



HAL
open science

Étude de la production de métabolites secondaires par des cultures in vitro de Psoralées (leguminosae)

Virginie Bouque

► **To cite this version:**

Virginie Bouque. Étude de la production de métabolites secondaires par des cultures in vitro de Psoralées (leguminosae). Agronomie. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1997. Français. NNT : 1997INPL019N . tel-01750937

HAL Id: tel-01750937

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750937v1>

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

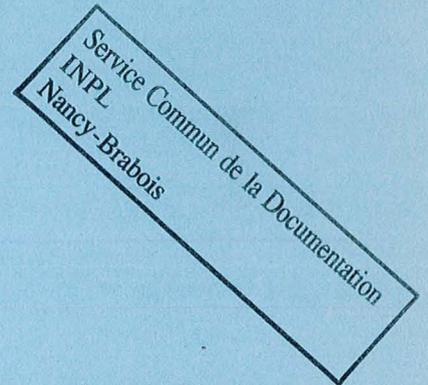
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

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

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

97 INPL 018N

Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL)
Ecole Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
Laboratoire Agronomie et Environnement



Mémoire de thèse présenté en vue
de l'obtention du diplôme de
Doctorat de l'INPL
en Sciences Agronomiques

par **Virginie BOUQUE**

**Etude de la production de métabolites secondaires
par des cultures *in vitro* de Psoralées (*Leguminosae*)**

Mémoire soutenu publiquement le 18 Février 1997
devant un jury composé de :

M. Guckert A., Professeur à l'ENSAIA (Directeur de Thèse)
Mme Sangwan B., Professeur à l'Université d'Amiens (Rapporteur)
Mme Marc A., Directeur de Recherches au CNRS (Rapporteur)
Mme Kallerhoff J., Maître de Conférences à l'ENSAT (Rapporteur)
Mlle Poutaraud A., Ingénieur de Recherches à l'INRA de Colmar (Examineur)
M. Henry M., Professeur à la Faculté de Pharmacie de Nancy (Examineur)
M. Bourgaud F., Maître de Conférences à l'ENSAIA (Examineur)



D 136 009187 9

1360091879

37INPL 0197

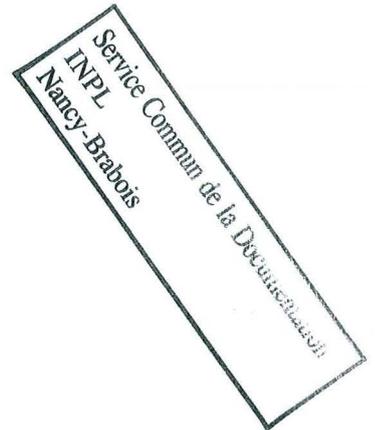
[M] 1992 BOUQUE, V.

Institut National Polytechnique de Lorraine (INPL)
Ecole Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
Laboratoire Agronomie et Environnement



Mémoire de thèse présenté en vue
de l'obtention du diplôme de
Doctorat de l'INPL
en Sciences Agronomiques

par **Virginie BOUQUE**



**Etude de la production de métabolites secondaires
par des cultures *in vitro* de Psoralées (*Leguminosae*)**

Mémoire soutenu publiquement le 18 Février 1997
devant un jury composé de :

M. Guckert A., Professeur à l'ENSAIA (Directeur de Thèse)
Mme Sangwan B., Professeur à l'Université d'Amiens (Rapporteur)
Mme Marc A., Directeur de Recherches au CNRS (Rapporteur)
Mme Kallerhoff J., Maître de Conférences à l'ENSAT (Rapporteur)
Mlle Poutaraud A., Ingénieur de Recherches à l'INRA de Colmar (Examineur)
M. Henry M., Professeur à la Faculté de Pharmacie de Nancy (Examineur)
M. Bourgaud F., Maître de Conférences à l'ENSAIA (Examineur)

A mon Grand-Père, Mathias,

Pour mes parents,

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire Agronomie et Environnement associé INRA, de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires de Nancy (ENSAIA). Il résulte d'un effort collectif et n'aurait pas pu aboutir sans la confiance, les compétences et l'amitié de nombreuses personnes. J'aimerais avant toute chose leur dire : « Merci ».

Je tiens, en premier lieu, à remercier Monsieur Armand Guckert, Professeur à l'INPL, et Directeur du laboratoire, qui m'a accordé toute sa confiance en me proposant cette étude. Il a suivi mes travaux avec intérêt, tout en préservant l'autonomie nécessaire à l'apprentissage du travail de recherche.

Je suis particulièrement reconnaissante à Madame Brigitte Sangwan, Professeur au Laboratoire d'Androgenèse et Biotechnologie de l'Université de Picardie (Amiens) qui a bien voulu examiner et juger mon travail.

Je remercie également Madame Annie Marc, Directeur de Recherches au CNRS, ainsi que Madame Jean Kallerhoff, Maître de Conférences à L'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Toulouse (Spécialité Biotechnologie), qui ont toutes deux accepté de consacrer un temps précieux à l'examen de mes travaux.

J'aimerais exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur Max Henry, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Nancy qui a accepté d'examiner l'ensemble des travaux que nous avons pu réaliser aux cours de cette étude.

Mes remerciements s'adressent enfin à Mademoiselle Anne Poutaraud, Ingénieur de Recherches à l'INRA de Colmar, qui a accepté d'examiner ce document et de participer au jury qui déterminera l'intérêt de notre travail.

Parce que cette étude est autant le fruit de son travail que du mien, je tiens à exprimer toute ma gratitude à Frédéric Bourgaud. Il m'a initiée et formée à la thématique complexe de la production de métabolites secondaires par les Psoralées. Par sa grande disponibilité, son enthousiasme et ses compétences, il a transformé cette étude en une passionnante aventure de quatre années.

Durant ces trois années de thèse, j'ai également été soutenue dans mon travail par de nombreuses personnes dont la disponibilité et la sympathie m'ont été d'un grand secours.

Je tiens beaucoup à associer à ce travail :

Sylvana André (DEA 1993) et Anja Nöke, étudiante allemande en Ecole d'Ingénieur, qui ont réalisé un travail remarquable en initiant un soucier de cals à partir de cinq espèces de Psoralées. Leur bonne humeur et leur sympathie ont fait de cette collaboration scientifique un échange culturel fructueux,

Pierre-Henri Clergeot (DAA 1993), qui a mené avec beaucoup d'à-propos l'étude de la production des métabolites secondaires par la plante entière de *Psoralea cinerea*. Son intérêt pour la recherche s'est manifesté par une volonté de compréhension évidente, et les résultats obtenus en témoignent,

Les étudiants en Classe Préparatoire Polytechnique, qui ont contribué à cette étude pour des temps brefs mais avec une remarquable volonté d'apporter toute l'aide possible, ainsi que Louis, Frank (Maîtrise à la Faculté des Sciences de Nancy), et Louardi (BTS Biotechnologie) qui ont choisi de consacrer leur stage à la thématique des cultures *in vitro* de Psoralées,

J'associe également à cette étude Amina, M. F. Susset et sa patience, A. M. Claude et son attachement à la Bretagne, Dominique et ses bricolages astucieux, Patrice et son bon sens, ainsi que Michel et sa maîtrise du procédé de lyophilisation...

Enfin, cette thèse m'a permis de partager quatre années avec des personnes qui sont devenues bien plus que des collègues de laboratoire :

Un merci tout particulier à Emile, Christophe N. et Philippe pour leur soutien moral dans les instants de doute ; merci également à Christine, André, Christophe R. et Denis ...

Mes plus sincères remerciements à celles dont l'humeur joyeuse et le sens de l'amitié ont fait de ce laboratoire un lieu de travail si particulier : Anne, Kathy, Myriam, Marie-Pierre et Valérie, Gwenola, Virginie-la-Petite (!), Patricia, ainsi que Joëlle et Vinciane. Je leur dois beaucoup plus que des mots ne pourraient l'exprimer. Je n'oublie pas non plus les 'petites dernières', Armelle, Christine, Magali et Muriel qui, je l'espère, éprouveront autant de plaisir que nous toutes à travailler dans cette ambiance qu'elles sauront maintenir chaleureuse...

Résumé

Les furocoumarines linéaires sont des molécules photosensibilisantes qui présentent une réelle importance économique de par leur utilisation en pharmacologie. Le coût de la synthèse chimique de ces composés conduit à envisager un approvisionnement à partir de ressources végétales. Dans cette optique, des études ont été engagées sur la possibilité d'utiliser des cultures *in vitro* de plantes du genre *Psoralea*.

Un soucier de 131 cals provenant de *Psoralea cinerea* ainsi que des cultures de racines issues de la transformation de huit espèces de Psoralées par *Agrobacterium rhizogenes* ont été initiées (Nguyen, 1992), et analysées par CLHP. Aucune trace de furocoumarine n'a pu être détectée. En revanche, nous avons pu mettre en évidence la présence de daidzéine et de coumestrol dans ces deux types de cultures *in vitro*. Une analyse de la plante entière de *Psoralea cinerea*, révèle un profil métabolique très différent de celui des cultures *in vitro* : les teneurs en furocoumarine sont importantes et localisées préférentiellement dans les parties aériennes, alors que la daidzéine est localisée en quantité plus faible au niveau des racines. Les isoflavonoïdes et les furocoumarines ayant des voies biosynthétiques en partie commune, l'hypothèse d'une altération de la régulation enzymatique a été émise. Plusieurs traitements ont été testés pour tenter de rétablir de façon simple la synthèse des furocoumarines, sans toutefois y parvenir.

Devant l'intérêt présenté par la daidzéine (applications thérapeutiques dans la prévention des cancers hormonaux-dépendants), nous nous sommes attachés à améliorer la production de ce métabolite par les cultures *in vitro*. L'élargissement du soucier de cals à d'autres espèces de Psoralées, ainsi que des modifications des paramètres et de la composition des milieux de culture ont été envisagés. Il s'avère qu'aucun des traitements éliciteurs testés ne permet d'améliorer la production des isoflavonoïdes recherchés. En revanche, la variabilité génétique exprimée par les cals provenant des diverses espèces mise en culture permet de mettre en évidence des souches hyperproductives. En ce qui concerne les racines transformées, une étude approfondie de la souche RTLach5 permet de montrer que la production des isoflavonoïdes est fortement corrélée à la production de biomasse, ainsi qu'à l'âge de l'explant analysé.

Deux objectifs sont désormais envisageables : déterminer les conditions de culture qui permettront d'optimiser la production des isoflavonoïdes détectés, et procéder à une étude approfondie de la voie biosynthétique des furocoumarines chez les Psoralées en vue de comprendre l'origine des profils métaboliques différents chez la plante entière et les cultures *in vitro*, et de rétablir éventuellement la synthèse des furocoumarines par les cultures de cals et de racines transformées.

Mots-clés : *Psoralea*, furocoumarine, isoflavonoïde, daidzéine, cal, racine transformée, métabolisme secondaire

Abstract

Linear furocoumarins are photosensitizing compounds of a real economical importance because of their use in pharmacology. The very expensive chemical synthesis of these compounds leads to consider their production by plant material. Thus, we studied *in vitro* culture of plants belonging to *Psoralea* genus.

Callus strains from *Psoralea cinerea* and hairy root cultures from eight *Psoralea* species have been established and then analyzed by HPLC. No furocoumarin could be detected. However, we identified daidzein and coumestrol in both *in vitro* cultures. An analysis of the whole plant reveals a very different metabolic pattern : furocoumarins are detected in great concentration in aerial parts when daidzein is identified in roots only in small quantities. Since both furocoumarin and isoflavonoid biosynthetic pathways belong to the phenylpropanoid metabolism, we hypothesized that a twist of the enzymatic control could occur. Several treatments have been tested to restore furocoumarin synthesis, but without results.

Daidzein is a compound of a real pharmaceutical interest because of its antioxidant activities which confer it a therapeutic applying in cancer prevention. As a consequence, we have intended to enhance its production by *in vitro* cultures. Establishment of callus strains from various *Psoralea* species, as well as the alteration of culture parameters and medium composition have been considered. None of the elicitor treatment can be proved efficient. However, the genetic variability expressed by callus lines from *Psoralea* species allows to point out the presence of high producing strains. As regards hairy root cultures, the study of RTLach5 strain show that isoflavonoid synthesis is highly correlated with the biomass production and the age of the culture.

Next studies will be drawn towards the optimisation of the isoflavonoid production, and the acknowledgement of the furocoumarin biosynthetic pathway in order to understand the origin of the different metabolic patterns of *in vitro* and whole plant cultures on one hand, and to restore furocoumarin synthesis by callus and hairy root cultures of *Psoralea* species on the other hand.

Key-words : *Psoralea*, furocoumarin, isoflavonoid, daidzein, callus, hairy root, secondary metabolism

GLOSSAIRE

Cal : Amas de cellules indifférenciées, de type embryonnaire, issues de plusieurs cellules de l'explant de départ, et se développant de façon désorganisée.

Nous parlerons de *souches* de cals.

Racine transformée : organe génétiquement modifié résultant de l'intégration dans le génôme de la cellule végétale, de l'ADN de transfert issu du plasmide Ri d'*Agrobacterium rhizogenes*.

Nous parlerons de *souches* ou de *lignées* de racines transformées, chaque racine fille étant un clone de la racine mère.

Métabolites secondaires : substances spécifiques (caractéristiques d'une espèce) qui ne sont pas synthétisées par les circuits du métabolisme primaire de base, qui, elles, sont communes à de grands groupes de plantes (métabolisme énergétique par exemple).

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Kossel, en 1891 est le premier à employer le terme de 'métabolite secondaire' qu'il définit alors en ses termes : « (...) alors que les métabolites primaires existent dans toutes les cellules végétales capables de se diviser, les métabolites secondaires ne sont présents que de façon 'accidentelle' et ne sont pas essentiels à la vie de la plante ». Kossel a par la suite établi une distinction entre ces deux types de métabolites, toujours valable aujourd'hui. Les métabolites primaires sont des composés de faible poids moléculaire, communs à toutes les plantes. Il en existe quelques centaines, tels les acides aminés ou les acides nucléiques. En revanche plusieurs dizaines de milliers de métabolites secondaires ont pu être identifiés, et s'avèrent spécifiques d'une famille, voire d'une espèce de plante (Rhodes, 1994).

