeticus*. En fin d'année 2009, le laboratoire SUCRES a acquis la base de données LIB.NIST08. De ce fait, nous nous sommes intéressés au criblage phytochimique de ces plantes récoltées au Liban au cours de l'année 2010. Notre objectif est d'identifier les alcaloïdes présents dans les différents organes (Figure 83) de ces Amaryllidaceae (racines, bulbes, tiges et feuilles) en utilisant deux techniques chromatographiques qui sont l'HPTLC et la GCMS.



Figure 83 : a) Bulbe *in vivo* de *P. maritimum* lyophilisé. b) Tiges *in vivo* de *N. poeticus* lyophilisées. c) Graines de *P. maritimum*. d) Bulbes de *P. maritimum* broyés. e) Tiges de *N. poeticus* broyées.

A - Analyses par HPTLC

6 et 8 μL d'extraits (Figure 84) des différents organes de *Pancratium maritimum* et les témoins de galanthamine, lycorine, *N*-déméthylнарwédine et 4'-*O*-méthyl-d₃-norbelladine ont été déposés sur une plaque de silice fluorescente. Au vu de la faible intensité des taches observées avec *P. maritimum* (Figure 85), nous avons préféré augmenter le volume des dépôts à 20 μL pour *Narcissus tazetta* et *Narcissus poeticus* (Figure 86). La migration est effectuée dans une cuve conditionnée avec deux solvants successifs selon le protocole décrit par Ingkaninan *et al.*, 2000.

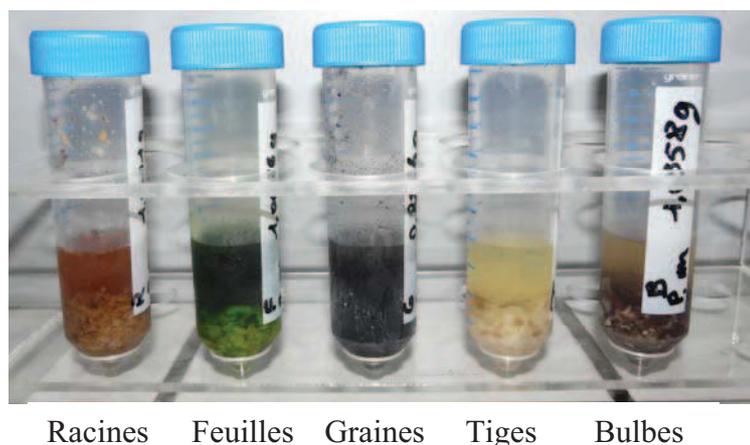


Figure 84 : Tubes Falcon contenant des broyats des différents organes de *Pancratium maritimum* et 10 mL de méthanol.

Tous les extraits d'Amaryllidaceae contiennent de nombreux composés qui sont difficilement identifiables. La migration des standards a montré différentes taches pour le même standard déposé (Figure 85 et 86). Sous UV, les taches correspondantes par exemple, à la lycorine ou à la *N*-déméthylнарwédine n'ont pas pu être identifiées. Néanmoins quelques taches des échantillons semblent correspondre aux mêmes que celles présentes dans les standards. Par exemple, on retrouve la tache la plus inférieure du standard de la lycorine chez *N. poeticus* et chez *N. tazetta* de manière intense (Figure 86) mais aussi chez *P. maritimum* avec une moins grande intensité (Figure 85). La pulvérisation du réactif de Dragendorff permet de révéler les alcaloïdes et on distingue l'alcaloïde majoritaire dans les témoins.

Il faut également noter que certaines espèces et certains organes sont plus ou moins riches en composés différents. Il en est de même pour les intensités des molécules qui ont migré au même endroit dans les différents extraits. Dans les racines de *P. maritimum* une molécule de

forte intensité est observée dans la partie supérieure tandis que dans les bulbes de cette même espèce cette même tache est d'intensité très faible (Figure 85).

Si on compare globalement les espèces, il semble que les extraits de *N. tazetta* soient plus pauvres en alcaloïdes que ceux de *P. maritimum* et de *N. poeticus* aussi bien au niveau de l'intensité des taches qu'au niveau du nombre de composés séparés.

Si l'on compare les organes, il semble que chez les *Narcissus* les organes les plus riches, sont les feuilles et les tiges, que se soit par l'intensité des taches ou par le nombre de molécules. Par contre chez *P. maritimum* il semble que se soient les racines.

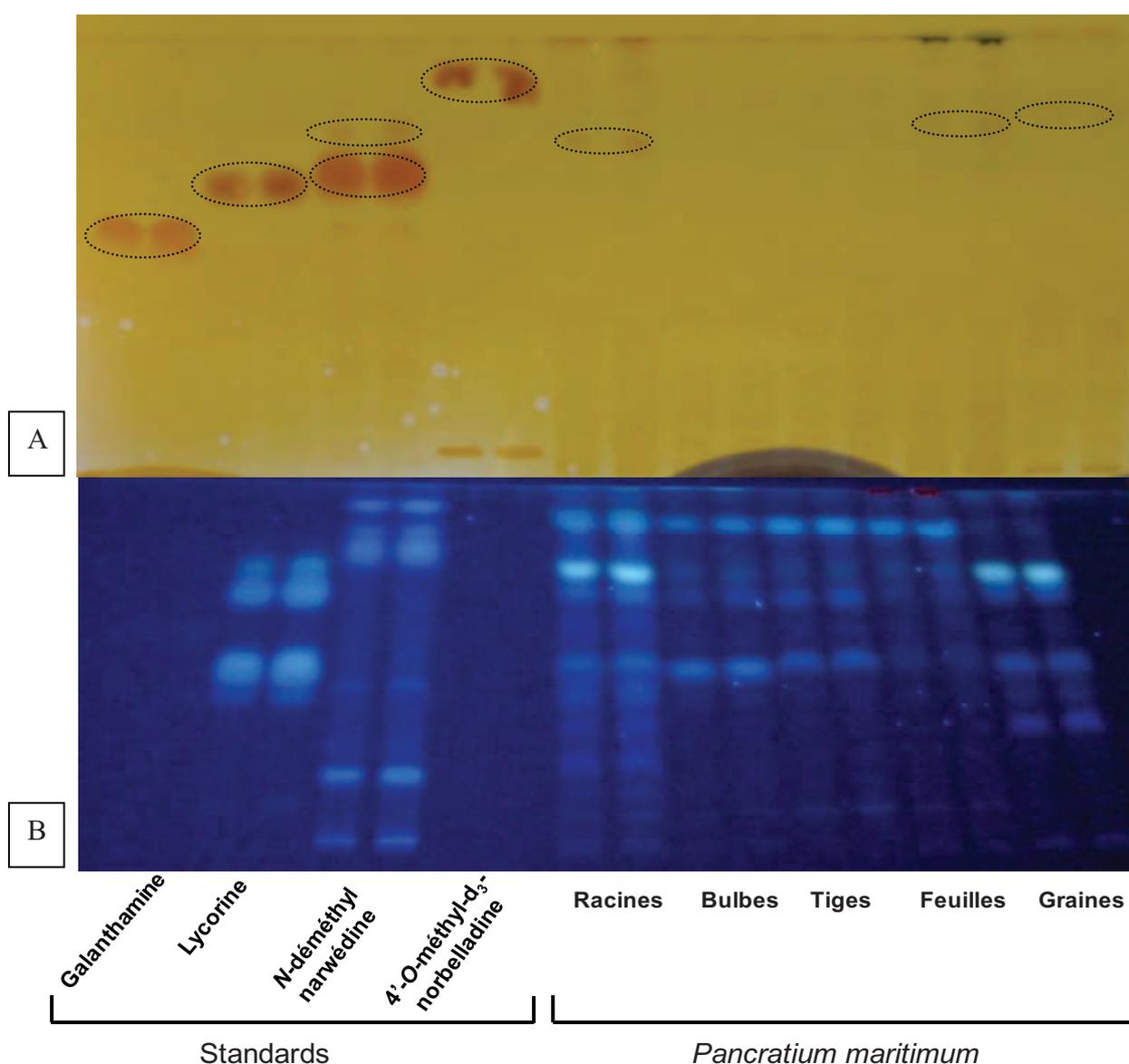


Figure 85 : Plaques de silice sur lesquelles ont été déposés les extraits d'organes de *P. maritimum*, A : Révélation par le réactif de Dragendorff ; B : Observation sous lampe UV (365 nm) après les deux migrations successives décrites par Ingkaninan *et al.*, 2000.

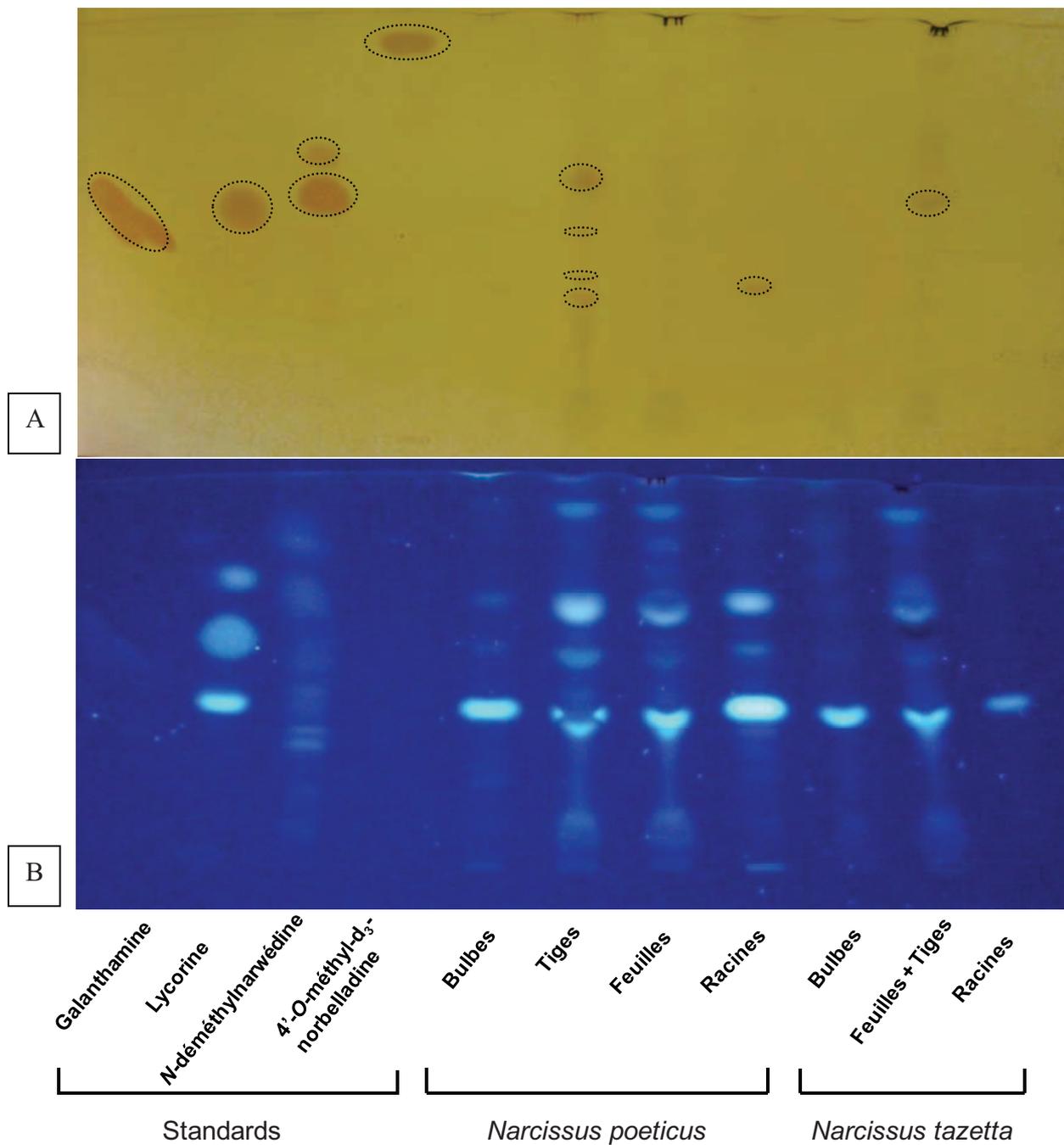


Figure 86 : Plaques de silice sur lesquelles ont été déposés les extraits d'organes de *N. tazetta* et *N. poeticus*, A : Révélation par le réactif de Dragendorff ; B : Observation sous lampe UV (365 nm) après les deux migrations successives décrites par Ingkaninan *et al.*, 2000.