Les fonctions physiologiques précises des métabolites secondaires sont très discutées. On leur attribue des propriétés d'attraction de pollinisateur, de défense contre des agents pathogènes, des prédateurs ou encore contre des facteurs de contrainte liées à leur environnement direct : UV, température... (Bell, 1980). Plus récemment, les métabolites secondaires ont été envisagés comme des molécules transductrices de signaux cellulaires. Ainsi, l'acide salicylique serait le messenger impliqué dans le processus de résistance systémique acquise chez le tabac et le concombre, processus selon lequel une feuille infectée par un agent pathogène transmet un signal moléculaire à la feuille saine qui active, en réponse, des mécanismes de défense lui permettant de résister à l'infection (Malamy *et al.*, 1990 ; Métraux *et al.*, 1990).

La nature chimique très variée des métabolites secondaires est à l'origine de leurs propriétés odoriférantes ou colorantes, ainsi que de leurs vertus thérapeutiques connues depuis des temps reculés.

L'homme les utilise entre autres comme arômes, colorants, additifs alimentaires et comme matières actives dans de nombreux médicaments. Les plantes produisant ces molécules sont désormais recherchées et cultivées de manière intensive lorsque cela est possible (pavot, digitale...). Cependant, de nombreuses contraintes, qu'elles soient d'ordre climatique, politique ou liées à la complexité des procédés d'extraction, altèrent la quantité et la qualité de la production (Curtin, 1983). La synthèse chimique, également envisagée par ailleurs, est souvent trop onéreuse pour être rentable. Elle est, par ailleurs, souvent impossible compte tenu de la complexité chimique de ces molécules. De plus, nous assistons depuis une dizaine d'années à un regain d'intérêt pour les molécules dites 'naturelles'. Dès lors, et compte tenu des enjeux économiques, la production de métabolites secondaires par un matériel végétal cultivé *in vitro* devient potentiellement intéressante.

Les connaissances dans le domaine de la culture *in vitro* ont moins d'un siècle (Haberlandt, 1902), et se sont très largement développées depuis les années 1960. Les applications de ces techniques étaient alors d'ordre agronomique (Murashige, 1978). Désormais, les industriels envisagent les cultures de matériel végétal pour la production de molécules économiquement rentables, destinées aux domaines de la pharmacie, de la cosmétique ou de l'agroalimentaire.

Les furocoumarines font partie de cette catégorie de molécules. Ces composés possèdent en effet des propriétés biologiques qui ont conduit à de nombreuses applications médicales. Présentes dans plusieurs familles de plantes, les furocoumarines destinées à l'industrie pharmaceutique proviennent actuellement de la culture d'*Ammi majus* et de *Citrus bergamia* (bergamote). Cependant, devant la demande qui ne cesse de croître en raison de la découverte de nouvelles propriétés thérapeutiques, d'autres ressources naturelles ont dû être envisagées.

Des travaux réalisés par Bourgaud *et al.* (1989) ont permis de mettre en évidence l'intérêt des plantes de la famille des Psoralées pour la production de furocoumarines, et font depuis lors l'objet d'une étude au laboratoire. Après une étape de domestication de la plante entière et d'évaluation du potentiel de production (Bourgaud, 1990), des cultures de cals et de racines transformées ont été établies (Nguyen, 1992).

Les premières analyses réalisées sur ce matériel végétal cultivé *in vitro* n'ont pas permis de détecter les furocoumarines synthétisées par la plante entière. Nous nous sommes par

conséquent attachés à l'étude du métabolisme secondaire développé par les cultures *in vitro* de psoralées.

Après avoir abordé les éléments bibliographiques relatifs aux molécules et au matériel végétal impliqués dans cette étude, nous présenterons successivement les trois axes de recherche selon lesquels nous avons choisi d'orienter nos travaux.

ELEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES

ÉLÉMENTS BIBLIOGRAPHIQUES

Nous présenterons ici les éléments de bibliographie qui nous semblent indispensables à la compréhension du travail que nous avons effectué. Nous nous intéresserons en premier lieu à décrire les plantes du genre *Psoralea*, étudiées depuis maintenant plusieurs années au laboratoire dans le cadre d'une collaboration avec un laboratoire pharmaceutique. Nous aborderons ensuite une étude relative aux métabolites secondaires synthétisés par ces plantes. Nous nous attacherons particulièrement aux furocoumarines et aux isoflavonoïdes dont les propriétés biologiques, l'intérêt pharmaceutique ainsi que les voies de biosynthèse seront précisés. Dans une troisième partie, nous présenterons les deux approches choisies pour étudier la production de ces métabolites par la culture *in vitro* de Psoralées : la culture de cals, et les racines transformées. Nous envisagerons les différents facteurs intervenant sur l'obtention de ces deux types de matériel végétal, ainsi que sur la production de métabolites secondaires, objet de notre travail.

1. LES PSORALÉES

C'est dans le papyrus de Ebers datant de 1550 av. J.C. que l'on trouve les premières références aux Psoralées. On y mentionne le traitement du vitiligo, maladie caractérisée par la dépigmentation de certaines zones de la peau, par des graines de *Psoralea coryfolia* (Pathak et Fitzpatrick, 1992). Une huile obtenue à partir de ces graines et présentant les mêmes propriétés est décrite dans Atharva Veda, livre sacré hindou ainsi que dans plusieurs manuscrits bouddhistes. L'action curative de ces plantes est due à la présence de deux molécules chimiques de la famille des furocoumarines, le psoralène et l'angélicine. Plus récemment, les travaux d'Innocenti *et al.* (1984) ont révélé les fortes teneurs en psoralène et angélicine, dans les graines de *Psoralea plumosa* et *Psoralea corylifolia* (Tableau 1).

Tableau 1. Teneurs en psoralène et angélicine exprimés en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de matière sèche de graine (d'après Innocenti *et al.*, 1984).

Espèce	Psoralène	Angélicine
<i>Psoralea corylifolia</i>	2443	2317
<i>Psoralea plumosa</i>	2471	3022
<i>Psoralea martinii</i>	347	435
<i>Psoralea pustulata</i>	322	127
<i>Psoralea lachnostachys</i>	296	130
<i>Psoralea cinerea</i>	201	495
<i>Psoralea leucantha</i>	159	295

Ces observations ont conduit les chercheurs à envisager la production de furocoumarines à partir des Psoralées, et à mener des études approfondies sur la biologie des plantes de cette famille.

1.1. Éléments de botanique

D'un point de vue systématique, le genre *Psoralea* Lindl appartient à la famille des Légumineuses, sous famille des *Papillonaceae* (ou *Fabaceae*) et à la tribu des *Psoraleaceae* (Boardley *et al.*, 1986).

Ce genre comprend approximativement 130 espèces réparties sur 5 continents. Ces plantes sont surtout représentées en Afrique du Sud avec 45 espèces (Engler, 1906), en Amérique du Nord avec 30 espèces (Torrey et Gray, 1969), et en Australie avec 15 espèces (Keighery et Dixon, 1981). Cependant, elles sont présentes également en Asie, en Amérique du Sud, en Afrique du Nord et dans le Bassin méditerranéen (Bourgaud *et al.*, 1992). En France, on ne trouve que *Psoralea bituminosa*. Il demeure d'importants problèmes de taxonomie au sein du genre *Psoralea* : l'Amérique et l'Australie n'ont pas fait l'objet d'études aussi exhaustives qu'en Europe et les règles de la classification établies à partir de végétaux européens s'adaptent mal à la flore de ces continents. De plus, des confusions taxonomiques peuvent être commises en raison de la grande variabilité morphologique qui existe au sein d'une même espèce. Des fécondations interspécifiques possibles compliquent encore la détermination des groupes d'appartenance à certaines espèces (Bourgaud *et al.*, 1992 ; 1995).

1.2. Ecophysiologie

La morphologie et l'écophysiologie des Psoralées ont été détaillées par Bourgaud en 1990. Nous reprendrons ici les principales caractéristiques développées dans ses travaux

✓ Cycle végétatif

La longueur des cycles de végétation des Psoralées est très variable. Certaines des espèces australiennes comme *Psoralea martinii*, *Psoralea lachnostachys* ou *Psoralea pustulata* sont pérennes. Elles ont un port buissonnant et peuvent atteindre des tailles allant jusqu'à 3 mètres de haut. D'autres telles que *Psoralea cinerea*, *Psoralea australiasica* ou *Psoralea plumosa* sont assimilées à des plantes de cycle annuel bien qu'elles puissent survivre plusieurs années en fonction des conditions climatiques. Ces espèces ont un port herbacé et des tailles beaucoup plus modestes qui n'excèdent 1m50 de hauteur.

✓ La nodulation

Les Psoralées, en tant que Légumineuses ont la faculté d'établir des relations de type symbiotique avec des bactéries du genre *Rhizobium*, ce qui se caractérise par la présence de nodosités fixatrices d'azote au niveau des racines de ces plantes. Cette aptitude à la nodulation est connue depuis fort longtemps (Laurent, 1891), et il est désormais acquis que les symbiotes naturels des Psoralées sont des bactéries *Bradyrhizobium* (Allen et Allen, 1981). La taille des nodosités formées est variable et peut aller de 1 à 7 mm selon l'espèce (Beadle, 1964).

Les travaux de Bourgaud *et al.* (1992) montrent que la souche CB2063 isolée en Australie à partir d'un pied de *Psoralea cinerea* est la plus efficace pour optimiser la croissance de cette même espèce cultivée en conditions contrôlées. Les biomasses récoltées sont en effet analogues à celles obtenues par une fertilisation azotée de 120 kg d'N/ha.

1.3. Teneurs en métabolites secondaires

Plusieurs études ont été menées depuis une trentaine d'années pour déterminer les teneurs en furocoumarines. En 1962, Pathak *et al.* ont établi une revue bibliographique sur la répartition des furocoumarines dans le règne végétal et rapportent que le genre *Psoralea* ne produit que deux furocoumarines : le psoralène (furocoumarine linéaire) et l'angélicine (furocoumarine angulaire). Innocenti *et al.* (1984) ont réalisé des dosages sur les graines de 7

espèces de Psoralées, avant de s'attacher à l'étude plus précise des teneurs en psoralène et angélicine des feuilles, tiges et racines de *Psoralea glandulosa*, *Psoralea bituminosa*, *Psoralea macrostachya* et *Psoralea onobrychis* (Innocenti *et al.*, 1991). Ils déterminent ainsi que les parties aériennes de *Psoralea glandulosa* et les racines de *Psoralea macrostachya* constituent une source potentielle de furocoumarines en cas de culture à grande échelle de ces 2 espèces. Les parties végétatives de *Psoralea onobrychis* et *Psoralea bituminosa* présentent par contre des rendements trop faibles pour être valorisables (Tableau 2).

Zobel et Brown (1991a) ont pour leur part évalué les teneurs en furocoumarines totales dans les fruits de *Psoralea bituminosa* à 1350 ± 70 ppm de matière fraîche.

Tableau 2. Teneurs en psoralène et angélicine exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière fraîche de feuilles, tiges et racines de 4 espèces de Psoralées (d'après Innocenti *et al.*, 1991).

Espèce	Explant	Psoralène	Angélicine
<i>Psoralea glandulosa</i>	Feuille	875	680
	Tige	575	400
	Racine	65	25
<i>Psoralea macrostachya</i>	Feuille	175	390
	Tige	220	1180
	Racine	200	1115
<i>Psoralea bituminosa</i>	Feuille	75	75
	Tige	25	60
	Racine	75	160
<i>Psoralea onobrychis</i>	Feuille	55	30
	Tige	100	65
	Racine	25	30

Bourgaud *et al.* ont réalisé en 1992 une étude plus approfondie sur les teneurs en furocoumarines dans les différents organes de *Psoralea cinerea*, ainsi que sur la production de ces molécules en fonction des conditions de culture en phytotron et en serre (Tableau 3)

Quelles que soient les conditions de culture, les teneurs en angélicine sont toujours supérieures aux teneurs en psoralène. Si les organes reproducteurs sont plus riches en furocoumarines que les organes végétatifs, les teneurs sont étroitement liées aux conditions de culture et notamment à la nutrition azotée. En effet, que l'apport d'azote soit direct par fertilisation, ou indirect grâce à la fixation symbiotique par *Bradyrhizobium* CB 2063, on peut constater une nette augmentation des teneurs en furocoumarines, et ce, quel que soit l'organe

analysé. L'augmentation des teneurs en psoralène et en angélicine est plus importante en cas d'inoculation avec *Bradyrhizobium*, ce qui pourrait s'expliquer par le déclenchement d'une réponse de type phytoalexine à la présence de la bactérie symbiotique.

La modification des facteurs édaphiques comme l'augmentation des températures ou l'application de contraintes abiotiques telles l'application de CuSO_4 induit également une augmentation des teneurs en furocoumarines dans les organes traités.

Tableau 3. Teneurs en angélicine et psoralène ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de matière sèche) de différents organes de *Psoralea cinerea* cultivés en serre ou en phytotron suivant les différents traitements. Les plantes témoins correspondent à une culture sans inoculation de *Bradyrhizobium* ni fertilisation azotée. (D'après Bourgaud *et al.*, 1990, 1992).

	Cultures en phytotron		Cultures en serre	
	Angélicine	Psoralène	Angélicine	Psoralène
Témoins				
Racines	ND	ND	ND	ND
Feuilles	380	82	304	68
Fruits immatures	ND	ND	ND	ND
Semences	77	5	20	1
CB 2063				
Racines	137	9	ND	ND
Feuilles	1307	416	343	167
Fruits immatures	1697	517	4609	556
Semences	451	133	3962	896
Azote	50 kg/ha		120 kg/ha	
Racines	ND	ND	ND	ND
Feuilles	211	78	ND	ND
Fruits immatures	ND	ND	ND	ND
Semences	1480	485	ND	ND
Températures	(Dosage sur feuilles)		(Dosage sur feuilles)	
31° C	500	140	ND	ND
20° C	175	70	ND	ND
Elicitation	(Dosage sur feuilles)			
Témoin	400	60		
CuSO_4	1050	330		

L'analyse des métabolites secondaires produits par les plantes de la tribu des Psoralées a permis d'identifier également des molécules appartenant à plusieurs familles chimiques différentes. Ainsi, Ockendon *et al.* (1965) ont mis en évidence la présence de près de 25 flavonoides chez les 30 espèces de Psoralées qu'ils ont analysées. Boardley *et al.* (1986) ont également mis en évidence la présence de composés appartenant aux isoflavonoides : la daidzéine, la génistéine et la formononétine, trois isoflavones, ont ainsi été détectés dans les extraits de feuilles de 8 espèces de Psoralées.

Les furocoumarines et les isoflavonoides sont synthétisés en quantité importante par les Psoralées. Nous nous attacherons dans les deux parties suivantes à faire état des propriétés et des applications thérapeutiques potentielles de ces deux familles de molécules, justifiant ainsi l'intérêt croissant que leur porte la médecine.

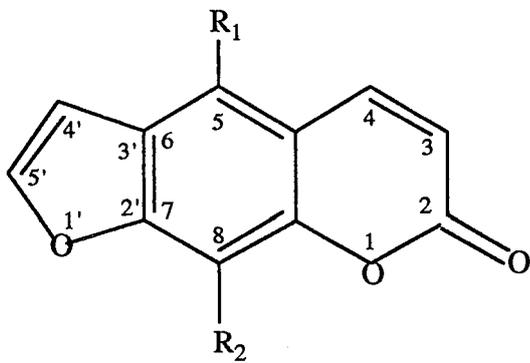
2. LES METABOLITES SECONDAIRES

2.1. Les furocoumarines

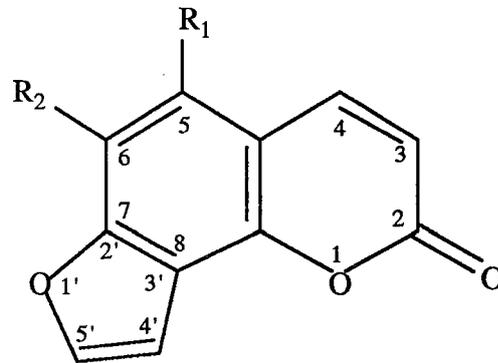
2.1.1. Historique

Nous avons déjà mentionné l'utilisation d'une huile extraite des graines de *Psoralea coryfolia* pour le traitement du vitiligo. Des extraits d'*Ammi majus*, autre plante riche en furocoumarines, sont utilisés de l'Égypte pharaonique (1000 ans avant J.C.) à la Chine de l'époque Song (960-1280) pour traiter la dépigmentation de la peau. Des effets secondaires caractérisés par des céphalées, des vomissements et pouvant conduire à un coma n'ont pas empêché l'utilisation de ces plantes jusqu'au XX^{ème} siècle par les herboristes du Moyen-Orient (Fitzpatrick et Pathak, 1959).

Dans la culture occidentale, l'utilisation thérapeutique de ce groupe de plantes reste inconnue et ce n'est qu'en 1834 avec l'isolement du bergaptène à partir de l'huile de bergamote par Kalbrunner qu'un intérêt pour le psoralène se manifeste (Fowlks, 1959). L'établissement de la structure chimique des furocoumarines par Späth en 1937 permettra alors de réaliser des progrès rapides du point de vue chimique (Helene, 1980). La redécouverte moderne des psoralènes est due à Kuske qui en 1938 établit le lien entre le psoralène et les effets pharmacologiques observés (repigmentation).



Furocoumarines linéaires



Furocoumarines angulaires

Figure 1. Structure chimique des furocoumarines linéaires et angulaires les plus communes

	Furocoumarines linéaires	Furocoumarines angulaires
R1=R2=H	psoralène	angélicine
R1=OCH3, R2=H	bergaptène	isobergaptène
R1=H, R2=OCH3	xanthoxine	sphondine
R1=R2=OCH3	isopimpinelline	pimpinelline

2.1.2. Nature chimique des furocoumarines

Les furocoumarines sont des molécules résultant de la condensation d'un cycle furane sur un noyau coumarine (noyau benzo- α -pyrone). Elles peuvent être linéaires ou angulaires selon qu'elles dérivent du psoralène ou de l'angélicine respectivement (Fowlks, 1959). Les plus communes sont indiquées dans la figure 1.

Les dérivés du psoralène et de l'angélicine comportent respectivement en position 5, 8 et 5, 6 un ou plusieurs substituants dont les plus courants sont les groupements hydroxy-, méthoxy-, butanyloxy-, et isomyleneoxy- .

2.1.3. Propriétés des furocoumarines

2.1.3.1. Rôle écophysiological des furocoumarines

Les furocoumarines ont été caractérisées en tant que phytoalexines chez les Ombellifères (Beier et Oertli, 1983; Ekiert, 1990; Diawara *et al.*, 1995), les Rutacées (Mc Cloud *et al.*, 1992) et chez *Psoralea cinerea* (Bourgaud *et al.*, 1992). Ces composés sont synthétisés de façon accrue lors de l'agression de la plante par des facteurs externes. La nature de ces facteurs est extrêmement variée : il peut s'agir de variations de température (Innocenti *et al.*, 1976 ; Zobel et Brown, 1990), de la pollution atmosphérique (Derks *et al.*, 1990), des UV (Zangerl et Berenbaum, 1987), de l'ozone (Eckey-Kaltenbach *et al.*, 1994a, 1994b), d'agressions par des agents chimiques (Beir et Oertli, 1983; Bourgaud *et al.*, 1992), des herbivores (Zangerl et Berenbaum, 1995) ou encore de l'infection par un agent pathogène (Chaudary *et al.*, 1985 ; El Modafar *et al.*, 1993).

Une étude de Zangerl et Rutledge (1996) réalisée sur *Pastinaca sativa* met en évidence deux types de réponses, induite ou constitutive, développées par la plante en réponse à une agression par les herbivores. Ils montrent, en accord avec la théorie de la défense optimale (Mc Key, 1974), que les tissus peu susceptibles d'être attaqués par les herbivores ont des teneurs constitutives en xanthotoxine assez faibles par rapport aux organes exposés. Ainsi, les organes reproducteurs et les feuilles, très exposées au pâturage, présentent des teneurs en xanthotoxine 300 fois supérieures à celles détectées dans les racines. A l'inverse, l'accumulation de xanthotoxine est rapidement induite dans les racines en cas d'agression alors que la réponse est plus lente et de plus faible intensité dans les organes à fortes teneurs constitutives.

De nombreux travaux mettent en évidence les propriétés insecticides des furocoumarines. Kumar *et al.* (1994) ont récemment établi que l'activité insecticide de l'écorce

du *Pampurus missionis*, petit arbre originaire du Sri Lanka, est due à la présence en quantité importante d'impératorine. Cette furocoumarine est effectivement toxique sur *Diabrotica balteata* (stade larvaire) et sur *Lucilia sericata* (stade oeuf). La toxicité des furocoumarines vis-à-vis des insectes s'explique par l'inhibition de l'enzyme O-déméthylase catalysant la réaction d'O-méthylation du *p*-nitroanisole : la molécule de furocoumarine est oxydée par le cytochrome P450 au niveau de la double liaison du cycle furane, conduisant ainsi à l'obtention d'un époxyde instable qui réagit avec le cytochrome P450. Le meilleur inhibiteur semble être la xanthotoxine puisque son action est irréversible (Neal et Wu, 1994).

Cette toxicité des furocoumarines envers les insectes n'est pas systématique. *Depressaria pastinacella* (Lépidoptère) se nourrit exclusivement de deux Apiacées très riches en xanthotoxine. Berenbaum et Zangerl (1994) ont étudié le mécanisme de détoxification des furocoumarines mis en place par cet insecte. Il s'avère que la détoxification de la xanthotoxine est activée par sa propre présence et de façon prioritaire à tout autre métabolisme ; ainsi, le mécanisme de détoxification se fait au dépens de la croissance de la larve en cas de déficience en protéine du régime alimentaire.

Papilio polyxenes, qui se développe sur des plantes riches en furocoumarines a un cytochrome P450 6 à 100 fois moins sensible à la xanthotoxine que *Manduca sexta* (Zumwalt et Neal, 1993). Cette adaptation est particulièrement étroite puisque Hung *et al.* (1995) montrent que xanthotoxine, bergaptène et angélicine induisent la transcription d'ARNm du gène CYP6R1. Ces transcripts sont différents pour l'angélicine (furocoumarine angulaire), et la xanthotoxine ou le bergaptène (furocoumarine linéaire), et impliquent l'existence de deux catégories de loci capables d'induire un mécanisme de détoxification spécifique au type de furocoumarine présente dans la plante agressée.

Les furocoumarines sont également impliquées dans les phénomènes de phytoallélopathie : elles sont susceptibles d'inhiber la germination puis la croissance des graines environnantes (Kato *et al.*, 1978). Ce phénomène, mis en évidence par Baskin *et al.*, en 1967 sur *Psoralea glandulosa*, a été également observé par Juntilla (1976) pour *Heracleum lacianatum* les fortes teneurs en furocoumarines présentes dans les graines de la Grande Berce inhibent la germination des semences de laitue.

Les furocoumarines ont par ailleurs des propriétés fongicides et bactéricides, ce qui complète leur rôle de phytoalexine et contribue au bon état phytosanitaire des plantules. Parker *et al.* (1991) ont ainsi démontré qu'une protéine extracellulaire de 42 Kda, extraite de *Phytophthora megasperma*, était capable d'induire une transcription très importante des ARNm codant pour les enzymes de la voie de biosynthèse des furocoumarines chez *Petroselinum hortense*. Cette augmentation des teneurs en furocoumarines limitera la progression de l'infection. L'action antimicrobienne des furocoumarines a été utilisée par Daniels (1965) pour mettre en évidence la présence de composés phototoxiques. Plus récemment, Bourgaud *et al.*, (1994a) ont utilisé cette propriété pour la mise au point d'un biotest destiné à quantifier de façon

simple et rapide les teneurs en furocoumarines dans un extrait végétal. Ces propriétés des furocoumarines ont été étudiées dans le but de produire des molécules de type photosensibilisateur et photopesticide. Des travaux menés par Becker *et al.* (1993) ont permis de déterminer les propriétés photophysiques des psoralènes. Borges *et al.* (1995) ont ainsi pu montrer que les psoralènes sont plus phototoxiques que les coumarines, les chromones et les furanochromones. Leurs dérivés thione sont encore plus actifs, ce qui permet d'envisager leur utilisation éventuelle dans le contrôle de l'infection par des champignons phytopathogènes.

2.1.3.2. Propriétés pharmacologiques des furocoumarines

2.1.3.2.1. Photoaddition

Les propriétés pharmacologiques des furocoumarines sont essentiellement dues à leur capacité de liaison avec la double hélice de la molécule d'ADN. Le mécanisme d'action s'effectue en 3 étapes :

- établissement du complexe moléculaire
- photoréaction des furocoumarines à l'ADN
- liaison croisée entre les 2 brins d'ADN

L'établissement du complexe moléculaire entre l'ADN et les furocoumarines résulte de l'intercalation au niveau de la molécule d'ADN ou d'ARN d'une molécule linéaire de furocoumarine à l'état fondamental (Forlot, 1978). Sous l'action d'UV de grande longueur d'onde, la molécule de furocoumarine passe de l'état fondamental à l'état excité et établit des liaisons fortes avec les bases pyrimidiques des 2 brins de la molécule d'ADN ou d'ARN (Dall'Acqua *et al.*, 1978). Cette action conduit à la perturbation de la réplication et bloque le cycle cellulaire en phase S, ce qui limite la multiplication cellulaire. C'est cette propriété des furocoumarines qui est à l'origine de leur utilisation dans le traitement du psoriasis : l'inhibition de la synthèse d'ADN empêche la prolifération des cellules épidermiques qui caractérise le développement de cette affection (Thomas et Amblard, 1988). Cette caractéristique des furocoumarines explique également leur utilisation dans le traitement du lymphome cutané par la technique de photophorèse (Edelson, 1988). Les lymphocytes T, qui se multiplient de façon anarchique dans le cas de cette maladie, sont soumis à l'action des UVA de grande longueur d'onde après ingestion de xanthotoxine par le patient. Leur multiplication est ainsi bloquée, ce qui limite leur prolifération et le développement de la maladie.

Les lymphocytes T anormaux sont également impliqués dans le mycosis fongoïde. Leur prolifération à partir de la peau provoque la mort par tumorigénèse. Un traitement par la technique de PUVAthérapie associée au bergaptène à des stades assez précoces s'avère très efficace et autorise de longues rémissions aux patients atteints de cette affection (Thioly-Bensoussan *et al.*, 1988).

2.1.3.2.2. Activation de la mélanogenèse

Les furocoumarines induisent une augmentation de la pigmentation mélanique de la peau normale après application locale ou ingestion orale de psoralènes, suivie d'une exposition au soleil ou aux UV long (320-400 nm). Cette propriété résulte de 4 phénomènes (Forlot, 1978) :

- augmentation du nombre et de la taille des mélanocytes
- augmentation du nombre de mélanosomes par mélanocyte
- accroissement de la production de mélanine
- redistribution de la mélanine vers les cellules exposées aux UV

En outre, Varga en 1982 a observé que l'irradiation des mélanocytes en présence de xanthotoxine provoque un blocage de leur cycle cellulaire en phase G2, ainsi qu'une formation accrue de mélanosomes. Cette étude suggère que l'effet pigmentogène des furocoumarines ne se traduirait pas seulement par l'augmentation du taux de mélanine, mais impliquerait également la régulation du cycle cellulaire.

L'activation de la mélanogenèse par les furocoumarines s'applique au traitement de plusieurs maladies dépigmentaires. Le vitiligo est la plus fréquente des hypomélanoses. Il atteint plus de 1% de la population mondiale et serait une affection de type autoimmune. L'application ou l'ingestion de xanthotoxine ou de bergaptène suivie d'une exposition aux UVA constitue le traitement le plus efficace contre cette maladie.

Les propriétés d'activation de la mélanogenèse par les furocoumarines intéressent également le domaine de la cosmétologie. Conditionnés sous forme de gélules ou ajoutés aux crèmes bronzantes, les psoralènes activent et prolongent la mélanisation de la peau. Cette application des furocoumarines est cependant sujette à controverse depuis quelques années en raison des implications de ces molécules dans les phénomènes de mutagenèse.