Sur les figures ci-dessus, seules les molécules contenant au moins un atome d'azote sont visibles avec le réactif de Dragendorff et par soucis de lisibilité elles ont été marquées d'un cercle.

Ces résultats ont montré que toutes les espèces testées contiennent des alcaloïdes mais tous les organes d'une même espèce n'en contiennent pas toujours. De plus les intensités des taches obtenues au niveau des extraits sont très faibles, ce qui indique que les alcaloïdes sont présents dans ces espèces d'Amaryllidaceae en très faible quantité. Cependant il faut noter que le seuil de détection de la méthode est peut être trop élevé pour détecter la présence de quelques alcaloïdes dont les quantités sont encore plus faibles.

N. tazetta contient au moins un alcaloïde détectable dans ses feuilles et ses tiges, *N. poeticus*, quatre dans ses tiges et un dans ses racines (Figure 86) et *P. maritimum* un dans ses racines, ses feuilles et ses graines (Figure 85).

Il est à remarquer que les bulbes de ces trois espèces ne contiennent pas d'alcaloïdes ou alors des quantités infimes. Les tiges de *N. poeticus* sont probablement les plus riches en alcaloïdes que se soit en quantité ou en nombre.

La technique HPTLC ne nous a pas permis d'analyser qualitativement les molécules présentes dans les échantillons, par contre elle nous a permis de comparer les organes entre eux et les espèces entre elles. Une autre technique plus précise doit être employée pour identifier les composés des extraits.

B - Analyses par GCMS :

Les extraits des différentes parties des plantes d'Amaryllidaceae ont été injectés en GCMS. L'identification des pics a été effectuée en comparant le spectre de fragmentation de chaque pic à celui répertorié dans la littérature, et dans la librairie NIST08.

Le criblage des alcaloïdes chez *P. maritimum* est présenté dans le tableau 22. En terme de diversité alcaloïdique chez ces espèces, *P. maritimum* est la plus riche des espèces avec 10 alcaloïdes différents (Figure 87). Ensuite *N. poeticus*, présenté dans le tableau 23, renferme 7 alcaloïdes et en final *N. tazetta* qui présente 3 alcaloïdes différents. En terme de diversité alcaloïdique entre les organes, les tiges et les feuilles sont les plus riches (Figure 87) (Tableau 22). Les bulbes et les racines semblent contenir moins d'alcaloïdes mais il existe une certaine variabilité en fonction des espèces. Les graines de *P. maritimum* contiennent aussi quelques alcaloïdes.

Dans la littérature, 53 alcaloïdes différents ont été isolés du genre *Pancratium* (Cedrón *et al.*, 2010). La plupart d'entre eux ont été détectés chez d'autres genres d'Amaryllidaceae comme par exemple, le genre *Narcissus*.

Le genre *Pancratium* constitue une source importante d'alcaloïdes chez les Amaryllidaceae (Cedrón *et al.*, 2010). Les alcaloïdes les plus abondants appartiennent aux types lycorénine, haemanthamine, galanthamine et crinine, et peuvent être isolés en quantités importantes de l'espèce *P. canariense* (Cedrón *et al.*, 2010).

Nous avons identifié la galanthamine dans les tiges et les feuilles de *N. poeticus* uniquement (Tableau 23). Tandis que la lycorine a été identifiée dans tous les échantillons sauf dans les racines de *N. tazetta* (Tableau 23). La chlidanthine est surtout présente chez *N. poeticus* et la pancracine, comme son nom l'indique, n'est présente que chez *P. maritimum* (Tableau 22).

Nos résultats confirment ce qui a été rapporté dans la littérature. Les études biologiques des alcaloïdes de *Pancratium* sont principalement axées dans le domaine des activités antitumorales et antipaludiques. La lycorine, la tazettine, la pseudolycorine, l'haemanthamine, la narciclasine, la buphasine, la déméthylmarithidine entre d'autres, exercent des activités antitumorales. Parfois, les mêmes composés sont des agents antipaludiques, comme par exemple, la lycorine, l'haemanthamine, l'ungeremine et la pancracine (Cedrón *et al.*, 2010).

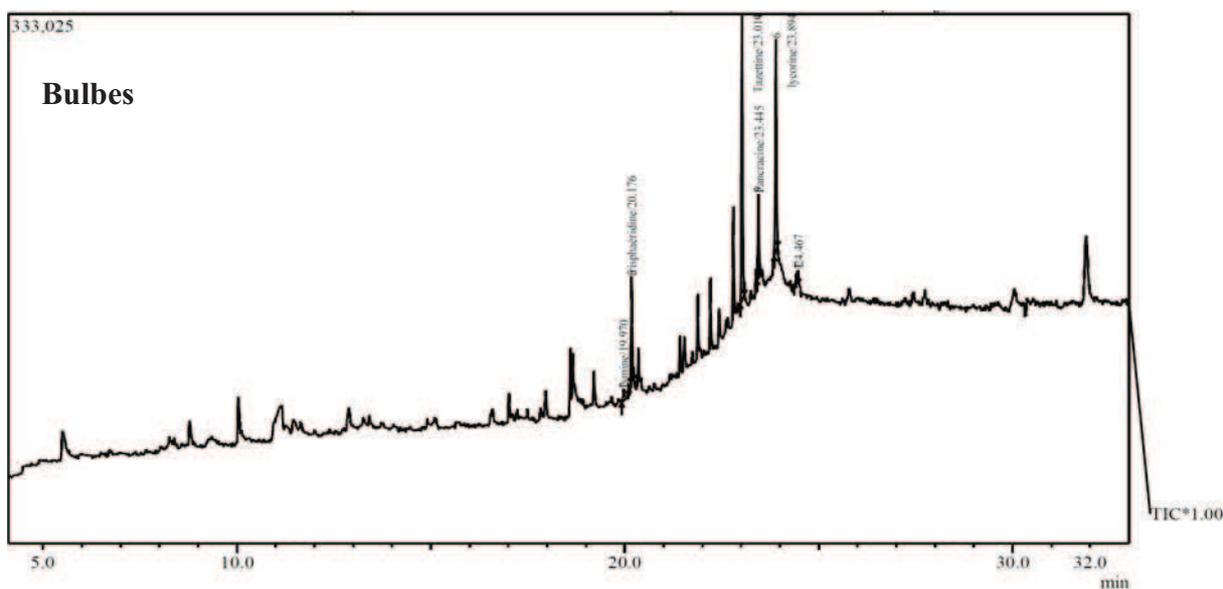
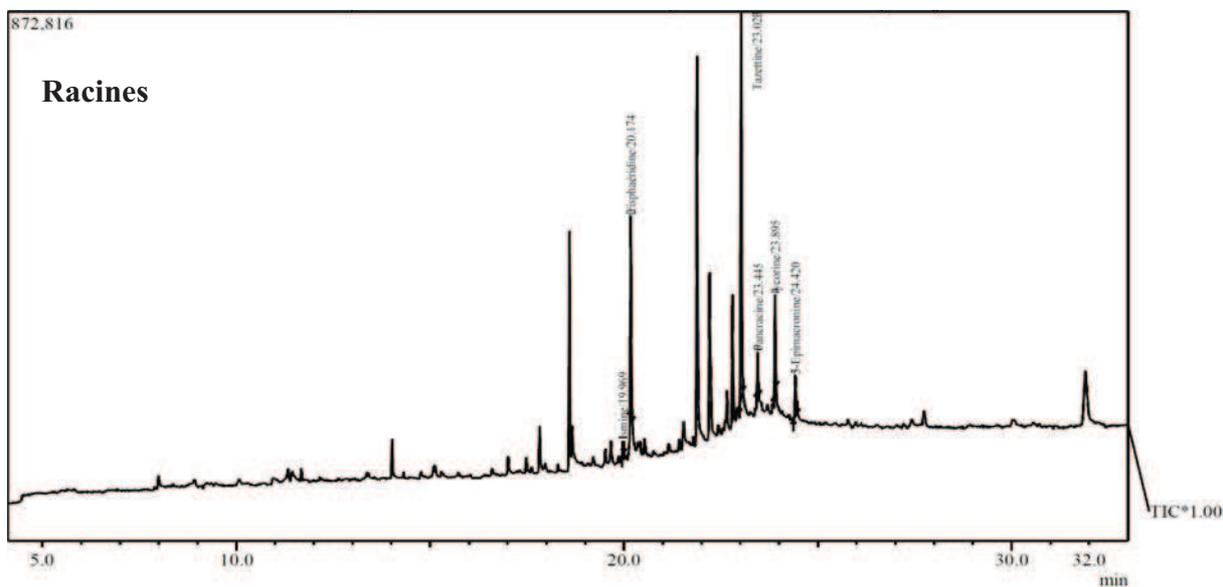
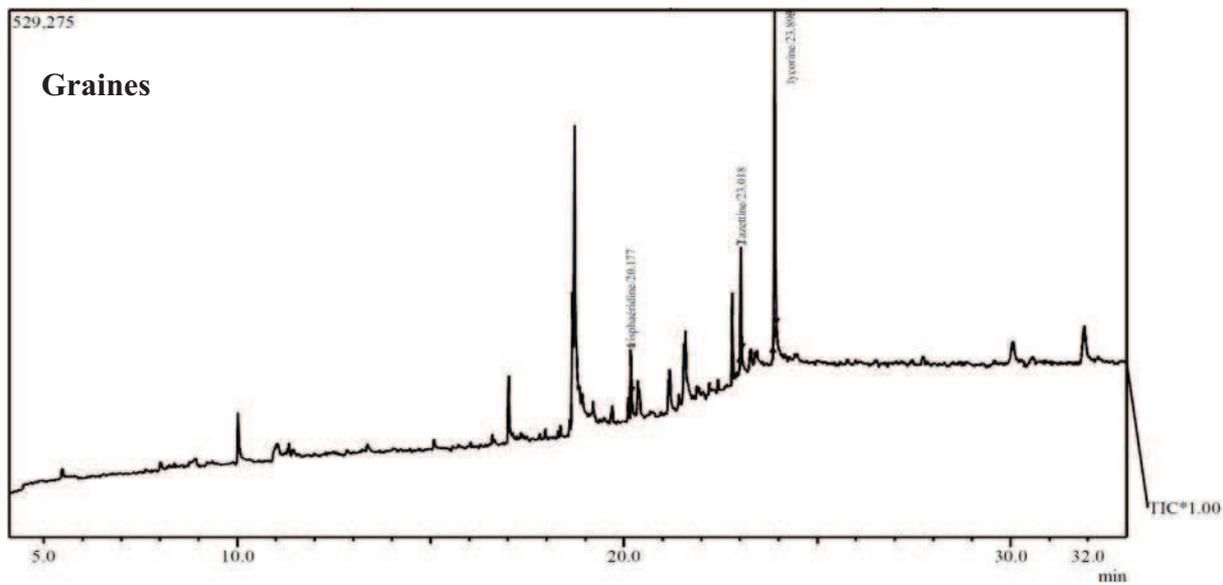