2.1.3.3.3. Action mélatonino-mimétique

La mélatonine est une indole-amine synthétisée par la glande pinéale. Les taux plasmatiques de mélatonine suivent un rythme circadien : très bas pendant la journée, ils s'élèvent pendant la phase nocturne. Chez les patients dépressifs, on observe une diminution des taux sanguins nocturnes de mélatonine. Souêtre *et al.* (1989) ont montré que lors de l'absorption de bergaptène, le taux plasmatique de mélatonine augmente de façon significative. En 1994, Garde et Micic ont établi qu'une dose de 0,6 mg/kg de xanthotoxine augmente de façon importante le taux de mélatonine circulante dans les 60 minutes suivant l'ingestion. Par conséquent, les troubles du sommeil, le décalage horaire et les états dépressifs

liés au taux de mélatonine circulante pourraient être traités par l'administration de furocoumarines.

2.1.3.3.4. Régulation de l'ouverture des canaux potassiques

Bohuslavizki *et al.* (1993) ont mis en évidence l'efficacité du bergaptène ainsi que de la xanthotoxine en tant qu'agent bloquant des canaux potassiques. Cette propriété s'avère particulièrement efficace pour le traitement de maladies du type de la sclérose en plaque. Cette pathologie est caractérisée par une démyélinisation de la fibre nerveuse, ce qui entraîne un équilibre du potentiel de membrane en potassium et par conséquent une rupture de la transmission de l'influx nerveux. En bloquant les canaux potassium, les furocoumarines permettent de rétablir le potentiel de membrane et de restaurer le transfert de l'influx nerveux. Dans une seconde étude en 1994, Bohuslavizki *et al.* précisent cependant que si le bergaptène semble être la molécule la plus sélective vis-à-vis du potassium, les doses administrées sont importantes et renouvelées fréquemment, ce qui entraînerait une éventuelle toxicité en cas d'utilisation de ce composé à des fins thérapeutiques.

2.1.3.3.5. Autres applications thérapeutiques des psoralènes

Les furocoumarines sont également très étudiées pour leurs propriétés d'inactivation des virus. L'utilisation de la PUVAthérapie pour la décontamination du sang et de ses dérivés permettrait en effet de limiter la transmission des maladies virales par le sang, ce qui reste le problème majeur de la transfusion sanguine.

2.1.3.3.6. Effets secondaires et toxicité des furocoumarines

✓ *Effets secondaires*

Les effets secondaires observés au cours de traitements sont liés à l'absorption de furocoumarines et/ou à l'action des UVA. Les manifestations les plus fréquentes sont des troubles digestifs (moindre avec le bergaptène qu'avec la xanthotoxine), des accidents phototoxiques souvent liés à un surdosage, des lésions érythémateuses (20% des patients), des céphalées et des vertiges. Les traitements peuvent également provoquer des douleurs cutanées et une pigmentation diffuse des ongles et des mains. A long terme, il peut se développer un risque de conjonctivite et une altération de l'élasticité de la peau (Huckel, 1996).

✓ Toxicité

Les premières manifestations de la toxicité des furocoumarines ont été mises en évidence chez les cueilleurs de céleri aux Etats-Unis. Une étude a été menée par Fleming en 1990 pour déterminer l'occurrence des dermatoses liées aux furocoumarines parmi les ouvriers récoltant le céleri. Ces travaux révèlent que 24 % des cueilleurs développent une dermatose de contact. Une étude de même type avec des ouvriers de deux coopératives agricoles de l'Oregon montre que la récolte de céleri même sain, cause des photodermatoses aggravées en cas d'exposition aux UVA (Berkley *et al.*, 1986). Ces travaux révèlent également que la cueillette de plantes riches en furocoumarines comme le citron, le persil et le panais peut induire également des photodermatoses de contact.

Du fait de l'atteinte de l'ADN par photoaddition des psoralènes en présence d'UV de grande longueur d'onde, la question de l'existence d'un risque oncogène a été soulevée. En 1983, l'Organisation Mondiale de la Santé a reconnu les psoralènes comme agent responsable de cancer de la peau chez l'Homme (Diawara *et al.*, 1995). Berenbaum (1991) associe d'ailleurs l'utilisation des furocoumarines en médecine avec une augmentation de l'incidence des cancers de la peau. Pourtant, Harnes et Thune (1993) ont établi qu'en 16 ans, 2 patients sur 585 traitées par PUVAthérapie ont développé un cancer de la peau, ce qui n'est statistiquement pas différent de la fréquence observée dans l'ensemble de la population. Ces résultats contradictoires ne permettent pas de tirer de conclusion définitive quant à la toxicité des furocoumarines dans le traitement par PUVAthérapie.

Des modifications d'ordre immunologique peuvent également se produire au cours d'un traitement par PUVAthérapie. On observe alors une altération de la vitalité et du nombre de lymphocytes T, T suppresseurs, T helpers, monocytes et macrophages, impliqués dans la réponse immunitaire à une attaque par un agent pathogène (Breathnack et Hinter, 1993). Ce phénomène d'immunosuppression induit par la PUVAthérapie serait peut-être à l'origine de l'aggravation des psoriasis chez les patients HIV positifs traités au bergaptène, et pourrait théoriquement accélérer le développement des tumeurs. Cependant, la signification et les conséquences à long terme de ces effets dont la connaissance est récente, ne sont pas encore élucidées.

2.1.4. Ressources en psoralènes

Les furocoumarines linéaires ont été identifiées dans plusieurs familles de plantes (Murray *et al.*, 1982 ; Berenbaum, 1991), dont :

- les Rutacées (*Citrus*, *Ruta*, *Fagara*)
- les Apiacées (*Apium graveolens*, *Ammi majus*...)

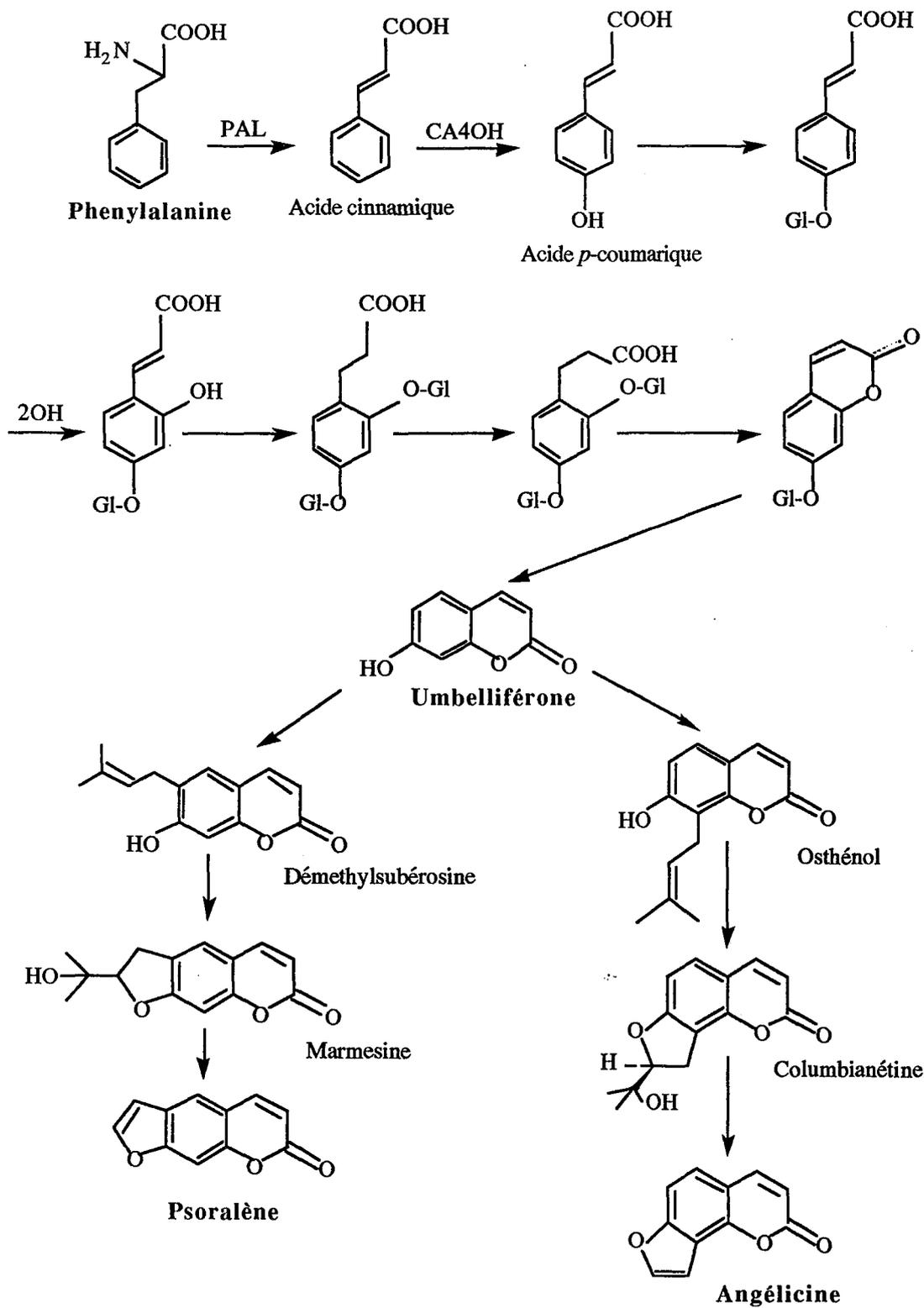


Figure 2. Schéma de biosynthèse conduisant à la formation du psoralène et de l'angélicine (modifié, d'après Brown, 1979). PAL, Phénylalanine ammonia-lyase ; CA4OH, Cinnamate orthohydroxylase ; 2OH, Hydroxylase.

- les Astéracées
- les Fabacées (*Psoralea*, *Coronilla*)
- les Rosacées
- les Cypéracées
- les Moracées (*Ficus*)
- les Pittosporacées
- les Solanacées
- les Brassicacées
- les Amaranthacées
- les Thymélacées

Les furocoumarines se rencontrent également chez certains champignons et dans quelques espèces d'orchidées (Scott *et al.*, 1976).

Actuellement, la principale ressource naturelle est le *Citrus bergamia* dont on extrait l'huile essentielle qui contient le bergaptène. Cependant, cet arbuste est cultivé sur des surfaces restreintes (Calabre, Côte d'Ivoire) et sa production subit des variations de coût et de qualité incompatibles avec la demande croissante en furocoumarines.

Par ailleurs, la synthèse chimique est connue mais reste inenvisageable à l'échelle industrielle en raison d'un coût de production beaucoup trop élevé (Forlot, comm. pers.).

2.1.5. Biosynthèse des furocoumarines

La biosynthèse des furocoumarines a été principalement étudiée chez les plantes de la famille des Rutacées et des Ombellifères. Les furocoumarines appartiennent au métabolisme des phénylpropanoïdes. Elles dérivent de l'acide cinnamique qui est lui-même formé à partir de la phénylalanine sous l'action de la phénylalanine ammonia lyase (Figure 2). Cette enzyme détermine l'orientation de la phénylalanine vers le métabolisme primaire ou le métabolisme secondaire (Hahlbrock et Scheel, 1989). Les étapes de la biosynthèse des furocoumarines passent ensuite par la formation d'acide *p*-coumarique, et d'umbelliférone qui, selon le carbone qui sera prénylé conduira aux furocoumarines linéaires (Brown, 1979) ou angulaires (Steck et Brown, 1970). La première partie de cette voie de biosynthèse qui conduit à l'acide *p*-coumarique est la voie du métabolisme général des phénylpropanoïdes. La régulation enzymatique de cette voie de biosynthèse sera abordée simultanément à celle des isoflavonoïdes dans le paragraphe qui leur est consacré. En revanche, la prénylation de l'umbelliférone qui conduit à la déméthylsubérosine n'a été mise en évidence que chez *Ammi majus* (Brown et Steck, 1972), *Ruta graveolens* (Ellis et Brown, 1974), et *Psoralea corylifolia* (Innocenti *et al.*, 1977). Chez *Ruta graveolens*, la prényltransférase est chloroplastique (Dhillon et Brown, 1976) ce qui n'est pas le cas pour *Ammi majus* où ces enzymes ont été caractérisées dans la membrane

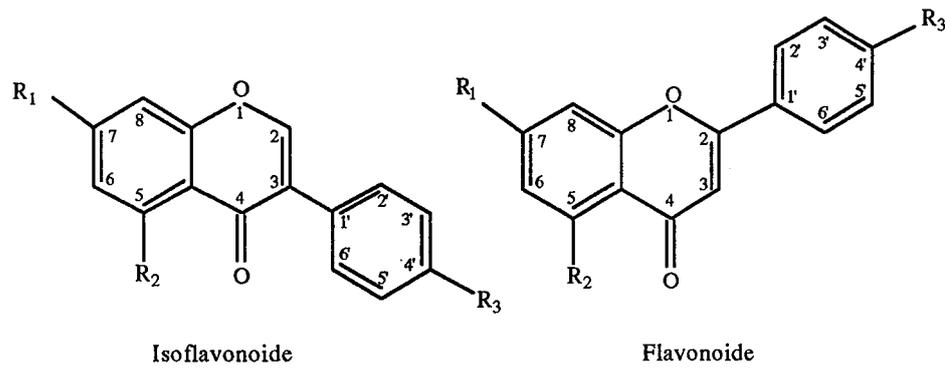


Figure 3. Structure chimique des isoflavonoïdes et flavonoïdes les plus simples

	Isoflavonoïdes	Flavonoïdes
R1=OH, R2=H, R3=OH	daïdzéine	liquiritigénine
R1=OH, R2=OH, R3=OH	génistéine	naringénine
R1=OH, R2=H, R3=OMe	formononéine	
R1=OH, R2=OH, R3=OMe	biochanine A	

du reticulum endoplasmique comme NADPH, O₂ et Cytochrome P450-dépendantes (Hamerski et Mattern, 1988 ; Welle et Grisebach, 1988).