Tableau 22: Résultats du criblage par GCMS des alcaloïdes dans les différents organes chez *Pancratium maritimum*. + : présence de l'alcaloïde, - : absence de l'alcaloïde dans l'échantillon, (temps de rétention ; bibliothèque et pourcentage de similitude), NIST : Librairie NIST08, GAL : Base de données rapportées dans la littérature.

	<i>P. maritimum</i>					
	Espèces Organes	Bulbes	Feuilles et tiges	Graines	Racines	Tiges
Alcaloïdes Formule Pic majoritaire		(temps de rétention ; bibliothèque et pourcentage de similitude)				
Ismine C ₁₅ H ₁₅ NO ₃ 238	+ (19,96 ; GAL79 %)	+ (19,96 ; GAL84%)	-	+ (19,96 ; GAL88%)	+ (19,96 ; GAL82%)	
Trisphéridine C ₁₄ H ₉ NO ₂ 223	+ (20,17 ; GAL96%)	+ (20,17 ; GAL96%)	+ (20,17 ; GAL94%)	+ (20,17 ; GAL97%)	+ (20,17 ; GAL96%)	
Galanthamine C ₁₇ H ₂₁ NO ₃ 286	-	-	-	-	-	
Buphanisine C ₁₇ H ₁₉ NO ₃ 285	-	+ (21,32 ; NIST83%)	-	-	-	
Crinan-3-ol C ₁₆ H ₁₇ NO ₃ 271	-	+ (21,74 ; NIST81%)	-	-	-	
Tazettine, 6a- deoxy- C ₁₈ H ₂₁ NO ₄ 231	-	+ (22,20 ; NIST72%)	-	-	-	

Haemanthamine C ₁₇ H ₁₉ NO ₄ 272	-	+	(22,92 ; GAL98%)	-	-	+	(22,92 ; GAL97%)	
Tazettine C ₁₈ H ₂₁ NO ₅ 247	+	(23,01 ; NIST84%)	-	+	(23,01 ; NIST83%)	+	(23,01 ; NIST84%)	
Pancracine C ₁₆ H ₁₇ NO ₄ 287	+	(23,44 ; NIST72%)	+	(23,44 ; NIST64%)	-	+	(23,44 ; NIST73%)	
Lycorenan-7-one C ₁₇ H ₁₇ NO ₄ 109	-	-	-	-	-	-	-	
Lycorine C ₁₇ H ₁₇ NO ₄ 226	+	(23,89 ; NIST81%)	+	(23,89 ; NIST73%)	+	(23,90 ; NIST84%)	+	(23,90 ; NIST80%)
Epi-macronine C ₁₈ H ₁₉ NO ₅ 245	-	-	-	-	-	+	(24,41 ; NIST89%)	
Chlidanthine C ₁₇ H ₂₃ NO ₃ 228	-	-	-	-	-	-	-	

Tableau 23 : Résultats du criblage par GCMS des alcaloïdes dans les différents organes chez *Narcissus tazetta* et *Narcissus poeticus*. + : présence de l'alcaloïde, - : absence de l'alcaloïde dans l'échantillon, (temps de rétention ; bibliothèque et pourcentage de similitude), NIST : NIST08, GAL : Base de données rapportées dans la littérature.

Alcaloïdes Formule Pic majoritaire	Espèces		<i>N. tazetta</i>			<i>N. poeticus</i>		
	Organe	Bulbes	Racines	Feuilles et	Bulbes	Feuilles	Racines	Tiges
(temps de rétention ; bibliothèque et pourcentage de similitude)								
Ismine C ₁₅ H ₁₅ NO ₃ 238		-	-	-	-	+ (19,95 ; GAL69%)	-	+ (19,93 ; GAL85%)
Trisphéridine C ₁₄ H ₉ NO ₂ 223		LDD	+ (20,19 ; GAL79%)	LDD	-	+ (20,17 ; GAL84%)	-	+ (20,17 ; GAL94%)
Galanthamine C ₁₇ H ₂₁ NO ₃ 286		-	-	-	-	+ (21,04 ; NIST57%)	-	+ (21,04 ; NIST76%)
Buphanisine C ₁₇ H ₁₉ NO ₃ 285		-	-	-	-	-	-	-
Crinan-3-ol C ₁₆ H ₁₇ NO ₃ 271		-	-	-	-	-	-	-
Tazettine, 6a- deoxy- C ₁₈ H ₂₁ NO ₄ 231		-	-	-	-	-	-	-
Haemanthamine C ₁₇ H ₁₉ NO ₄ 272		-	-	-	-	-	-	-

Tazettine C ₁₈ H ₂₁ NO ₅ 247	-	-	+ (23,01 ; NIST83%)	+ (23,01 ; NIST82%)	+ (23,01 ; NIST83%)	+ (23,01 ; NIST83%)
Pancracine C ₁₆ H ₁₇ NO ₄ 287	-	-	-	-	-	-
Lycorenan-7- one C ₁₇ H ₁₇ NO ₄ 109	-	-	-	+ (23,83 ; NIST91%)	-	+ (23,83 ; NIST91%)
Lycorine C ₁₇ H ₁₇ NO ₄ 226	LDD	-	+ (23,89 ; NIST66%)	+ (23,89 ; NIST69%)	+ (23,89 ; NIST80%)	+ (23,89 ; NIST78%)
Epi-macronine C ₁₈ H ₁₉ NO ₅ 245	-	-	-	-	-	-
Chlidanthine C ₁₇ H ₂₃ NO ₃ 228	-	-	+ (24,51 ; NIST74%)	+ (24,51 ; NIST74%)	+ (24,51 ; NIST74%)	+ (24,51 ; NIST74%)

C - Conclusion du chapitre

Les analyses phytochimiques réalisées au cours de ces travaux ont permis l'identification de nombreux alcaloïdes chez quelques Amaryllidaceae. Le criblage phytochimique réalisé sur les différents organes de *P. maritimum*, *N. tazetta* et *N. poeticus* a conduit à l'identification de nouveaux alcaloïdes non détectés antérieurement au sein du groupe SUCRES. Nous rappelons que les plantes utilisées ont été récoltées dans différentes régions du Liban. Dans ce pays, ces espèces ont toujours été cultivées pour leur aspect décoratif et ornemental mais n'ont jamais été considérées comme étant des plantes médicinales. Au terme de ce travail nous avons pu apporter un intérêt scientifique et une valeur d'intérêt thérapeutique aux plantes endémiques du Liban.

Conclusion Générale

En conclusion, les travaux de culture *in vitro*, réalisés sur les plantes d'Amaryllidaceae ont abouti à l'obtention de divers matériels avec différents degrés de différenciation. Des explants primaires de *Leucojum aestivum* L., issus de feuilles de bulbes du commerce, ont été étudiés pour leur capacité à développer une callogénèse sur différents milieux de culture. Une organogénèse directe a été aussi observée sur les explants issus de feuilles de bulbes *in vivo* de *Narcissus pseudonarcissus* et de *Galanthus elwesii*.

Au cours du premier chapitre, nous avons mis au point les méthodes analytiques de chromatographie liquide, gazeuse et sur couche mince, couplées à la spectrométrie de masse. Pour déterminer le contenu alcaloïdique des cultures *in vitro* initiées, nous avons modifié la méthode d'analyse par HPLC décrite auparavant par Diop, 2007. Le nouveau programme d'élution HPLC a permis de réduire le temps d'analyse tout en conservant une bonne séparation des pics. La méthode HPLC est validée et on en déduit un intervalle de linéarité dans lequel les alcaloïdes des Amaryllidaceae peuvent être dosés [entre 0 et 1g/L]. Cependant, la faible sensibilité rend la méthode HPLC peu efficace dans l'analyse quantitative des alcaloïdes des Amaryllidaceae, en particulier pour les pics mineurs dans un extrait de plante. La méthode LCMS permet de quantifier la galanthamine, et la lycorine à partir d'une quantité de $0,02 \cdot 10^{-3}$ µg/mL. Elle permet aussi, grâce à la haute résolution et à son couplage à la spectrométrie de masse, la distinction des molécules possédant la même masse moléculaire, c'est notamment le cas de la galanthamine et de la lycorine. Pourtant, le manque de standards pour les autres alcaloïdes limite leur identification en HPLC et en LCMS. Afin de confirmer les pics identifiés dans nos extraits, ou même identifier d'autres alcaloïdes également présents, nous avons eu recours, dans un troisième temps, à la chromatographie en phase gazeuse (GCMS). Cette technique permet la caractérisation des pics et des composés en se référant à une base de données connues (NIST08) ou à des travaux rapportés dans la littérature. Enfin, grâce à la chromatographie sur couche mince, nous avons pu analyser des échantillons de faible volume (< 250 µL) en évitant le problème de microfiltration, ainsi que des échantillons en suspension avec des sels (Tampon phosphate, tris-HCl) et/ou renfermant des protéines comme dans le cas de l'extraction des microsomes. Les différents composés sont d'abord séparés sur les plaques TLC, puis le couplage à la spectrométrie de masse, par les biais de l'interface CAMAG, nous permet d'identifier et de quantifier les taches correspondantes à la galanthamine et à la lycorine.

Au terme du deuxième chapitre, nous avons démontré que le saccharose et les phytorégulateurs présentent un effet sur l'organogenèse et sur le métabolisme des alcaloïdes. L'ajout du saccharose et des régulateurs de croissance joue un rôle dans l'activation du métabolisme des alcaloïdes. La diversité des alcaloïdes a été favorisée dans les cultures *in vitro*, et a montré des aspects variables selon les conditions de culture, et selon l'espèce cultivée. L'accumulation maximale de galanthamine est atteinte en présence des concentrations élevées de saccharose (60 et 90 g/L). Cette accumulation de galanthamine ainsi que l'activité inhibitrice de l'AChE, mesurées pour les mêmes conditions de culture *in vitro*, diffèrent d'une espèce cultivée à l'autre. Les pourcentages de galanthamine les plus élevés (0,1 % MS chez *N. pseudonarcissus* ; 0,075 % MS chez *L. aestivum* ; et 0,02 % MS chez *G. elwesii*) sont obtenus grâce aux cultures *in vitro*, et ils sont souvent accompagnés d'une importante activité d'inhibition de l'AChE (> 30 % d'inhibition). A notre connaissance, et par rapport à la littérature, nos expériences ont conduit à l'obtention des teneurs en galanthamine les plus élevés chez les Amaryllidaceae. En conclusion, les conditions de culture optimales décrites chez chacune des espèces ont permis l'obtention des plus hautes teneurs en galanthamine jusqu'à ce jour, qui sont de l'ordre de **0,02**; **0,1**; et **0,075 % MS**, respectivement chez *G. elwesii*, *N. pseudonarcissus*, et *L. aestivum*.

Afin d'augmenter la biosynthèse de galanthamine dans nos cultures *in vitro*, nous nous sommes intéressée au cours du troisième chapitre à l'induction du métabolisme alcaloïdique par l'éthylène et le méthyljasmonate. Dans un premier temps, nous avons montré le rôle que joue l'éthylène dans l'organogenèse des tissus *in vitro* de *L. aestivum* et sur l'accumulation et la diversité des alcaloïdes. Les résultats ont été dépendants du stade de différenciation des cultures *in vitro*. L'accumulation de galanthamine et la diversité des alcaloïdes, et la formation de cals, sont maximales quand les explants sont cultivés en présence du KMnO₄ et du STS 10 µM. Sept alcaloïdes ont été identifiés dans les cultures *in vitro* cultivées dans ces conditions, ainsi que dans les bulbes *in vivo*. Néanmoins, des nouveaux pics inconnus ont été détectés, ce qui ouvre la porte à de nouvelles perspectives en vue de les identifier. La deuxième stratégie consiste à ajouter aux cultures *in vitro* des molécules élicitrices, notamment le MeJa. Les effets de l'induction par le MeJa, sont rapides et transitoires. Les alcaloïdes sont relargués dans le milieu de culture avec des quantités plus importantes que celles retenues dans leurs bulbes *in vitro* producteurs. La LCMS, nous a permis de sélectionner les pics et de quantifier avec exactitude les teneurs en galanthamine et en

lycorine. Il en résulte, dans tous les cas une induction non négligeable de la synthèse. Les inductions maximales sont obtenues après 10 h d'incubation en présence de 150 μ M de MeJa, soit un pourcentage maximal de 0,0017 % MS de galanthamine. Et après 5 h d'incubation en présence de 100 μ M de MeJa, soit 0,03 % MS de lycorine.

Dans un quatrième chapitre, nous avons introduit des précurseurs deutérés, la 4'-*O*-méthyl-d₃-norbelleadine et l'isovanilline-d₃, à différentes doses, dans le milieu de culture de *L. aestivum* afin d'étudier la voie de biosynthèse des alcaloïdes des Amaryllidaceae.

L'ajout de la 4'-*O*-méthyl-d₃-norbelleadine aux cultures *in vitro* de bulbillles de *L. aestivum* a permis d'acquérir de nouvelles informations concernant la voie de biosynthèse de la galanthamine. On constate d'abord que le précurseur deutéré, commun aux alcaloïdes des Amaryllidaceae a été métabolisé par les tissus végétaux. La métabolisation du précurseur est dépendante du type de couplage oxydo-phénolique. La galanthamine est deutérée avec trois atomes de deutérium, la lycorine possède deux atomes de deutérium. Concernant la galanthamine deutérée, au bout de **30 jours** d'incubation avec **0,1 g/L** D3MN, une accumulation (**0,0049 ± 0,001 % MS**) est observée dans les extraits de bulbillles *in vitro*, qui est 10 fois plus importante dans le milieu de culture (**0,07 ± 0,01 g/100 L milieu**). Quant à la lycorine deutérée, les teneurs optimales obtenues après **40 jours** d'incubation avec **0,2 g/L** de D3MN, sont égales à **0,5 % MS**, et **0,3 g/100 L** pour le milieu de culture. Il est à noter que l'ajout du précurseur a stimulé l'accumulation des alcaloïdes natifs. Concernant l'accumulation de la galanthamine native, une durée d'incubation de **15 jours** avec **0,1 g/L** de D3MN a conduit à l'obtention de **0,15 %** en plus de galanthamine dans les tissus *in vitro* (0,16 % MS), et **0,16 %** en plus de galanthamine relarguée dans le milieu (0,16 g/100 L milieu) comparativement au témoin (0,004 % MS ; 0,0004 g/100 L milieu). Les teneurs en galanthamine native (0,15 % MS) sont 2 fois plus élevées que les teneurs en galanthamine deutérées (0,08 % MS). Quant à l'accumulation de la lycorine native, des durées d'incubation de **15 jours** avec **0,1 g/L** de D3MN et de **40 jours** avec **0,2 g/L** de D3MN, ont conduit à l'obtention de **15 à 19 %** en plus de lycorine dans les tissus *in vitro* (**18 ± 1 % MS**), et **2 %** en plus de lycorine relarguée dans le milieu (**2 ± 1 g/100 L milieu**) comparativement au témoin (**2.10⁻⁵ % MS ; 0,005 g/100 L milieu**). Les accumulations maximales de ces alcaloïdes au jour 15 et 30 dans les tissus et surtout dans le milieu liquide, peuvent être responsables de la diminution inattendue de la croissance cellulaire observée pendant ces jours de culture. Le précurseur D3MN présente donc plusieurs effets. Il métabolisé et incorporé dans les différents

alcaloïdes de la voie de biosynthèse, et il agit comme un éliciteur de la synthèse de la galanthamine et de la lycorine natives.

L'ajout du D3ISO aux cultures des bulbilles *in vitro* de *L. aestivum* a été effectué dans les mêmes conditions. Le criblage des alcaloïdes a montré l'absence d'alcaloïdes deutérés, signifiant que le D3ISO n'a pas été incorporé dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes. Toutefois, une influence sur la diversité des alcaloïdes a été observée après 15 et 30 jours de culture avec 0,2 g/L de D3ISO. Certains alcaloïdes n'existant pas dans les bulbilles *in vitro* contrôles, ont été détectés suite à l'ajout du D3ISO. Les teneurs en alcaloïdes maximales détectées sont **0,0013 % MS** de galanthamine, et **0,02 % MS** de lycorine. L'accumulation maximale de galanthamine est observée au **jour 15** de culture avec **0,1 et 0,2 g/L** D3ISO. L'accumulation maximale de lycorine est notée au **jour 30** de culture avec **0,2 g/L** D3ISO. L'ajout du D3ISO a contribué à la diminution de la croissance des bulbilles *in vitro* comparativement à la courbe témoin. Mais, cette contribution reste néanmoins ambiguë, du fait que le nombre de métabolites secondaires est très vaste, et leur criblage par GCMS est limité aux données rapportées dans la littérature et dans la librairie NIST08.LIB.

En comparant les résultats obtenus à l'issue des études réalisées avec les précurseurs deutérés, on remarque une grande différence au niveau des teneurs alcaloïdiques. La stimulation de la synthèse de la galanthamine et de la lycorine natives, est plus marquée en présence du D3MN. Ces résultats s'expliquent par le fait que ce dernier est précurseur de la voie de biosynthèse des alcaloïdes plus tardif que le D3ISO. L'effet stimulateur de ce dernier est similaire à tout autre effet éliciteur comme les agents pathogènes qui stimulent la synthèse des métabolites secondaires, comme le MeJa, les régulateurs d'éthylène et les régulateurs de croissance...

Dans le but d'identifier l'une des enzymes clé impliquée dans la synthèse de la galanthamine et en vue de réaliser une synthèse biomimétique de cette dernière, nous avons procédé, dans une cinquième partie, à l'extraction des microsomes de tissus *in vitro* d'Amaryllidaceae et à leur incubation avec le précurseur D3MN deutéré. Au terme de l'étude, nous avons pu démontrer que la métabolisation du précurseur commun des alcaloïdes a lieu au niveau des microsomes. Les réponses ont souvent été obtenues en présence et en l'absence du NADPH. Les réactions de biosynthèse semblent être indépendantes du NADPH. Cette étude reste à confirmer. Néanmoins nous avons mis au point de nouvelles méthodes pour l'obtention de microsomes de plantes d'Amaryllidaceae, pour l'incubation de ces derniers

avec le précurseur commun des alcaloïdes, et enfin pour les analyses chromatographiques et l'interprétation des résultats à l'issue des incubations. À ce jour, aucun travail n'a été rapporté dans la littérature sur l'étude des enzymes clé impliquées dans ces étapes de biosynthèse à partir du précurseur commun.

Dans une sixième partie de ce projet, nous nous sommes intéressée au criblage phytochimique des alcaloïdes présents dans des plantes d'Amaryllidaceae récoltées dans différentes régions libanaises. Les analyses phytochimiques réalisées au cours de ces travaux ont permis l'identification de nombreux alcaloïdes sur les différents organes de *P. maritimum*, *N. tazetta* et *N. poeticus*. Certains alcaloïdes n'avaient pas été détectés antérieurement au sein du groupe SUCRES. Au terme de ce travail nous avons pu apporter un intérêt scientifique et une valeur d'intérêt thérapeutique aux plantes endémiques de ce pays.

Ce travail a conduit à la publication de trois articles internationaux, un article soumis et un article en cours de préparation (cf. communications scientifiques).

Les perspectives de recherche, suite à ces résultats de thèse, sont de plusieurs ordres :

- D'une part, il serait intéressant de poursuivre l'étude de la métabolisation par des bulbilles *in vitro* de précurseurs marqués au deutérium de la voie de biosynthèse des alcaloïdes des Amaryllidaceae.

Le travail permettrait d'approfondir les mécanismes mis en jeu concernant la stimulation de la production des molécules d'intérêt, en particulier de la galanthamine. Par ailleurs cette étude, mettant en œuvre des précurseurs marqués, est indispensable pour parvenir à l'identification de l'enzyme clé qui conduit de la 4'-O-méthylnorbelladine à la diénone.