2.2. Les isoflavonoides

2.2.1. Historique

L'utilisation des plantes ou extraits de plante pour contrôler la fertilité chez les animaux et les hommes est reconnue depuis très longtemps. En Orient, par exemple, le grenadier est traditionnellement associé avec la fertilité depuis plus de 2000 ans. C'est seulement depuis une quarantaine d'années cependant que l'on a identifié et déterminé la structure chimique des composés responsables de ces effets (Cook *et al.*, 1933). Depuis 25 ans environ, les recherches sur les isoflavonoides ont surtout eu pour but de déterminer les mécanismes moléculaires et l'action des phytoestrogènes sur leurs tissus cibles, via le récepteur aux oestrogènes endogènes (Jensen et Jacobson, 1962). Beaucoup plus récemment, les isoflavonoides ont été redécouverts pour leur lien avec la faible occurrence des cancers hormono-dépendants dans les pays ayant un régime alimentaire riche en soja, plante qui présente de fortes teneurs en isoflavones. (Adlercreutz, 1990). Les isoflavonoides contenus dans l'alimentation auraient un rôle de prévention et de protection vis-à-vis des cancers dont le développement est en relation avec les hormones stéroïdiennes (Adlercreutz, 1995). L'importance de cette découverte justifie les très nombreux travaux qui en découlent actuellement.

2.2.2. Nature chimique des isoflavonoides

Les isoflavonoides sont des molécules constituées par un squelette carboné en C15 résultant de la condensation de 3 unités malonates sur l'acide *p*-coumarique, un précurseur C6-C3 dérivé de la phénylalanine (Figure 3).

Les isoflavonoides sont biosynthétiquement liés aux flavonoides mais ils forment une classe de composés distincte. Le cycle phényl est en effet présent en C3 du cycle pyrone pour les isoflavonoides, et non en C2 comme c'est le cas pour les flavonoides (Hakamatsuka et Sankawa, 1993).

Il existe une grande diversité structurale chez les isoflavonoides. Basée sur les modifications de conformation du squelette carboné, les substitutions et les oxygénations diverses, un classement des isoflavonoides en 14 catégories a été établi (Dewick, 1994). Les 9 principales sont indiquées dans la figure 4.

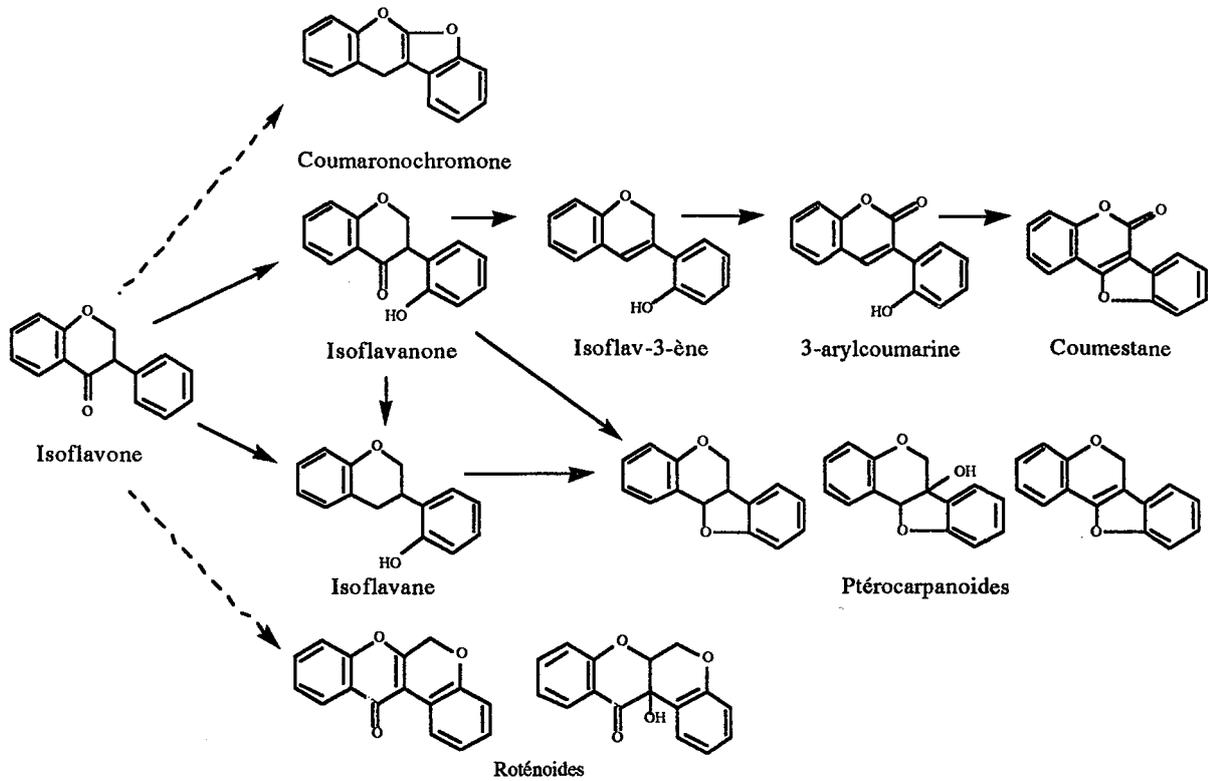


Figure 4. Principales classes d'isoflavonoïdes et liens biosynthétiques directs (—) et indirects (---) (modifié d'après Dewick, 1988).

2.2.3. Propriétés des isoflavonoides

2.2.3.1. Rôle écophysio­logique des isoflavonoides

Rossiter et Beck (1967) ont noté l'influence des conditions environnementales, de l'âge et de conditions phytosanitaires de la plante sur les teneurs en isoflavonoides. Ces molécules sont aujourd'hui reconnue en tant que phytoalexine chez de très nombreuses Légumineuses (Phillips et Kapulnik, 1995). Les isoflavonoides sont ainsi synthétisés en grande quantité par la plante en cas d'attaque par un agent pathogène. Graham *et al.*, (1990) décrivent l'accumulation de glyceolline (ptérocarpane) chez le soja infecté par *Phytophthora megasperma* : la concentration dans le cotylédon est multipliée par 45 dans le cas d'une infection. La génistéine est un second isoflavonoïde également synthétisé par le soja en réponse à une attaque par *Phytophthora megasperma* (Morris *et al.*, 1991). Hakamatsuka *et al.* (1992) ont mis en évidence l'augmentation des concentrations en daidzéine et autres isoflavones dans des suspensions cellulaires de *Pueraria lobota* lors de l'addition dans le milieu de culture d'extrait de levure.

Il est à noter que les isoflavonoides libérés par la plante en réponse à une agression par un facteur exogène peuvent résulter de l'hydrolyse de composés glycosylés stockés dans la vacuole ou d'une néosynthèse au moment de l'attaque. Cette double protection n'est pas sans rappeler le comportement des furocoumarines dans le mécanisme de réponse constitutive ou induite, mis en évidence par Zangerl et Rutledge (1996) sur *Pastinaca sativa*.

Par ailleurs, les isoflavonoides sont des produits issus du métabolisme secondaire qui possèdent des activités antimicrobiennes intéressantes (Van Etten, 1976). Leur utilisation en tant que protecteur naturel a même été discutée par Mansfield et Bailey (1984) qui proposent de les employer comme alternative aux pesticides conventionnels. Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus (Rathwell et Smith, 1980 ; Weidenbörner *et al.*, 1992). Une étude menée par Weidenbörner et Jha (1994) ayant pour but de tester 16 isoflavonoides sur 4 champignons du sol a donné les résultats suivants :

- les isoflavanones semblent avoir une meilleure activité antifongique que les isoflavones et les isoflavanes
- la substitution par un groupement methyl sur le cycle carboné B ainsi qu'une halogénéation améliorent de façon significative l'activité antifongique des isoflavonoides testés.

Une relation claire entre la structure chimique et l'activité antifongique n'est cependant pas encore établie.

Firmin *et al.* (1986) ont montré que dans l'interaction Légumineuse-*Bradyrhizobium*, les isoflavonoides libérés par la plante hôte sont capables d'induire l'expression du gène *nod* chez

la bactérie symbiotique, qui, en retour, synthétise des molécules de type lipo-oligochitine dénommées « facteurs-Nod » (Lerouge *et al.*, 1990). Ces facteurs Nod favorisent l'établissement des nodosités caractéristiques du développement du système racinaire des Légumineuses (Mellor et Rosendahl, 1994). Ainsi, la daidzéine et la génistéine issues d'exsudats racinaires de *Phaseolus vulgaris* sont des isoflavones particulièrement efficaces pour induire la transcription du gène *nod* chez *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* (Dakora *et al.*, 1993). Cette capacité de certains isoflavones de favoriser la nodulation en fait des molécules potentiellement déterminantes dans la colonisation racinaire par des symbiotes capables d'établir des nodosités fixatrices d'azote, et par conséquent, intéressantes dans le cadre de l'amélioration de la qualité du fourrage.

Les isoflavonoides ont la capacité d'absorber de façon intense les UV. Localisés dans les cellules de l'intérieur des pétales ou à la surface de la corolle des fleurs, les isoflavonoides jouent un rôle attractif équivalent à celui du nectar vis-à-vis des insectes capables de percevoir la bande UV du spectre de la lumière. Cette propriété fait donc intervenir les isoflavonoides dans le processus de pollinisation des fleurs (Harborne, 1979).

Les isoflavonoides ont également un rôle de régulateur de germination et de développement des plantules. L'isoflavone sayanedine (Bailey et Francis, 1971), isolé des cosse de pois stimule la croissance racinaire de plantules de riz (Isogai *et al.*, 1970) en agissant comme une kinétine. La daidzéine, la formononétine et la génistéine au contraire, réduisent le taux de germination et le développement des racines et des tiges de plantules de Légumineuses (Chang *et al.*, 1969).

Par ailleurs, les roténoïdes qui appartiennent également à la famille chimique des isoflavonoides présentent des propriétés insecticides (Fukami et Nakajima, 1971). La roténone, commercialisée, agit en inhibant l'étape NADH deshydrogénase dépendante de la chaîne respiratoire des mitochondries. La plante capable de synthétiser cette molécule limite ainsi les attaques par les insectes.

Les isoflavonoides semblent être également impliqués dans la protection de la plante contre les herbivores. En effet, les isoflavonoides confèrent aux plantes qui les synthétisent un goût amer qui réduit leur appétance (Harborne, 1979). De plus, la daidzéine, la génistéine et le coumestrol présents en quantité importante chez les Légumineuses comme la luzerne manifestent une activité oestrogénique qui affecte le taux de reproduction chez les moutons (Shutt, 1976). Leopold *et al.* (1976) suggèrent même que les caillies, qui se nourrissent de Légumineuses riches en isoflavones utilisent ces molécules pour réguler la croissance de leur population lorsque la nourriture devient insuffisante.

2.2.3.2. Propriétés pharmacologiques des isoflavonoides

Les propriétés pharmacologiques des isoflavonoides sont liées à leur activité antioxydante, oestrogénique et à leur potentiel inhibiteur d'enzymes.

2.2.3.2.1. Activité antioxydante des isoflavonoides

György *et al.* (1964) ainsi que Pratt et Birac (1979) ont été les premiers à établir les propriétés antioxydantes des isoflavones du soja. Beaucoup plus récemment, Wei *et al.* (1995) ont mis en évidence l'effet antioxydant de la génistéine extraite du soja sur des cellules leucémiques humaines (HL-60) et des cellules tumorales de l'épiderme de souris. Ils démontrent une inhibition de la formation d' H_2O_2 par ces cellules en présence de génistéine et à un moindre degré, en présence de daidzéine. La différence d'efficacité entre les deux molécules est liée à leur structure chimique : le groupement hydroxy- situé en position 4' de la génistéine expliquerait son activité biologique. L'activité antioxydante de la molécule de génistéine a également été répertoriée par Dewick en 1988.

2.2.3.2.2. Inhibitions enzymatiques par les isoflavonoides

Dans un article datant de 1995, Tahara et Ibrahim ont répertorié les propriétés inhibitrices des isoflavonoides sur de nombreuses enzymes : cathécol-O-méthyltransférase, DOPA carboxylase, dopamine β -hydroxylase, histidine décarboxylase et lipase. Ces molécules sont également capables d'inhiber la topoisomérase II (Matsukawa *et al.*, 1993). Ce sont cependant les propriétés d'inhibition des kinases qui sont les plus étudiées. Ces enzymes, lorsqu'elles sont activées, se lient à l'ATP et augmentent la mitogenèse, ce qui provoque en cas de mauvaise régulation une multiplication cellulaire anarchique. La génistéine, molécule de la famille des isoflavones, bloque l'activité protéine tyrosine kinase, ce qui induit une action antiproliférative, ainsi qu'une différenciation cellulaire (Jing et Waxman, 1995). Matsukawa *et al.* (1993) ont montré que la génistéine inhibe de façon réversible la croissance des cellules humaines du cancer de l'estomac (HGC-27) en stoppant le cycle cellulaire entre les phases G2 et M.

La daidzéine, autre molécule de la famille chimique des isoflavones, ne présente pas d'activité inhibitrice de la protéine tyrosine kinase (Marsen *et al.*, 1995). Il semble que cette différence d'activité entre deux molécules pourtant très proches structurellement résulte de la présence en position 4' du groupement hydroxy- chez la génistéine. L'importance de la relation existant entre la structure et l'activité des phytoestrogènes a été très bien documentée par Jordan

et al. (1985). La daidzéine présente cependant une action antimittotique (Higashi et Ogawara, 1994).

2.2.3.2.3. Activité oestrogénique des isoflavonoïdes

Les oestrogènes sont des molécules capables d'induire l'oestrus chez des animaux immatures et d'interférer avec les processus hormonaux liés à la reproduction (Jordan *et al.*, 1985). Dodds *et al.* (1958) ont montré que ces molécules agissent au niveau du tissu vaginal, utérin et mammaire, en se fixant sur des récepteurs spécifiques cytoplasmiques ou nucléaires (Jensen et Jacobson, 1962).

Les isoflavonoïdes sont capables de se lier à ces récepteurs et de manifester des activités de type oestrogénique. Farnsworth *et al.* (1975) ont ainsi décrit plus de 300 plantes capables d'initier l'oestrus chez les animaux grâce à 29 composés appartenant essentiellement aux familles chimiques des isoflavones et des coumestanes.