Nos travaux ont montré que la métabolisation de la 4'-O-méthylnorbelladine a lieu au niveau membranaire. Il reste à confirmer, si la réaction est NADPH indépendante, comme nos résultats préliminaires semblent le montrer. Une fois l'enzyme isolée, il est envisagé de la produire en fermenteur par des cellules d'*Escherichia coli*. Les enzymes produites seront ensuite mises en contact avec le

précurseur synthétisé dans le groupe, la 4'-*O*-méthylnorbelladine, pour envisager une production biosynthétique de la galanthamine.

- D'autre part, le criblage phytochimique de différentes espèces d'Amaryllidaceae est à poursuivre dans le but d'isoler et d'identifier de nouvelles molécules à activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase. Enfin, les cultures *in vitro* de *L. aestivum*, de *N. pseudonarcissus* et de *G. elwesii* se sont révélées être source d'une variabilité phytochimique intéressante puisque des composés inconnus ont montré une puissante activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase. L'identification de ces composés conduira peut-être à de nouvelles molécules à visée thérapeutique.

Références Bibliographiques

Abdullaeva DU, Samikov K, Shakirov R and Yunusov SY. Alkaloids of *KoroZkowitzia sewerzowii*. Chem Nat Compounds, 1978; 14, pages 702–703.

Adam DO, Yang SF. Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America, 1979 ; 76(1), pages 170–4.

Al Balkhi M. Exploration phytochimique de la voie de biosynthèse des alcaloïdes tropaniques chez les racines transgéniques de *Datura innoxia* Mill. Thèse de doctorat, Université de Picardie, Jules Verne, Décembre 2008.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Biologie moléculaire de la cellule. Medecine-Sciences-Flammarion. 2ème edition, 1990; page 41–86.

Augé R, Beauchesne G, Boccon-Gibod J, Decourtye L, Digat B, Jalouzot R, Minier R, Morand JCI, Reynoird JP, Strullu DG, Vidalie H. In « La culture *in vitro* et ses applications horticoles ». Techniques et Documenttion – Lavoisier, 1989 ; ISBN: 2-85206-504-5.

Bae KH, Choi YE, Shin ChG, Kim YY, Kim YS. Enhanced ginsenoside productivity by combination of ethephon and methyl jasmonate in ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) adventitious root cultures. Biotechnol Lett, 2006; 28, pages 1163–1166.

Bartholomeusz TA, Molinie R, Roscher A, Felpin FX, Gillet F, Lebreton J, Mesnard F and Robins PJ. Stereo selectivity of the demethylation of nicotine piperidine homologues by *Nicotiana plumbaginifolia* cell suspension cultures. Phytochemistry, 2005; 66(16) pages 1890–1897.

Barton DHR, Cohen T. In Festschrift Arthur Stoll. Birkhäuser, Basel, 1957 page 117.

Barton DHR, Kirby GW, Taylor JB, Thomas GM. Phenol oxidation and biosynthesis. Part VI. The biogenesis of amaryllidaceae alkaloids. J Chem Soc, 1963; pages 4545–4558.

Barton DHR, Kirby GW. "Phenol Oxidation and Biosynthesis Part. V. The Synthesis of Galanthamine". J Chem Soc, 1962; pages 806–817.

Bastida and Viladomat Alkaloids of *Narcissus*. In Hanks, G. R., ed. *Narcissus* and daffodil: the genus *Narcissus*. Medicinal and aromatic plants - industrial profiles, 2002.

Berkov S, Bastida J, Nikolova M, Viladomat F, Codina C. Analysis of galanthamine-type alkaloids by capillary gas chromatography-mass spectrometry in plants. *Phytochemical Analysis*, 2008 ; 19(4), Pages 285 – 293.

Berkov S, Bastida J, Nikolova M, Viladomat F, Codina C. Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts. *Phytochemical Analysis*, 2008 ; 19(5), Pages 411 – 419.

Berkov S, Codina C, Viladomat F, Bastida J. *N*-Alkylated galanthamine derivatives: Potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008; 18, pages 2263–2266.

Berkov S, Georgieva L, Kondakova V, Atanassov A, Viladomat F, Bastida J, Codina C. Plant sources of galanthamine: phytochemical and biotechnological aspects. *Biotechnol & Biotechnol Eq*, 2009; 23, pages 1310–2818.

Berkov S, Pavlov A, Georgiev V, Bastida J, Burrus M, Ilieva M, Codina C. Alkaloid synthesis and accumulation in *Leucojum aestivum in vitro* cultures. *Nat Prod Commun*, 2009; 4(3), pages 359–64.

Berkov S, Pavlov A, Ilieva M, Burrus M, Popov S, Stanilova M. CGC-MS of alkaloids in *Leucojum aestivum* plants and their *in vitro* cultures. *Phytochem Anal*, 2005; 16(2), pages 98–103.

Berkov S, Sidjimova B, Evstatieva L, Popov S. Intraspecific variability in the alkaloid metabolism of *Galanthus elwesii*. *Phytochemistry*, 2004; 65(5), pages 579–86.

Bernfeld P. In *Biogenesis of Natural Compounds*. Pergamon Press Oxford, 1963; page 985.

Biddington NL, Sutherland RA, Robinson HT. Silver nitrate increases embryo production in anther culture of Brussels sprouts. *Ann Bot*, 1988; 62, pages 181–185.

Birks J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;(1):CD005593.

Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*, 2006; 368(9533), pages 387–403.

Boitel-Conti M, Gontier E, Laberche JC, Ducrocq C, Sangwan-Norreel BS. Inducer effect of Tween 20 permeabilization treatment used for release of stored tropane alkaloids in *Datura innoxia* Mill. hairy root cultures. *Plant Cell Rep*, 1996; 16, pages 241–244.

Boitel-Conti M, Laberche JC, Lanoue A, Ducrocq C, Sangwan-Norreel BS. Influence of feeding precursors on tropane alkaloid production during an abiotic stress in *Datura innoxia* transformed roots. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 2000; 60, pages 131–137.

Bordage Simon. Alcaloïdes des Amaryllidaceae et maladie d'Alzheimer: criblage phytochimique et micropropagation des genres *Galanthus* et *Narcissus*. Thèse pour diplôme d'état de docteur en pharmacie, Université Henri Poincaré Nancy1, 2008.

Cedrón JC, Del Arco-Aguilar M, Estevez-Braun A, Ravelo AG. Chemistry and Biology of *Pancreaticum* Alkaloids, In: Geoffrey A. Cordell, Editor(s), *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Academic Press, 2010; 68, pages 1–37.

Chabrier P-E. Stratégies thérapeutiques et maladie d'Alzheimer: que peuvent apporter les modèles animaux? *Annales Pharmaceutiques Françaises* (mars 2009) ; 67(2) pages 97–103.

Chen JT, Chang WC. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic amid enhanced direct somatic embryogenesis from *Oncidium* leaf cultures. *Biol Plant*, 2003; 46, pages 455–458.

Chow YN, Selby C, Fraser TW, Harvey BMR. Stimulation by sucrose of *Narcissus* bulbil formation *in vitro*. *J Hortic Sci*, 1992; 62, pages 289–293.

Codina C. Production of galanthamine by *Narcissus* tissues *in vitro*. In: Hanks G.R., editor. *Narcissus* and Doffodil (The Genus *Narcissus*). London: Taylor & Francis. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles, 2002; pages 218–241.

Collin HA. Determinants of yield of secondary products in plant tissue cultures. *Advances in Botanical Research*, 1987; 113, pages 146–187.

Colque R, Viladomat F, Bastida J, Codina C. Improved production of galanthamine and related alkaloids by methyl jasmonate in *Narcissus confusus* shoot-clumps. *Planta Med*, 2004; 70, pages 1180–1188.

Czollner L, Frantsits W, Kuenburg B, Hedenig U, Fröhlich J, Jordis U. “New Kilogram-Synthesis of the Anti-Alzheimer Drug (-)-Galanthamine”. *Tetrahedron Letters*, 1998; 39, pages 2087–2088.

Daniel Chain. “Alzheimer's Monoclonal Antibodies” at the BIT Life Sciences 2nd International Conference on Monoclonal Antibodies. NEW YORK - Intellect Neurosciences, Inc. (OTC Bulletin Board: ILNS), Thursday, March 25, 2010.

Davis AP. *The Genus Galanthus L. A Botanical Magazine Monograph*. Timber Press, Portland, Oregon. Published in association with the Royal Botanic Gardens, Kew, 1999; pages 297.

De Jong CF, Derks RJE, Bruyneel B, Niessen W, Irth H. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry-based acetylcholinesterase assay for the screening of inhibitors in natural extracts. *Journal of chromatography*, 2006; 1112(1-2), page 389.

De Klerk GJ, Van Der Krieken W, De Jong J. The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1999; 35, pages 189–199.

Debnath M, Malik CP and Bisen PS. Micropropagation: A tool for the production of high quality plant-based medicines. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2006; 7(1), pages 33–49.

Dewick PM. *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*. Second Edition. Chichester – New York: John Wiley & Sons Ltd, 2002.

DiCosmo F, Quesnel A, Misawa M and Tallevi SG. Increased synthesis of ajmalicine and catharanthine by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* in response to fungal culture-filtrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1987; 14, pages 101–106.

Diop MF, Hehn A, Ptak A, Chrétien F, Doerper S, Gontier E, Bourgaud F, Henry M, Chapleur Y, Laurain-Mattar D. Hairy root and tissue cultures of *Leucojum aestivum* L. - relationships to galanthamine content. *Phytochem Rev*, 2007; 6, pages 137–141.

Diop MF, Ptak A, Chretien F, Henry M, Chapleur Y, Laurain-Mattar D. Galanthamine content of bulbs and *in vitro* cultures of *Leucojum aestivum* L. *Nat Product Commun*, 2006; 6, pages 475–479.

Diop MF. Etude de l'impact de la différenciation cellulaire sur la biosynthèse de la galanthamine chez *Leucojum aestivum* L. (Amaryllidaceae). Thèse de doctorat, Université Henri Poincaré Nancy1, Juillet 2007 ; pages 1–129.

Dittrich, Heinz, Kutchan, Toni M, Zenk, Meinhard H. The jasmonate precursor, 12-oxo-phytodienoic acid, induces phytoalexin synthesis in *Petroselinum crispum* cell cultures. FEBS Letters, 1992; 309(1), pages 33–6.

Doares SH, Syrovets T, Weiler EW, Ryan CA. Oligogalacturonides and hitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. Proc Natl Acad Sci USA, 1995; 92, pages 4095–4098.

Duncan DR, Widholm JM. Improved plant regeneration from maize callus cultures using AgNO₃. Plant Physiol, 1987; 83, suppl. 35:208.

Ebert A, and Taylor HF. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. Plant Cell Tiss Organ Cult, 1989.

Eichhorn J, Takada T, Kita Y, Zenk MH. Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine. Phytochemistry, 1998; 49, pages 1037–1047.

Elgorashi EE, Stafford GI, Van Staden J. Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. Planta Med, 2004; 70, pages 260–262.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of AChE activity. Biochem Pharmacol, 1961; 7, pages 88–95.

Fernandez S, Michaux-Ferrière N, and Coumans M. The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum*): histology and improvement by AgNO₃. Plant Growth Regulation, 1999; 28(3), pages 147–155.

Ferri C, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. The Lancet, 2005; 366(9503), pages 2112–2117.

François Couplan, Dictionnaire étymologique de botanique, Delachaux et Niestlé, Lausanne, 2000.

Freyssinet G, Lebrun M, Pelissier B & Hardy T. Biotechnologies végétales. In : Biotechnologies d'aujourd'hui. Julien R et Cenatiempo Y. Eds, Limoges, 1993 ; 163–198.

Fulton B and Benfield P, Moclobemide. An update of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs*, 1996; 52, pages 450–474.

Funka C, Güglera K and Brodeliusa P. Increased secondary product formation in plant cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate preparation (elicitor). *Phytochemistry*, 1987; 26, pages 401–405.

Georgiev V, Berkov S, Georgiev M, Burrus M, Codina C, Bastida J, Ilieva M, Pavlov A. Optimized Nutrient Medium for Galanthamine Production in *Leucojum aestivum* L. *in vitro* Shoot System. *Z Naturforsch*, 2009; 64 c, pages 219–224.

Gesell A, Rolf M, Ziegler J, Diaz Chavez ML; Huang FC, Kutchan TM. CYP719B1 Is Salutaridine synthase, the C-C Phenol-coupling enzyme of morphine biosynthesis in Opium poppy. *Journal of Biological Chemistry*, 2009; 284(36), pages: 24432–24442.

Gontier E, Clement A, Tran TLM, Lievre K, Gravot A, Guckert A, Bourgaud F. Hydroponic combined with natural or forced root permeabilization: a promising technique for plant secondary metabolites production. *Plant Sciences*, 2002 ; 163(4), pages 723–732.

Goyal S, Ramawat KG. Ethrel treatment enhanced isoflavonoides accumulation in cell suspension cultures of *Pueraria tuberosa*, a woody legume. *Acta Physiol Plant*, 2008; 30, pages 849–853.

Grothe T, Lenz R and Kutchan TM. Molecular characterization of the salutaridinol-7-O-acetyltransferase involved in morphine biosynthesis in opium poppy *Papaver somniferum*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001; 276(33), pages 30 717–30 723.

Guillou C, Beunard JL, Gras E, Thal C. An Efficient Total Synthesis of (±)-Galanthamine. *Angewandte Chemie International Edition*, 2001; 40(24), pages 4745 – 4746.

Gundlach H, Muller MJ, Kutchan TM, Zenk MH. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89, pages 2389–2393.

Haarmann T, Machado C, Lubbe Y, Correia T, Schardl CL, Panaccione DG and Tudzynski P. The ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpure*: Extension of the cluster sequence and intra species evolution. *Phytochemistry*, 2005; 66(11), pages 1312–1320.

Hall JL, and Moore AL. In "Isolation of Membranes and Organelles from Plant Cells." Academic Press, New York, 1983.

Hamerski D, and Matern U. Biosynthesis of psoralens Psoralen Smonooxygenase activity from elicitor-treated *Ammi majus* cells. *FEBS Letters*, 1988 ; 239(2), pages 263–265.

Hanks GR. *Narcissus* and daffodil: the genus *Narcissus*. Medicinal and aromatic plants - industrial profiles, 2002.

Harborne JB. Classes and Functions of Secondary Products from Plants .Walton, J N and Brown, D E eds. Imperial College Press, London, United Kingdom, 1999; pages 1–25.

Hatanaka T, Sawabe E, Azuma T, Uchida N, Yasuda T The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. *Plant Sci*, 1995; 107, pages 199–204.

Hefner J and Croteau R. Microsome Preparation from Woody Plant Tissues. In “METHODS IN ENZYMOLOGY”, Academic Press, Inc. 1996; 272, pages 243–250.

Heinrich M, Barnes J, Gibbons S, Williamson EM. Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2004.

Herbert RB. The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites. *Nat Prod Rep*, 2001; 18, pages 50–65.

Higuchi T. In "Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components." Academic Press, New York, 1985.

Hoffman DG, Bousquet WF, Miya TS. Lycorine inhibition of drug metabolism and ascorbic acid biosynthesis in the rat. *Biochem Pharmacol*, 1966; 15, pages 391–393.

Holden PR, and Yeoman MM. Variation in the growth and biosynthetic activity of cloned cell-cultures of *Capsicum frutescens* and their response to an exogenously supplied elicitor. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 1994; 38(1), pages 31–37.

Huang FC and Kutchan TM. Distribution of morphinian and benzo[c]phenanthridine alkaloid gene transcript accumulation in *Papaver somniferum*. *Phytochemistry*, 2000; 53, pages 555–564.

Huang SY. Opportunities for improving the plant cell culture processes for secondary metabolite production. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 2005; 36(6) pages 561–575.

Hwang C, Chu JJ, Yang PL, Chen W and Yates MV. Rapid identification of inhibitors that interfere with poliovirus replication using a cell-based assay. *Antiviral Res*, 2008; 77, pages 232–236.

Ignatov A, Clark WG, Cline SD, Psenak M, Krueger J, Coscia CJ. Elicitation of dihydrobenzophenanthridine oxidase in *Sanguinaria Canadensis* cell cultures. *Phytochemistry*, 1996; 43(6), pages 1141–4.

Ikezawa N, Iwasa K, Sato F. Molecular cloning and characterization of CYP80G2, a cytochrome P450 that catalyzes an intramolecular C-C phenol coupling of (S)-Reticuline in Magnoflorine biosynthesis, from cultured *Coptis japonica* cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2008; 283(14), pages 8810–8821.

Inghaninan K, Hazekamp A, De Best CM, Irth H, Tjaden UR, Van der Heijden R, Van der Greef J, Verpoorte R. The application of HPLC with on-line coupled UV/MS-Biochemical detection for isolation of an acetylcholinesterase inhibitor from *Narcissus* ‘Sir Winston Churchill’. *J Nat Prod*, 2000; 63, pages 803–806.

Ishizaki M, Ozaki K, Kanematsu A, Isoda T and Hoshino O. Synthetic approaches toward spiro[2,3-dihydro-4H-1-benzopyran-4,1'-cyclohexan]-2-one derivatives *via* radical reactions: total synthesis of (+,-)-lycoramine. *J Org Chem*, 1993; 58, pages 3877–3885.

Khanam N, Khoo C, Khan AG. Effects of cytokinin/auxin combinations on organogenesis, shoot regeneration and torpane alkaloid production in *Duboisia myoporoides*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2000; 62, pages 125–133.

Kingston DGI: In: *Anticancer agents from natural products*, ed.: Cragg G.M., Kingston D.G.I., Newman D.J., *Taylor & Francis* : 2005, 89–109.

Kochba J, Spiegel-RoY P, Neumann H, Saad S. Stimulation of embryogenesis in *Citrus* ovular callus by ABA, ethephon, CCC and alar and its suppression by GA3. *Z Pflanzenphysiol*, 1978; 89: 427–432.

Kornienko A, Evidente A. Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chem Rev*, 2008; 108 pages 1982–2014.

Krikorian AD, and Berquam DL. Plant cell and tissue cultures: The role of Haberlandt. *The Botanical Review*, 1969; 35(1), pages 59–67.

Krikorian D, Parushev S, Mechkarova P, Tarpanov V. “New Achievements in the Field of Intramolecular Phenolic Coupling Reactions, Using Hypervalent (III) Iodine Reagent: Synthesis of Galanthamine”. *Synthetic Communications*, 2000; 30(16), pages 2833–2846.

Kurz WGW and Constabel F. Aspects affecting biosynthesis and biotransformation of secondary metabolites in plant cell cultures. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, 1985; 2(2), pages 105–118.

Kutchan TM. Alkaloid biosynthesis – The basis for metabolic engineering of medicinal plants. *Plant Cell*, 1995; 7, pages 1059–1070.

Lam TH, Shaw M. Removal of phenolics from plant extracts by grinding with anion exchange resin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1970; 39, pages 965–968.

Lanoue A, Boitel-Conti M, Portais JC, Laberche JC, Barbotin JN, Christen P, Sangwan-Norreel BS. Kinetic study of littorine rearrangement in *Datura innoxia* hairy roots by ¹³C NMR spectroscopy. *J Nat Prod*, 2002; 65(8), pages 1131–1135.

Laurain-Mattar D, Gillet-Manceau F, Buchon L, Nabha S, Fliniaux MA and Jacquin-Dubreuil. A Somatic embryogenesis and rhizogenesis of tissue cultures of two genotypes of *Papaver somniferum* - Relationships to alkaloid production. *Planta Medica*, 1999; 65, pages 167–170.

Laurain-Mattar D. Production of alkaloids in plant cell and tissue cultures. In: Ramawat KG & Mérillon JM (eds) *Bioactive molecules and medicinal plants*, Springer-Verlag Berlin, 2008; pages 165–174.

Longemann E, Tavernaro A, Schulz W, Somssich IE, Hahlbrock K. UV light selectively coinduces sypply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 2000; 97(4), pages 1903–1907.

Loomis WD, Lile JD, Sandstorm RP, Burbott AJ. Adsorbent polystyrene as an aid to plant enzyme isolation. *Phytochemistry*, 1979; 18, pages 1049–1054.

Loomis WD. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods Enzymol*, 1974; 31(Pt A), pages 528–44.

Lopez S, Bastida J, Viladomat F and Codina C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sci*, 2002; 71, pages 2521–2529.

Ma JH, Yao JL, Cohen D, Morris B. Ethylene inhibitors enhance *in vitro* root formation from apple shoot culture. *Plant Cell Rep.* 1998; 17, pages 211–214.

Maelicke A, Samochocki M, Jostock R, Fehrenbacher A, Ludwig J, Albuquerque EX & Zerlin M: Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galanthamine, a new treatment for Alzheimer's Disease. *Biol. Psych.* 2001, 9: 279–288.

Malik M. Comparison of different liquid/solid culture systems in the production of somatic embryos from *Narcissus* L. ovary explants. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2008; 94, pages 337–345.

Mantell SH & Smith H. Cultural factors that influence secondary metabolite accumulations in plant cell and tissue cultures. In: Mantell SH & Smith H editor. *Plant Biotechnology*, Cambridge: Cambridge University Press, 1983; pages 75–108.

Marco-Contelles J, Leon R, De Los Rios C, Guilletta A, Terencio J, Lopez MG, Garcia AG, Villarroya MJ. Novel Multipotent Tacrine-Dihydropyridine Hybrids with Improved Acetylcholinesterase Inhibitory and Neuroprotective Activities as Potential Drugs for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Med. Chem.*, 2006; 49, 7607–7610.

Margara J. Bases de la multiplication végétative, les méristèmes et l'organogénèse, INRA, 1982.

Markey SP, Powers K, Dubinsky D, Kopin IJ. General method for the synthesis of methyl isotope labeled catecholamine metabolites. Preparation of 4-hydroxy-3-methoxy-d₃-(madelic acid, phenylacetic acid and phenylethylene glycol). *J Label Compd Radiopharm*, 1980; 17, pages 103–114.