Les isoflavones identifiés comme ayant une action oestrogénique sont la daidzéine, la génistéine et leurs dérivés 4' méthylés (formononétine et biochanine A, respectivement). Ces molécules se trouvent très souvent de façon constitutive, sous forme glucosylée, inactive, dans la plante (Price et Fenwick, 1985). De façon générale, les isoflavones sont moins actifs que les oestrogènes d'origine animale ou synthétique. Par ailleurs, Bickoff *et al.* (1962) et Stob (1983) ont montré que parmi les isoflavonoïdes, la génistéine est la molécule qui possède la plus grande activité phytoestrogénique. Cette propriété semble à nouveau liée à la présence du groupement hydroxy en position 4'. Cette structure explique la faible activité de la formononétine et de la biochanine A qui sont dépourvues de ce groupement (Bradbury et White, 1954). Il est à noter d'ailleurs qu'à l'inverse, ces deux dernières molécules possèdent une activité hypocholestérolémiant chez le rat que ne possèdent pas la génistéine ou la daidzéine (Sharma, 1979).

En ce qui concerne les coumestanes, le coumestrol est le phytoestrogène le plus actif. Présent à la fois sous forme conjuguée et libre *in vivo*, le coumestrol serait actif en raison de la présence des groupes phénol en position 7 et 12 du squelette carboné.

Le mécanisme d'action des isoflavones et du coumestrol en tant que phytoestrogènes est assez complexe. Les phytoestrogènes, de part leur structure chimique, sont capables de se lier sur les récepteurs nucléaires et cytoplasmiques des oestrogènes, et plus précisément sur le récepteur de l'oestradiol (Markaverich *et al.*, 1995 ; Herman *et al.* 1995 ; Molteni *et al.*, 1995). Il est toutefois important de noter que l'effet oestrogénique des isoflavones et du coumestrol est dépendant des concentrations en phytoestrogène. Ainsi, à des concentrations faibles (< 100nM), le coumestrol provoque *in vitro* une inhibition de la prolifération cellulaire chez le rat, alors qu'à des concentrations supérieures, on observe une stimulation de cette prolifération (Markaverich *et*

al., 1995). Mäkälä *et al.* (1995) note également que chez la souris, l'activité oestrogénique ou antioestrogénique pour une même molécule dépend de sa concentration endogène.

Il semble donc que si l'implication des phytoestrogènes dans les mécanismes de régulation hormonale de la croissance cellulaire est clairement établie, les facteurs qui modulent les effets agoniste ou antagoniste sont encore mal appréhendés.

2.2.3.3. Applications thérapeutiques des propriétés biologiques des isoflavonoïdes

De nombreux cancers (cancer du sein, cancer de la prostate, cancer du colon) sont hormono-dépendants (Herman *et al.*, 1995). On peut en effet évaluer le risque de développement de ces cancers par mesure du taux de récepteurs aux hormones stéroïdiennes, récepteurs que l'on trouve en forte proportion dans les organes atteints (Molteni *et al.*, 1995). L'activité antioestrogénique des isoflavonoïdes d'une part, et la faible occurrence de ce type de cancer dans les pays ayant un régime alimentaire riche en isoflavones d'autre part, ont conduit les chercheurs à étudier l'impact de ces molécules sur le développement des tumeurs cancéreuses.

Deux propriétés biologiques des isoflavones interviennent : l'action antioxydante et l'activité antiproliférative.

Wei *et al.* (1993) ont montré que la formation d' H_2O_2 est l'un des mécanismes inducteurs de la tumorigénèse des cellules saines. L'activité antioxydante de la génistéine, mise en évidence par Wei *et al.* (1995) rend ainsi cet isoflavone capable d'interférer *in vitro* avec le mécanisme de tumorigénèse des cellules.

Le développement des tumeurs cancéreuses est également caractérisé par une multiplication anarchique et une dédifférenciation des cellules. Par ces propriétés d'inhibition des protéines tyrosine kinases, la génistéine empêche la croissance, la multiplication et la dédifférenciation cellulaire (Matsukawa *et al.*, 1993 ; Molteni *et al.*, 1995 ; Jing et Waxman, 1995). L'activité anticancérogène des isoflavonoïdes est également liée à la capacité de ces molécules à entrer en compétition avec l'oestradiol. En effet, l'oestradiol est un puissant oestrogène très fortement impliqué dans le cancer du sein et de la prostate (Adlercreutz *et al.*, 1993). La limitation de son activité contribue à interférer avec le mécanisme de tumorigénèse (Markaverich *et al.*, 1995).

L'inhibition de la protéine tyrosine kinase par la génistéine intervient également dans le processus de formation des plaques d'athérosclérose. En effet, lorsqu'un vaisseau sanguin est lésé, les cellules endothéliales qui le bordent synthétisent de la thrombine au niveau de la blessure. Ce composé provoque l'activation d'un certain nombre de phénomènes et conduit à la

formation d'un thrombus puis d'une plaque d'athérosclérose qui obture le vaisseau (Wilcox et Blumenthal, 1995). Marsen *et al.* (1995) ont montré sur 3 souches de cellules différentes que la génistéine, en bloquant l'activité protéine tyrosine kinase, induisait un blocage de la stimulation de la thrombine et donc de la formation du thrombus.

Yura *et al.* (1993) ont également mis en évidence l'efficacité de la génistéine en tant qu'inhibiteur de la protéine histidine kinase mise en jeu lors de la réplication du virus HSV-1 responsable de l'herpès.

L'ensemble de ces applications potentielles des isoflavones (et de la génistéine en particulier) pour la prévention des cancers hormono-dépendants est à l'origine de nombreuses analyses des teneurs en isoflavones de divers régimes alimentaires. Ainsi, Coward *et al.* (1993) ont analysé les teneurs en daidzéine et génistéine de plus de 20 préparations culinaires à base de soja (plante riche en isoflavonoïdes). Wang et Murphy (1994) ont dosé la daidzéine, la génistéine, la glycitéine et leurs glucosides respectifs dans 30 produits à base de soja. Ils montrent ainsi que les teneurs en isoflavones sont plus faibles dans les produits élaborés que dans les produits bruts.

Des travaux visant à suivre le métabolisme des isoflavones après leur ingestion ont été menés sur des femmes par l'équipe de Hendrich au Département des Aliments et de la Nutrition Humaine à Ames (Iowa, Etats-Unis). Depuis 1994, cette équipe étudie la biodisponibilité des isoflavones présents dans les divers produits introduits dans le régime alimentaire. Des interactions entre les isoflavones et les autres composants du bol alimentaire (fibres), ainsi qu'une influence de la qualité de la flore intestinale ont été mis en évidence. Ces facteurs pourraient limiter l'efficacité des isoflavones. Une dose de 1,5 à 2 mg/kg/jour d'isoflavone semble cependant être la dose nécessaire pour que les isoflavones jouent un rôle de prévention contre les cancers hormono-dépendants (Hutchins *et al.*, 1995).

Malgré ces résultats intéressants sur la prévention du cancer par un régime alimentaire adapté, les preuves sont encore insuffisantes d'une action réelle des isoflavones pour établir des recommandations en matière de nutrition (Adlercreutz, 1995).

2.2.4. Répartition des isoflavonoïdes dans le règne végétal

La répartition des isoflavonoïdes dans le règne végétal est particulièrement bien relatée dans l'article de Tahara et Ibrahim (1995). Nous en reprendrons ici les lignes principales.

A l'heure actuelle, près de 1000 isoflavonoïdes sous forme aglucone ont été répertoriés. Ils sont séparés en 14 classes et 23 sous-classes établies selon les modifications existant au niveau du squelette carboné, du type de substitution et de la nature des substituants sur les

différents cycles. Parmi ces 1000 isoflavonoïdes, 900 environ sont identifiés chez les plantes de la famille des Légumineuses, alors que les 100 autres appartiennent à 33 genres dans 22 familles différentes. On trouve ainsi des isoflavonoïdes chez les *Apocynaceae*, les *Meliaceae*, les *Pinaceae*, les *Polygalaceae*, les *Compositae*, les *Myristicaceae*, les *Celastraceae*, les *Euphorbiaceae*, les *Zingiberaceae*, les *Moraceae* et les *Scrophulariaceae*.

Les isoflavonoïdes sont majoritairement retrouvés au niveau des graines et des racines des plantes qui les synthétisent (Graham, 1991b ; Harrison et Dixon, 1993). Les feuilles et les tiges en contiennent également mais en concentration plus faibles, et surtout lors d'agression par des facteurs de type biotique (attaque par des herbivores, des insectes ou des agents pathogènes) ou abiotique (UV, blessure) (Dixon et Paiva, 1995).

Les isoflavonoïdes se présentent sous forme simple ou complexe (substitution par des cycles, ou des chaînes dérivant des groupes prenyl- ou geranyl-). Les proportions entre les isoflavonoïdes simples et complexes sont inverses chez les plantes appartenant aux familles des Légumineuses et des non-Légumineuses. Ainsi, on note que les isoflavonoïdes complexes sont les plus nombreux chez les Légumineuses, alors qu'ils sont la catégorie la plus faiblement représentée dans les autres familles de plantes. Il ressort également de cette étude que les isoflavones sont les isoflavonoïdes les plus nombreux chez les Légumineuses, suivis en quantité décroissante par les ptérocarpanoïdes et les roténoïdes. Pour les genres appartenant à d'autres familles que celle des Légumineuses, les isoflavones sont également les plus nombreux mais les roténoïdes se retrouvent en quantité supérieure à celle des ptérocarpanoïdes. Les coumestanes, dont nous avons relaté la forte activité oestrogénique précédemment, sont assez fréquemment détectées dans les plantes analysées.

Certains isoflavonoïdes très particuliers ont été récemment identifiés dans plusieurs familles de plantes ainsi que chez les Légumineuses. Ces molécules présentent une singularité, soit par leur voie de biosynthèse atypique (wrightiadiolone, isolée de *Wrightia tomentosa* (*Apocynaceae*)), soit par la présence d'atomes de chlore et d'azote dans leur structure moléculaire (Tahara et Ibrahim, 1995).

Tahara et Ibrahim (1995) rapportent par ailleurs que les isoflavonoïdes se trouvent sous forme aglycone dans 80 à 85 % des cas ce qui est très important par rapport aux flavonoïdes. Cette proportion est en désaccord avec plusieurs études récentes. En effet, Wang et Murphy (1994) ont analysé des graines de soja et déterminé que 98 % des isoflavonoïdes présents se trouvent sous forme de glucosides, malonylglucosides et acétylglucosides. Si ce chiffre diminue pendant le développement de la plantule, les formes libres des isoflavonoïdes restent toujours minoritaires. La forte occurrence des isoflavonoïdes glycosylés chez le soja est également rapportée par Matsuura *et al.* en 1993 et 1995.

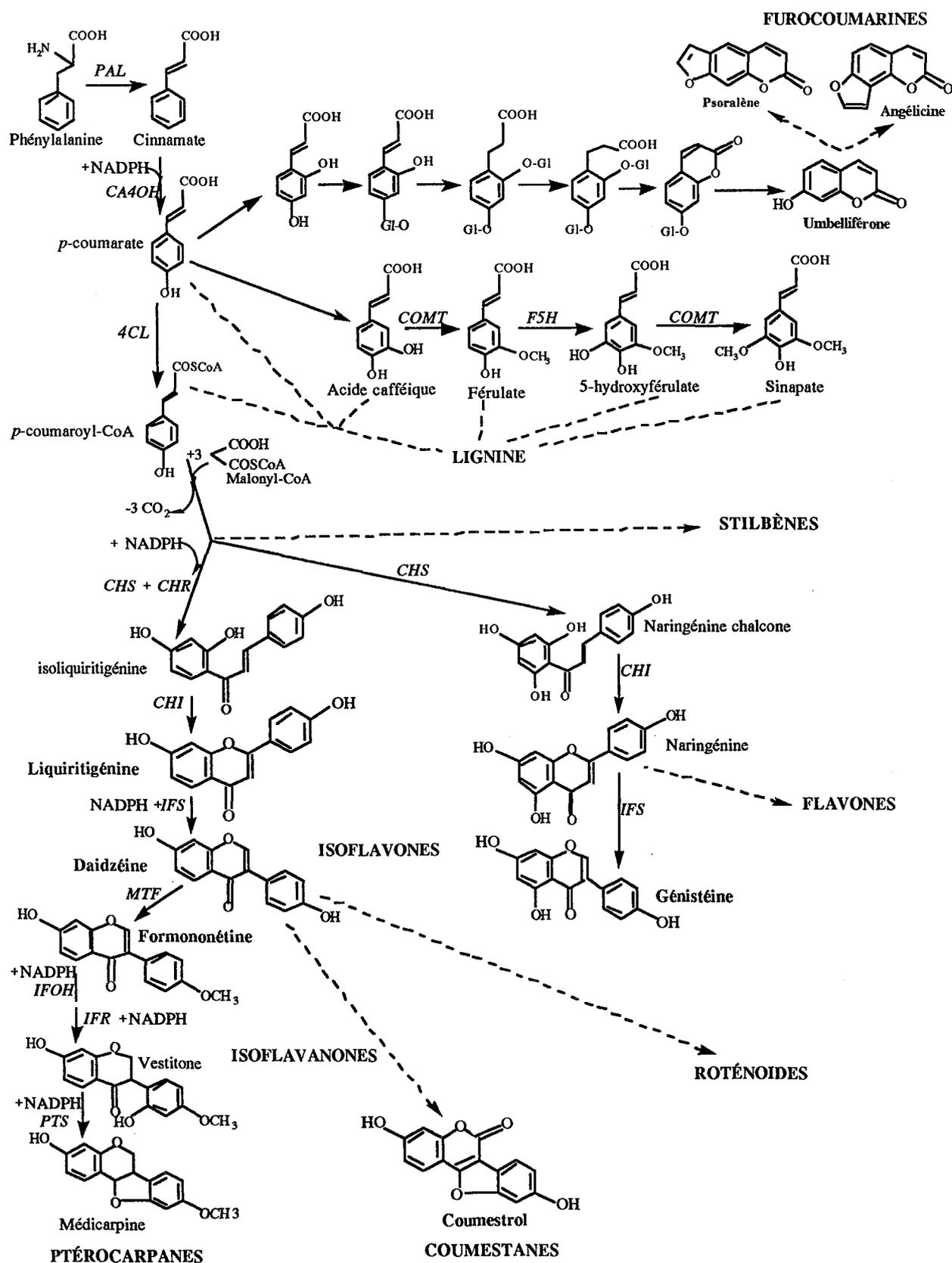


Figure 5. Schéma de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

CA4OH, cinnamate 4-hydroxylase; CHI, chalcone isomérise; CHR chalcone réductase; CHS, chalcone synthase; 4CL, 4-coumarate CoA ligase; COMT, acide caféique-O-méthyltransférase; F5H, férulate 5-hydroxylase; IFR, isoflavone réductase; IFS, isoflavone synthase; PAL, L-phénylalanine ammonia lyase.