Merillon JM, Rideau M, Cheneiux JC. Influence of sucrose on levels of ajmalicine, serpentine and tryptamine in *Catharanthus roseus* cells *in vitro*. *Planta Med*, 1984; 50, pages 497–502.

Mihaliak C, Karp F, Croteau R. Cytochrome P450 terpene hydroxylases. In PJ Lea, eds, *Methods in Plant Biochemistry, Vol 9: Enzymes of Secondary Metabolism*. Academic Press, London, 1993; pages 261–279.

Mikami M, Kitahara M, Kitano M, Ariki Y, Mimaki Y and Sashida Y, Yamazaki M, Yui S. Suppressive activity of lycoricidinol (narciclasine) against cytotoxicity of neutrophil-derived calprotectin, and its suppressive effect on rat adjuvant arthritis model. *Biol Pharm Bull*, 1999; 22, pages 674–678.

Mizukami, Hajime, Tabira, Ellis, Brian E. Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 1993; 12(12), pages 706–9.

Morini S, D'onofrio C, Bellocchi G, Fischella M. Effect of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from *in vitro* cultured quince leaves. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2000; 63, pages 47–55.

Mueller MJ, Brodchelm W, Spannagl E, Zenk MH. Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90, pages 7490–7494.

Mujib A, and Samaj J. eds. *Somatic Embryogenesis, Plant Cell Monographs*. Berlin; Springer-Verlag, 2005; 2, pages 305–320.

Murashige T, and Skoog F. A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco culture. *Physiol Plant*, 1962; 15, pages 473–497.

Nef C, Rio B, and Chrestin H. Induction of catharanthine synthesis and stimulation of major indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* cells under non-growth-altering treatment with *Pythium vexans* extracts. *Plant Cell Reports*, 1991; 10, pages 26–29.

Nojiri H, Sugimori M, Yamane H, Nishimura Y, Yamada A, Shibya N, Kodama O, Murofushi N, Omori T. Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced hytoalexin production in suspension-cultures rice cells. *Plant physiol*, 1996; 110, pages 387–392.

Pasquali G, Porto DD and Fett-Neto AG. Metabolic engineering of cell culture versus whole plant complexity in production of bioactive monoterpene indole alkaloids: Recent progress related to old dilemma. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006; 101(4), pages 287–296.

Pavlov A, Berkov S, Courot E, Gocheva T, Tuneva D, Pandova B, Georgieva M, Georgiev V, Yanev S, Burrus M and Ilieva M. Galanthamine production by *Leucojum aestivum* *in vitro* systems. *Process Biochemistry*, 2007; 42(4), pages 734–739.

Pelletier SW. The nature and definition of an alkaloid. In: *Alkaloids. Chemical and Biological Perspectives*, New York: John Wiley & Sons, (Pelletier, S. W., ed.) 1983; 1 pages 1–31.

Phillipson David J. *Phytochemistry and Pharmacognosy*. *Phytochemistry*, 2007; 68, pages 2960–2972.

Pridham JB, and Swain T. In “biosynthesis pathways in higher plants”. *Proceedings of the plant phenolics group symposium leeds*. April 1964. Academic press. London and New york, page 209.

Ptak A, Bach A. Somatic embryogenesis in tulip (*Tulipa gesneriana* L.) flower stem cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 2007 ; 43, pages 35–39.

Ptak A. Somatic Embryogenesis in *In Vitro* Culture of *Leucojum vernum* L. In: *Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants*. Series: *Methods in Molecular Biology*, 2009; 589, pages 223–233.

Pua EC. In *Morphogenesis in Plant Tissue Cultures*; Soh W.Y. and Bhojwani S.S., Eds.; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999; pages 255–303.

Richter G. Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, 1993 ; pages 526.

Ritter E, Angulo B, Riga P, Herran J, San Jose M. Comparison of hydroponic and aeroponic cultivation systems for the production of potato minitubers. *Potato Research*, 2001; 44, pages 127–135.

Rouleau J and Guillou C. Synthesis of deuterium-labelled (–)-galanthamine. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 2008; 51(5), pages 236–238.

Sage OD, Lynn J, Hammatt N. Somatic embryogenesis in *Narcissus* cvs. Golden harvest and St. Keverne. *Plant Sci*, 2000; 150, pages 209–216.

Santos BVO, Da Cunha EVL, Chaves MCO and Gray AI. Phenylalkanooids from piper *Marginatum*. *Phytochemistry*, 1998; 49(5), pages 1381.

Santos BVO, Da Cunha EVL, Chaves MCO, Gray AI. Croweacin from *Piper marginatum*. *Biochem Syst Ecol*, 1997; 25, pages 471.

Sato F, Hashimoto T, Hachiya A, Tamura KI, Choi KB, Morishige T, Fujimoto H & Yamada Y: Metabolic engineering of plants alkaloid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98 (1): 367–372.

Sauerwein M, and Shimomura K. Alkaloid production in hairy roots of *Hyoscyamus albus* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Phytochemistry*, 1991; 30, pages 3277–3280.

Selles M, Bergonon S, Viladomat F, Bastida J, Codina C. Effect of sucrose on growth and galanthamine production in shoot-clump cultures of *Narcissus confusus* in liquid-shake medium. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 1997; 49, pages 129–38.

Sener B, Orhan I and Satayavivad J. Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytother Res*, 2003; 17, pages 1220–1223.

Shakirov R, Telezhenetskaya MV, Bessonova IA, Aripova SF, Israilov IA and Sultankhodzhaev MN, Vinogradova VI, Akhmedzhanova VI, Tulyaganov TS, Salimov BT and Tel'nov VA. Alkaloids, plants, structures, properties. *Chem Nat Compounds*, 1996; 32, pages 596–675.

Sheppard DC, Doedt T, Chiang LY, Kim HS, Chen D, Nierman WC and Filler SG. The *Aspergillus fumigatus* StuA protein governs the upregulation of a discrete transcriptional program during the acquisition of developmental competence. *Molecular Biology of the Cell*, 2005; 16(12), pages 5866–5879.

Shibli R, Smith MAL and Kushad M. Headspace ethylene accumulation reduced secondary metabolite production in *Vaccinium pahalae* cell culture. *Plant Growth Regulation*, 1997; 23, pages 201–205.

Siah CL and Doran PM. Enhanced codeine and morphine production in suspended *Papaver somniferum* cultures after removal of exogenous hormones. *Plant Cell Reports*, 1991; 10, pages 349–353.

Simpkins I. The nature of biochemistry. In: *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. Fifth Edition (Wilson, K. and Walker, J., eds), Cambridge: Cambridge University Press, 2000; pages 1–79.

Songstad DD, Armstrong CL, and Petersen WL. AgNO₃ Increases Type II Callus Production from Immature Embryos of Maize Inbred B73 and Its Derivatives. *Plant Cell Reports*, 1991; 9, pages 699–702.

Staikidou I, Selby C, Hanks GR. Development of a medium for *in vitro* culture of *Galanthus* species based on the mineral composition of bulbs. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2006; 81(3), pages 537–545.

Staikidou I, Watson S, Harvey BMR, Selby C. *Narcissus* bulblet formation *in vitro*: effects of carbohydrate type and osmolarity of the culture medium. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2005; 80, pages 313–20.

Stanilova MI, Molle ED, Yanev SG. Galanthamine production by *Leucojum aestivum* cultures *in vitro*. In: Geoffrey A. Cordell, Editor(s), *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Academic Press, 2010; 68, pages 167–270.

Sutinen M-L. Physiological changes in the needles of *Pinus nigra* and *Pinus resinosa* with seasonal changes in freezing stress resistance. *Acta Universitatis Ouluensis, Series A* 240. 39 s. Doctoral thesis, 1992.

Szewczyk J, Lewin AH, Carroll FI. An improved synthesis of galanthamine. *J Heterocyclic Chem*, 1988; 25, pages 1809–1811.

Tabata H. Paclitaxel production by plant-cell-culture technology. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2004; 87, pages 1–23.

Tadeusz Aniszewski. *Alkaloids – Secrets of Life*. Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. First edition 2007 Elsevier B.V. ISBN-13: 978-0-444-52736-3.

Takayama S, Amo T, Fukano M. Rapid clonal propagation of *Hyacinthus orientalis* bulbs by shake culture. *Sci Hortic*, 1991; 45, pages 315–321.

Tamari G, Borochoy A, Atzorn R, Weiss D. Methyl jasmonate induces pigmentation and flavonoid gene expression in petunia corollas: a possible role in wound response. *Physiologia Plantarum*, 1995; 94(1), pages 45–50.

Touchon J, Portet F. *La maladie d'Alzheimer*. Paris : Masson, coll. Consulter/ prescrire, 2002 ; pages 173.

Touno K, Tamaoka J, Ohashi Y, Shimomura K. Ethylene induced shikonin biosynthesis in shoot culture of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Physiol Biochem*, 2005; 43, pages 101–105.

Tudzynski P, Holter K, Correia T, Arntz C, Grammel N and Keller U. Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Molecular and General Genetics*, 1999; 261, pages 133–141.

Turova AD & Sapozhnikova EN: *Medicinal plants of URSS and their application*. *Meditisina*. Moscow, 1982; pages 60–63 (in Russian).

Tyler RT, Eilert U, Rijnders CO, Roewer IA and Kurz WGW. Semicontinuous production of sanguinarine and dihydrosanguinarine by *Papaver somniferum* L. cell suspension cultures treated with fungal homogenate. *Plant Cell Reports*, 1988; 7, pages 410–413.

Vain P, Yean H, and Flament P. Enhancement of Production and Regeneration of Embryogenic TypeII Callus in *Zea mays* L. by AgNO₃. *Plant Cell Tiss and Org Cult*, 1989; 12, pages 143–151.

Verpoorte R, Contin A, Memelink J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem Rev*, 2002; 1(1), 13–25.

Verpoorte R, van der Heijden R, ten Hoopen HJG, Memelink J. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnol. Lett.*, 1999; 21, pages 467–479.

Verpoorte R, van der Heijden R, Van Gulik WM & ten Hoopen HJG. Plant biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospects. Brossi A. (ed) *The alkaloids*, Academic Press, San Diego, 1991; 40, pages 1–187.

Waller GR and Dermer OC. Enzymology of alkaloid metabolism in plants. In: *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive treatise. Vol 7: Secondary Plant Products* (Conn, E. E., ed.), London: Academic Press, 1981; pages 317–402.

Weniger B, Italiano L, Beck JP, Bastida J, Bergoñon S, Codina C, Lobstein A, Anton R. Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med*, 1995; 61, pages 77–79.

Yahia A, Kevers C, Gaspar T, Chénieux JC, Rideau M, Crèche J. Cytokinins and ethylene stimulate indole alkaloids accumulation in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* by two distinct mechanisms. *Plant Sci*, 1998; 133, pages 9–15.