(—) : réactions catalysées par une seule enzyme ; (- - -) : réactions catalysées par plusieurs enzymes.

Ces données contradictoires sur l'occurrence des formes aglycones et glycosylées des isoflavonoïdes pourraient résulter des protocoles mis en place pour évaluer les teneurs contenues dans les plantes. En effet, les isoflavonoïdes sont pour la plupart d'entre eux, des phytoalexines. Lors de la récolte des plantes ou de l'extraction des métabolites secondaires, les plantes subissent des agressions qui auront pour conséquence de libérer rapidement les formes glycosylées stockées au niveau de la vacuole dans le cytoplasme où se trouvent les β -glucosidases endogènes. L'hydrolyse peut alors se produire, conduisant à la libération des isoflavonoïdes sous leur forme libre. En l'absence de précautions particulières, la détection des formes aglycones résulteraient d'un artefact dû au protocole d'extraction des molécules (Nguyen *et al.*, 1997).

2.2.5. Biosynthèse des isoflavonoïdes

2.2.5.1. Voie métabolique

La biosynthèse des isoflavonoïdes a été particulièrement bien étudiée chez les Légumineuses d'intérêt agronomique comme le soja, le pois, la luzerne, le pois chiche et le haricot vert. Les isoflavonoïdes qui appartiennent au métabolisme des phénylpropanoïdes. Ils dérivent de l'acide cinnamique qui sera hydroxylé en position 4 puis sera transformé en *p*-coumarate-CoA sous l'action de la 4-coumarate CoA ligase. De nombreux phénylpropanoïdes, induits par réponse à une agression, dérivent du squelette flavonoïde en C15, synthétisé par condensation du *p*-coumaroyl-CoA avec 3 molécules de malonyl-CoA sous l'action de la chalcone synthase (Harborne, 1988). Dans la plupart des familles de plantes, le produit initial de la chalcone synthase est un tétrahydroxychalcone, converti par la suite en diverses classes de flavonoïdes (flavones, flavanes, flavanones, anthocyanines; Holton et Cornish, 1995). Chez les légumineuses, qui possèdent en plus une chalcone isomérase, il se forme un trihydroxychalcone (Welle et Grisebach, 1989). Dans un certain nombre d'espèces comme le pin, la vigne ou la cacahuète, la condensation du *p*-coumaroyl CoA avec les 3 molécules de malonylCoA peut également conduire à la formation de stilbènes, réaction catalysée par un stilbène synthase (Schröder *et al.*, 1988). Chez les Légumineuses, après fermeture du cycle B par la chalcone isomérase, l'isoflavone synthase réarrange le squelette carboné flavonoïdique ce qui conduit à l'accumulation de nombreux isoflavonoïdes simples : isoflavones, coumestanes, ptérocarpanes et isoflavanes (Figure 5).

2.2.5.2. Régulation enzymatique de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes

La régulation du métabolisme des phénylpropanoïdes est très étudiée ; il conduit en effet aux composés impliqués dans les réponses de type phytoalexine, et sa compréhension est d'un très grand intérêt pour la protection des plantes cultivées contre les agents pathogènes. En conséquence, des expériences nombreuses et poussées ont été menées sur les enzymes de cette chaîne biosynthétique.

La plupart des enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes ont été localisées. Ainsi, la phénylalanine-ammonia lyase, la chalcone synthase, la chalcone isomérase, la chalcone réductase et l'isoflavone réductase sont des enzymes cytoplasmiques. Il semblerait cependant, d'après des études par immunolocalisation que ces enzymes perdent leur association avec des structures membranaires au cours des protocoles d'extraction enzymatique (Smith *et al.*, 1994). A l'inverse, les enzymes cytochrome P450 dépendantes comme la cinnamate-4-hydroxylase, l'isoflavone synthase et l'isoflavone hydroxylase sont des protéines intégrées à la membrane du reticulum endoplasmique ou à des fragments de cette membrane (Smith *et al.*, 1994). Hakamatsuka et Sankawa (1993) suggèrent que chez le soja, l'isoflavone synthase est en fait constituée de 2 enzymes, la 2 hydroxyisoflavone synthase cytochrome P450 dépendante, et la 2 hydroxyisoflavone déshydratase qui serait une enzyme soluble. Hrazdina et Wagner (1985) ont émis l'idée que les enzymes cytoplasmiques solubles forment des groupements métaboliques d'enzymes associées à des surfaces membranaires adjacentes aux enzymes cytochromes P450 dépendantes. Les intermédiaires du métabolisme des phénylpropanoïdes pourraient ainsi passer d'une enzyme à la suivante rapidement pour finalement être intégrés à la membrane qui fusionnera ou non avec la vacuole. Ce modèle serait valable pour le métabolisme des phénylpropanoïdes simples. Cependant, les prényltransférases impliquées dans la synthèse des ptérocarpanes ou des furocoumarines sont associées aux membranes plastidiques et non au reticulum endoplasmique, ce qui nécessiterait le transfert de ces composés entre des membranes et /ou des compartiments cellulaires différents (Dhillon et Brown, 1976 ; Biggs *et al.*, 1990).

Les premières enzymes de la voie des phénylpropanoïdes ont été isolées depuis une vingtaine d'années. Lindl *et al.* ont en effet réalisé la synthèse de *p*-coumaroyl CoA avec la *p*-coumarate CoA ligase qu'ils ont isolée et caractérisée à partir d'une suspension cellulaire de soja en 1973. Depuis une dizaine d'années, les gènes codant pour ces enzymes ainsi que plusieurs autres de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes ont été clonés. Le nombre de gènes codant pour une enzyme donnée varie d'une famille de plante à une autre. Ainsi, la chalcone synthase est codée par un seul gène chez *Arabidopsis thaliana* (Lee *et al.*, 1995), 3 à 4 chez *Vitis vinifera* (Sparvoli *et al.*, 1994), et *Camellia sinensis* (Takeuchi *et al.*, 1994), alors que 8 à 12 gènes sont nécessaires chez la luzerne (McKhann et Hirsch, 1994). La phénylalanine-ammonia

Tableau 4. Quelques facteurs externes intervenant sur la régulation de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes référencés dans la littérature.

Facteurs	Enzymes	Effets	Plantes	Références bibliographiques
Age de la plante				
	PAL, 4CL	transcription ARNm	<i>Arabidopsis thaliana</i> (jeunes racines feuille adulte)	Lee <i>et al.</i> , 1995
	CHS, CHI	activation	<i>Medicago sativa</i> (apex racinaires jeunes racines)	McKhann et Hirsch, 1994
	PAL, 4CL, CHS	synthèse <i>de novo</i>	Haricot	Choudhary <i>et al.</i> , 1990
	PAL	activation	Broccoli (viabilité du pollen)	Kishitani <i>et al.</i> , 1993
Lumière				
UV	PAL, 4OH, 4CL, CHS	synthèse <i>de novo</i>	Persil	Chappell et Hahlbrock, 1984
			Moutarde	Rocholl <i>et al.</i> , 1994
			Pomme	Dong et Lancaster, 1995
			Theier	Takeuchi <i>et al.</i> , 1994
			Carotte	Takeda <i>et al.</i> , 1993
			<i>Gomphrena globosa</i>	Castaneda et Quintero, 1991
lumière bleue	CHS	transcription ARNm	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Batschauer <i>et al.</i> , 1996
	PAL	transcription ARNm	Persil	Merkle <i>et al.</i> , 1994
			<i>Gomphrena globosa</i>	Castaneda et Quintero, 1991
rayons γ	PAL, 4CL	activation	Pomme de Terre	Pendharkar et Nair, 1995
Agents pathogènes				
<i>Alternaria cassia</i>	PAL	activation	<i>Cassia obtusifolia</i>	Hoagland, 1990
<i>Botrytis cinerea</i>	PAL	synthèse <i>de novo</i>	Pavot	Nadaska et Erdelsky, 1991
<i>Ceratocystis ulmi</i>	PAL	activation	Orme	Corchete <i>et al.</i> , 1993
<i>Phytophthora megasperma</i>	PAL, 4CL, CHS CHR, CHI	transcription	Soja	Ebel <i>et al.</i> , 1985
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	PAL	activation	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Miklas, 1993
Autres facteurs				
Blessure	4OH	activation	Patate douce	Tanaka <i>et al.</i> , 1974
			Pomme de Terre	Rich et Lamb, 1977
chitine, chitinase chitosane	PAL	activation	Riz	Notsu <i>et al.</i> , 1994
Faible nutrition azotée	CHS	activation	Tomate	Bongue-Bartelsman et Phillips, 1995

lyase semble souvent codée par une famille multigénique. On en dénombre 2 pour *Medicago sativa* (Gowri *et al.*, 1991), 4 chez *Phaseolus vulgaris* (Bolwell *et al.*, 1985), 15 à 20 chez *Vitis vinifera* (Sparvoli *et al.*, 1994) et jusqu'à 40 pour la pomme de terre (Wanner *et al.*, 1995). Au contraire, chez le pin (*Pinus taeda*) (Whetten et Sederoff, 1992) et le tabac (Nagai *et al.*, 1994a ; 1994b) un seul gène code pour la PAL. Les autres enzymes de la voie générale de biosynthèse des phénylpropanoïdes sont codées par un nombre de gènes beaucoup plus restreint. Ainsi, la synthèse de la 4-coumarate CoA ligase n'implique que 2 gènes chez le riz (Zhao *et al.*, 1990), le persil (Douglas *et al.*, 1987 ; Lozoya *et al.*, 1988) ou le soja (Knobloch et Hahlbrock, 1975). La chalcone isomérase est fréquemment codée par un seul gène (Dixon et Harrison, 1990). On peut noter que plus la voie de biosynthèse devient spécifique, plus le nombre de gènes codant pour l'enzyme impliquée est réduit ce qui implique sans doute une régulation plus précise des métabolismes activés en réponse à une attaque par un agent pathogène précis.

Les niveaux d'activité de ces enzymes de la voie de biosynthèse des isoflavonoïdes varient beaucoup selon les conditions environnementales et le stade de développement de la plante (Gagnon *et al.*, 1995). Ils varient également en réponse à une agression par un facteur exogène comme l'irradiation par les UV, la lumière bleue ou encore les rayonnements γ , utilisés pour la stérilisation des denrées alimentaires (Tableau 4).

L'induction du métabolisme des isoflavonoïdes est également très étudiée en réponse à une agression par un agent pathogène. De façon générale, on observe une activation de la transcription des gènes codant pour la PAL, la 4-coumarate CoA ligase, l'orthohydroxylase et la chalcone synthase en présence d'un champignon, ou même d'une levure (Gowri *et al.*, 1991 ; Jorin et Dixon, 1990). L'activation des 4 premières enzymes du métabolisme général des phénylpropanoïdes est rapide et plus ou moins durable. L'augmentation de l'activité de ces enzymes est encore plus drastique chez les espèces résistantes à un agent pathogène lorsqu'elles sont mises en sa présence (Miklas, 1993 ; Corchete *et al.*, 1993).

Les enzymes situées en aval de cette première étape du métabolisme des phénylpropanoïdes sont induites de façon beaucoup plus spécifiques en fonction de la plante et de l'agent pathogène. La réaction de la plante face à l'agression par l'agent pathogène a donc lieu en deux phases, la première étant non spécifique, à l'inverse de la seconde qui dépend de la nature de l'agresseur. La multigénicité des familles codant pour la PAL et la chalcone synthase pourrait permettre la régulation très fine de la voie de biosynthèse des isoflavonoïdes en fonction de la nature de l'agression.

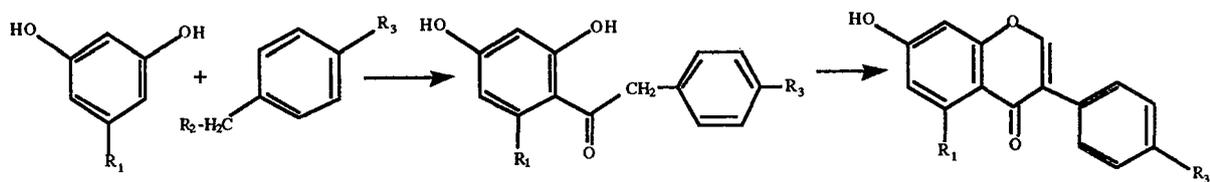
D'autres éléments peuvent induire une activation de la synthèse des enzymes de la voie des phénylpropanoïdes : blessure, addition de chitine, chitinase ou encore de chitosane. Des facteurs abiotiques sont également capables d'agir sur les enzymes du métabolisme des phénylpropanoïdes : ainsi, le fructose, le saccharose, le maltose et l'acide gibbéréllique activent

la transcription de la chalcone synthase (Takeuchi *et al.*, 1994). Des températures basses, une faible nutrition azotée ou même la simple dilution d'une suspension cellulaire suffisent à augmenter l'activité PAL. Le stress azoté provoque également une activation de la chalcone synthase chez la tomate (Bongue-Bartelsman et Phillips, 1995). Ces deux auteurs proposent l'explication suivante : en cas de stress azoté, la dégradation de la phénylalanine serait augmentée en vue de palier la carence grâce au groupement NH_2 qui résulte de la désamination par la PAL. Le cinnamate résultant de cette étape de dégradation serait alors introduit dans le métabolisme des flavonoïdes, d'où une activation des enzymes liées à cette voie de biosynthèse.