Yoshida S. Changes in Microsomal Enzymes and Phospholipid during Dehardening in Stem Bark of Black Locust. *Plant Physiol*, 1976; 57, pages 710–715.

Zabetakis I, Edwards R, O'Hagan D. Elicitation of torpane alkaloids biosynthesis in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Phytochemistry*, 1999; 50, pages 53–56.

Zenk MH. Biosynthesis of alkaloids using plant cell cultures. *Recent Advances in Phytochemistry*, 1989; 23, pages 429–457.

Zhang C, Qiong Y, Cheuk W, Wu J. Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture by Ag⁺ and nutrient feeding. *Planta Med*, 2004; 70, pages 147–151.

Zhang CH, Wu JY. Ethylene inhibitors enhance elicitorinduced paclitaxel production in suspension cultures of *Taxus* spp. cells. *Enzyme Microb Technol*, 2003; 32, pages 71–77.

Zhou LG and Wu JY. Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. *Natural product Reports*, 2006; 23(5), pages 789–810.

Annexes

Annexe 1

Composition du milieu de culture Knop

Sels minéraux	Formule chimique	Grammes par litre d'eau
Nitrate de calcium	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1 g
Nitrate de potassium	KNO_3	0,25 g
sulfate de magnésium	MgSO_4	0,25 g
phosphate monopotassique	KH_2PO_4	0,25 g
Chlorure ferrique	FeCl_3	0,001 g
Eau distillée	H_2O	1000 mL

Annexe 2

Composition du milieu de culture végétale MS60 (Murashige & Skoog, 1962)

Solutions mères	Eléments	Concentration (mg/L)
Macro-éléments	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	440
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
FeEDTA	Na ₂ EDTA	37,3
	FeSO ₄ , 7H ₂ O	27,8
Micro-éléments	MnSO ₄ , 4H ₂ O	16,9
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8,6
	H ₃ BO ₃	6,2
	Na ₂ MoO ₄ , H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ , 6H ₂ O	0,025
Iodure de potassium	KI	0,83
Vitamines	Inositol	100
	Acide nicotinique	0,5
	Pyridoxine HCl	0,5
	Thiamine HCl	0,1
	Glycine	2
Calcium	CaCl ₂ , 2H ₂ O	440

pH = 5,8

Le milieu solide est obtenu par ajout de 8 g/ L d'agar avant la stérilisation.

Communications Scientifiques

LISTE DES ARTICLES SCIENTIFIQUES

- A. **El Tahchy**, S. Bordage, A. Ptak, F. Dupire, E. Barre, C. Guillou, M. Henry, Y. Chapleur, and D. Laurain-Mattar. Effect of Sucrose and Growth Regulators on Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Alkaloids Accumulated in Amaryllidaceae Tissue Cultures. Submitted to Plant Cell Tiss and Org Cult October 2010.
- A. **El Tahchy**, M. Boisbrun, A. Ptak, F. Dupire, F. Chrétien, M. Henry, Y. Chapleur and D. Laurain-Mattar. New method for the study of the Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis using biotransformation of deuterium-labelled precursor in tissue cultures. Acta biochimica Polonica 2010; 57(1):75-82.
- A. Ptak , **A. El Tahchy**, G. Wy_zgolik, M. Henry and D. Laurain-Mattar. Effects of ethylene on somatic embryogenesis and galanthamine content in *Leucojum aestivum* L. cultures. Plant Cell Tiss Organ Cult 2010; 102(1) 61-67.
- A. Ptak, **A. El Tahchy**, F. Dupire, M. Boisbrun, M. Henry, Y. Chapleur, M. Moś and D. Laurain-Mattar. LCMS and GCMS for the Screening of Alkaloids in Natural and *in Vitro* Extracts of *Leucojum aestivum*. J Nat Prod 2009, 72 (1), pp 142–147.

LISTE DES COMMUNICATIONS ORALES

- Biotransformation of deuterium-labeled-4'-*O*-methylnorbelladine in *Leucojum aestivum* tissue cultures studies using LCMS and GCMS. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ISCNP&ISDNP, "The application of analytical methods for the development of natural products"; June 14-17, 2010, **Lublin, Poland**
- Étude de la voie de biosynthèse de la galanthamine chez *Leucojum aestivum*. Séminaire du Groupe SUCRES, UMR 7565, UHP-Nancy1, April^{3rd} 2010 ; **France**
- Identification d'alcaloïdes extraits de bulbes *in vivo* et *in vitro* d'Amaryllidaceae – Activité biologique. FS-USJ Mar-Roukoz, February^{27th} 2010; **Liban**
- Extraction et identification d'alcaloïdes isoquinoléiques inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Assemblée générale de l'UMR 7565, UHP-Nancy1, March^{11th} 2010 ; **France**
- Biotransformation of deuterium-labelled-4'-*O*-methylnorbelladine in *Leucojum aestivum* tissue cultures followed by LCMS and GCMS. SESAMES Scientific Journey, October 8th 2009, **France**

LISTE DES POSTERS

- Anna El Tahchy**, Ismael Muñoz, Charlotte Geny, Sakina Yagi, François Dupire, Elvina Barre, Catherine Guillou, Max Henry, Yves Chapleur, Dominique Laurain-Mattar. Alkaloid screening by GCMS and Acetylcholinesterase inhibitory activity of Amaryllidaceae plants. 4e journées internationales de l'AFERP- 3e symposium France-Pakistan, July 15th – 18th 2010, **Besançon, France**
- A. El Tahchy**, S. Bordage, A. Ptak, F. Dupire, E. Barre, C. Guillou, M. Henry, Y. Chapleur, and D. Laurain-Mattar. Influences of sucrose and growth regulators on Amaryllidaceae alkaloids accumulation in *in vitro* cultures and on their acetylcholinesterase inhibitory activities. SMAP conference, Sep 2009; **Grenoble, France**
- A. El Tahchy**, M. Boisbrun, A. Ptak, F. Dupire, F. Chrétien, M. Henry, Y. Chapleur, and D. Laurain-Mattar. Biotransformation of deuterium-labelled-4'-*O*-methylnorbelladine in *Leucojum aestivum* tissue cultures followed by LCMS and GCMS. The International Conference On Saponins "New Trends In Saponins", July 8th-11th 2009; **Nancy, France**
- A. El Tahchy**. Etude de la voie de biosynthèse de la galanthamine, médicament de la maladie d'Alzheimer. Doctoriales de Lorraine, May 24th-29th 2009 ; St Dié les Vosges, France
- A. Ptak, **A. El Tahchy**, F. Dupire, M. Boisbrun, M. Henry, Y. Chapleur, M. Moś, D. Laurain-Mattar. LC-MS and GC-MS of alkaloids in bulbs and *in vitro* cultures of *Leucojum aestivum* L. Natural Products congress, August 3th-8th 2008 **Athens, Greece**
- A. El Tahchy**, S. Bordage, A. Ptak, F. Dupire, M. Boisbrun, M. Henry, Y. Chapleur, M. Moś, D. Laurain-Mattar. Analyses par LC-MS et GC-MS de la galanthamine et de la lycorine à partir d'extraits de plantes. SFC Grand-Est Congress, March 2008 ; **Nancy, France**

Résumé

La galanthamine est un alcaloïde isoquinoléique, utilisé dans le monde entier pour le traitement palliatif de la maladie d'Alzheimer en raison de son pouvoir inhibiteur de l'acétylcholinestérase. Cet alcaloïde est extrait à partir de bulbes d'Amaryllidaceae, *Leucojum aestivum*, *Galanthus nivalis*, et *Narcissus sp.* ou obtenu par synthèse chimique. La difficulté principale de cette dernière réside dans le respect de la configuration des centres d'asymétrie. La culture de tissus *in vitro* pourrait constituer une alternative intéressante pour obtenir ce composé à haute valeur ajoutée. Le premier objectif de ce projet, vise à améliorer l'accumulation de cet alcaloïde par les biais des biotechnologies. Le second objectif est de rechercher par criblage phytochimique (HPLC, LCMS, GCMS, et HPTLC-MS) de bulbes *in vitro* et *in vivo* d'Amaryllidaceae, de nouveaux alcaloïdes biologiquement actifs. Le troisième objectif porte sur l'étude de la voie de biosynthèse en vue de réaliser une synthèse biomimétique de la galanthamine. Nous avons établi des cultures *in vitro* de 3 espèces d'Amaryllidaceae. La variation des paramètres exogènes a conduit à une accumulation accrue d'alcaloïdes (0,02 à 0,2 % MS). Le criblage phytochimique a conduit à l'identification d'alcaloïdes nouveaux issus des cultures *in vitro*, n'existant pas *in vivo*, et présentant un puissant pouvoir inhibiteur de l'acétylcholinestérase (40 à 80 % Inh). L'ajout, de la 4'-O-méthyl-d₃-norbelleadine aux cultures *in vitro* a conduit à sa métabolisation en trois types d'alcaloïdes deutérés. Une stimulation de la synthèse et du relargage de la galanthamine native (0,15 % MS et 0,16 % Milieu) a été observée en présence du précurseur deutéré.

Mots clés : Amaryllidaceae, analyse phytochimique, galanthamine, biotransformation, précurseurs deutérés, acétylcholinestérase.

Abstract

Galanthamine is an Amaryllidaceae alkaloid used worldwide for the symptomatic treatment of Alzheimer's disease because of his capacity to inhibit the acetylcholinesterase enzyme. There are two galanthamine sources for medical applications. One is the total synthesis, a complicated process because galanthamine has three asymmetric carbons, requiring stereochemically controlled synthesis. Galanthamine is also extracted from bulbs of some Amaryllidaceae such as *Leucojum aestivum*, *Galanthus nivalis*, and *Narcissus sp.*. The first aim of this work is to improve the accumulation of this alkaloid using biotechnologies. The second aim consists on the phytochemical screening (HPLC, LCMS, GCMS, et HPTLC-MS) of *in vivo* and *in vitro* Amaryllidaceae bulbs, in order to identify new alkaloids with important pharmacological activities. Finally, the third aim concerns the study of the biosynthesis pathway in order to establish a biomimetic synthesis of galanthamine. Therefore, we established *in vitro* cultures of three Amaryllidaceae species. The variation of exogenous parameters led to the obtainment of high galanthamine accumulation (0.02 to 0.2 % DW). The phytochemical screening showed new alkaloids in extracts of *in vitro* cultures, which did not exist in *in vivo* extracts, and possessing high acetylcholinesterase activity (40 to 80 % Inh). The 4'-O-methyl-d₃-norbelleadine is incorporated into three different groups of Amaryllidaceae alkaloids. The addition of the labelled precursor to shoot cultures stimulated the synthesis of native galanthamine (0.15 % DW and 0.16 % Culture medium).

Key words: Amaryllidaceae, phytochemical analysis, galanthamine, biotransformation, deuterium labelled precursors, acetylcholinesterase.

Title: The Study of galanthamine biosynthesis pathway in *Leucojum aestivum* L. – Phytochemical screening of some Amaryllidaceae plants.