On constate ainsi que de très nombreux facteurs biotiques et abiotiques induisent une activation enzymatique de ce métabolisme des phénylpropanoïdes. Plusieurs auteurs ont même envisagé l'emploi de gènes antisens de la chalcone synthase pour maîtriser dans un but commercial, la voie de biosynthèse des anthocyanines, pigments à l'origine de la couleur des fleurs.

Il faut noter que la régulation de la voie des phénylpropanoïdes implique également le métabolisme adjacent de la voie des pentoses phosphates. Ce métabolisme parallèle fournit les groupements NADPH, cofacteurs indispensables au fonctionnement des réductases et des hydrolases cytochromes P450 dépendantes qui interviennent au cours du métabolisme des phénylpropanoïdes. Lors d'une élicitation, on observe en effet une activation de la transcription des gènes codant pour la phosphate déshydrogénase du cycle des pentoses phosphate, ce qui provoque une augmentation du nombre de NADPH alors disponibles pour la biosynthèse des isoflavonoïdes (Dixon et Paiva, 1995 ; Fahrendorf *et al.*, 1995).

Nous avons vu précédemment que le métabolisme des phénylpropanoïdes était induit très rapidement de façon non spécifique dès qu'interviennent des modifications des paramètres de croissance. Plusieurs auteurs se sont récemment intéressés aux mécanismes de contrôle intervenant sur cette voie de biosynthèse. Lawton *et al.* ont constaté en 1983, que la quantité d'ARNm de la PAL était augmentée très rapidement puis diminuée avant qu'un deuxième pic ne se manifeste à nouveau. En 1990, Dalkin *et al.* ont confirmé ce phénomène et l'ont mis en évidence également pour la 4-coumarate CoA ligase et la chalcone synthase. Loake *et al.* (1991) expliquent que ce phénomène serait à une rétroinhibition de la synthèse *de novo* des enzymes par les produits finaux des réactions qu'elles catalysent. Chez la luzerne, les précurseurs, cinnamate et *p*-coumarate sous forme *trans* inhiberaient l'activation de la chalcone synthase en agissant sur le promoteur du gène. Dixon *et al.* (1995) précisent qu'un taux trop important de cinnamate serait à l'origine de la synthèse d'une protéine capable de se fixer de façon irréversible sur le site actif de la PAL, ce qui induirait une régulation négative de la voie de biosynthèse des flavonoïdes. Un second mécanisme est envisagé par Bolwell (1992) qui établit un lien direct entre le taux de phosphorylation de la PAL et la régulation négative qu'elle subit. En effet, l'ajout d'un éliciteur provoque une augmentation de la transcription des gènes codant pour la PAL puis une phosphorylation très rapide intervient. Il est probable que cette étape de



R₁=H, R₂=COOH, R₃=OH

Daidzéine

R₁=H, R₂=COOH, R₃=OMe

Formononétine

R₁=OH, R₂=CN, R₃=OH

Génistéine

Figure 6. Biosynthèse chimique des isoflavones

phosphorylation soit le marqueur moléculaire nécessaire à la reconnaissance de cette protéine par des enzymes chargées de sa dégradation. Ceci est le cas chez les eucaryotes pour des enzymes comme l'HGM réductase par exemple (Parker *et al.*, 1989). La régulation de la PAL serait donc double : par modulation de son activité et par régulation de sa dégradation.

La biosynthèse des isoflavonoïdes a également été obtenue par voie synthétique depuis de nombreuses années (Schriner et Hull, 1945). Longue et fastidieuse, elle ne pouvait être envisagée pour la synthèse de génistéine et de daïdzéine à l'échelle industrielle en vue de l'utilisation de ces molécules pour l'étude de leurs effets en tant qu'anticancérogènes potentiels. Récemment, Chang *et al.* (1994) ont mis au point une méthode de synthèse rapide à partir du résorcinol et d'acide 4-hydroxyphénylacétique (Figure 6). L'utilisation des microondes comme source d'énergie permet d'obtenir en deux minutes la daïdzéine (rendement 57 %) et la génistéine (rendement 51 %).

Cette synthèse très rapide et beaucoup moins coûteuse des isoflavones daïdzéine et génistéine permettra leur utilisation à moindre frais pour comprendre comment ces composés, une fois ingérés, sont directement impliqués dans la prévention de la tumorigénèse des cellules saines.

Le métabolisme des phénylpropanoïdes qui comprend à la fois la voie de biosynthèse des isoflavonoïdes et celle des furocoumarines est très complexe et sa régulation est de première importance pour la survie de la plante. La synthèse de molécules dirigées contre une attaque précise est effectivement coûteuse en énergie et la réponse de type phytoalexine doit être à la fois rapide et adaptée, d'où une régulation très précise et coordonnée de toutes les réactions enzymatiques mises en jeu.

Les isoflavonoïdes et les furocoumarines sont deux familles de molécules ayant un grand intérêt pharmaceutique. Leur utilisation potentielle ou effective pour les furocoumarines nécessite une production stable dont la quantité et la qualité puissent être contrôlées aisément. Ce sont ces impératifs qui ont conduits les chercheurs du laboratoire (Bourgaud, 1990 ; Nguyen, 1992) à envisager la production de métabolites secondaires par des cultures *in vitro* de Psoralées. Deux types de matériel ont été envisagés

- les cultures de cals, première étape avant l'établissement de suspensions cellulaires
- les racines transformées

Nous nous proposons d'étudier les processus d'obtention de chacun de ces deux types de matériel végétal, ainsi que les avantages et inconvénients référencés dans la littérature en ce qui concerne leur croissance et leur potentiel de production en métabolites secondaires.

3- CULTURES IN VITRO

3.1. Cultures de cals

3.1.1. Obtention d'une lignée de cals

L'obtention d'un cal constitue l'une des étapes possibles pour l'établissement d'une suspension cellulaire. La dissociation directe du tissu végétal en cellules isolées par des méthodes mécaniques (dilacération) et/ou enzymatiques (pectinase, cellulase...) permet également d'obtenir des suspensions cellulaires.

Un cal est un tissu végétal qui consiste en un amas de cellules indifférenciées obtenues à partir d'explants stériles placés sur un milieu de croissance approprié.

Il est généralement admis qu'il est préférable d'initier une culture à partir de plantes à forte potentialité de production (Deus et Zenk, 1982). De la même façon, l'organe qui servira d'explant de départ sera choisi selon ses capacités à se différencier mais également en fonction de sa teneur en métabolites secondaires. Il faut toutefois noter que les voies de biosynthèse des métabolites secondaires peuvent être modifiées lors du passage d'une culture de plante à une culture de tissu. Ainsi, en 1996, Hayashi *et al.* ont établi des cultures de cals à partir de plants de *Scoparia dulcis* produisant de l'acide scopalducique B (diterpénoides). Après analyse, il s'avère que les cals ne produisent pas d'acide scopalducique B mais de l'acide scoparique, et à l'état de trace uniquement. Les auteurs suggèrent que la production de l'acide scopalducique est supprimée dans les cellules indifférenciées. Choisir un explant riche en métabolites secondaires recherchés semble donc une condition nécessaire mais pas forcément suffisante pour établir une souche cellulaire hyperproductrice.

Le choix du milieu de culture est le deuxième paramètre important pour établir des cultures de tissu. Si l'on sait depuis 1865 avec Knop ce qui est nécessaire à une plante pour se développer, c'est Gautheret en 1934 qui a déterminé la composition minimale d'un milieu pour les cultures *in vitro*. Il a ainsi ajouté aux éléments inorganiques préconisés par Knop, le sucre, les acides aminés, les vitamines et les hormones de croissance (Leifert *et al.*, 1995). Dès 1960, de nombreux auteurs ont établi des milieux de culture selon la plante et /ou le type d'explant. A titre d'exemple, 25% des cultures cellulaires sont préparées à l'heure actuelle avec les macroéléments de Murashige et Skoog (1962).

Plusieurs facteurs peuvent influencer la dédifférenciation du matériel végétal et la croissance du cal obtenu : le ratio $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ (Selby et Harvey, 1990), les besoins en ions calcium et magnésium (Bellini *et al.*, 1990), en ions phosphate (Sakano *et al.*, 1995a, 1995b), ou encore la nature et la concentration de la source carbonée. Par exemple, Ströbel *et al.* (1990) montrent que les concentrations en saccharose doivent être doublées de 30 à 60 g/l pour obtenir

une croissance maximum sur des suspensions cellulaires de *Gallium vernum* cultivées sur milieu Murashige et Skoog (1962). Pour *Taxus brevifolia*, c'est l'ajout de glucose et de fructose à des concentrations de 2,5 g/l qui permet une amélioration du taux de croissance (Wickremesinhe et Arteca, 1993).

La disponibilité des éléments nutritifs a également une influence sur le taux de croissance. Pasqualetto *et al.* (1988) montrent que la gelrite enrichit le milieu de culture en ions potassium et magnésium, et que l'agar retient les éléments minéraux. Van Ark *et al.* (1991) obtiennent deux fois plus de cals de *Poa pratensis* sur un milieu solidifié avec de la gelrite que sur un milieu solidifié avec de l'agar à concentration identique. Pasqualetto *et al.* (1988) ont également établi que certaines molécules précipitent après autoclavage, diminuant ainsi la quantité d'ions zinc de 20% et celle des ions fer et phosphate de 45%. Par ailleurs, Schenk *et al.* (1991) ont montré que la présence d'acides aminés dans un milieu induisait la caramélisation du sucre au cours de l'autoclavage, modifiant ainsi la nature et la concentration de la source carbonée disponible.

Selon le type de matériel végétal mis en culture, des modifications sont souvent apportées aux milieux de bases proposés par la littérature.

En diminuant des 3/4 les teneurs en azote du milieu de Murashige et Skoog (1962), Schripsema et Verpoorte (1995) multiplient par deux la biomasse des suspensions de *Catharanthus roseus* étudiées. Dans une étude réalisée sur des suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus* également, Sakano *et al.* (1995a ; 1995b) ont mis en évidence qu'une absence totale de phosphate empêchait la croissance, de la même manière qu'une concentration trop élevée (5 mM). Il est donc nécessaire d'ajuster de façon très fine la quantité de phosphate apportée pour obtenir une croissance optimale.

Les modifications le plus souvent apportées concernent les hormones de croissance. L'obtention d'un cal est en effet liée à l'équilibre existant entre les auxines et les cytokinines ajoutées au milieu de culture (Skoog et Miller, 1957). Les auxines généralement employées sont l'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique ou 2,4.D., l'acide indole acétique (AIA), l'acide indole butyrique (AIB) ou l'acide naphthalène acétique (ANA). Les cytokinines les plus fréquentes sont la kinétine et la benzyl aminopurine (BA). Pour l'induction de cals à partir de feuilles de *Taxus* de différentes espèces, Wickremesinhe et Arteca (1993) indiquent que le 2,4.D. est la meilleure auxine. Par ailleurs, ces auteurs rapportent qu'une trop forte concentration en kinétine provoque la mort des explants mis en culture. Mita *et al.* (1994) indiquent également que le 2,4.D. est l'auxine la plus efficace pour initier des cals à partir de feuilles, de tiges et de racines d'*Alkanna tinctoria*. Jafari *et al.* (1995) précisent qu'aucun cal n'est obtenu à partir de pétioles de peupliers en l'absence de 2,4.D. dans le milieu de culture. En ce qui concerne les cytokinines, kinétine et BA sont utilisées de façon identique dans la bibliographie. O'Dowd *et al.* (1993) sur *Ephedra* et Mita *et al.* (1994) sur *Alkanna tinctoria* utilisent la kinétine. Girod et Zrýd (1991), sur des graines d'*Agrostis alba*, et Bois (1992) sur des pétioles et des feuilles de *Fragaria vesca*

établissent des cals en 4 semaines sur un milieu de Murashige et Skoog (1962) supplémenté en BA.

De façon générale, il est difficile d'établir un classement, en terme d'efficacité, des milieux et des hormones citées dans la littérature. En effet, très souvent les auteurs testent la callogenèse sur un seul milieu (dans la plupart des cas, le milieu de Murashige et Skoog (1962)), et en cas de réussite ne comparent pas les taux de croissance qu'ils obtiennent avec ceux qu'ils trouveraient sur des milieux différents ou autrement supplémentés. Par conséquent, il est difficile de savoir si les méthodes décrites dans la bibliographie sont celles qui permettent d'obtenir un taux de croissance maximal pour une espèce donnée.

3.1.2. Production de métabolites secondaires

La synthèse de métabolites secondaires a généralement lieu durant la phase stationnaire du cycle de croissance des cals. Ce phénomène a été détaillé par Kakegawa *et al.* (1995) sur des suspensions cellulaires de *Vitis vinifera* produisant des anthocyanines, ainsi que sur des cultures de cals d'*Alkanna tinctoria* par Mita *et al.* (1994). Fett Neto *et al.* (1994) mettent en évidence que la production de taxol par des suspensions cellulaires de *Taxus cuspidata* se déroule en deux temps : un premier pic est observé durant la première phase du cycle de croissance et un second plus important pendant la phase stationnaire. Cresswell *et al.* (1989) suggèrent que la non simultanée entre la croissance et la production de métabolites secondaires est liée avec le fait que le métabolisme secondaire ne s'exprime que lorsque la division cellulaire est bloquée. Ces mêmes auteurs rapportent toutefois que dans le cas d'une culture de *Catharanthus roseus*, il existe une corrélation linéaire et directe entre la production de serpentine et la production de biomasse. Cette corrélation positive entre concentration en métabolites secondaires et division cellulaire existe également pour l'accumulation de bétacyanines dans des cultures cellulaires de *Phytolacca americana* (Sakuta *et al.*, 1986).

Il semble que la production de métabolites secondaires par des cals soit liée à la nature du matériel végétal. Elle peut également être contrôlée par des facteurs environnementaux : composition du milieu de culture, nature et concentration en régulateurs de croissance, pH, température, luminosité, aération ou encore conditionnement. L'application de contraintes biotiques et abiotiques a également été envisagée lorsque le métabolite secondaire recherché est une phytoalexine. Nous nous proposons d'effectuer un tour d'horizon des moyens mis en oeuvre depuis une dizaine d'années pour améliorer la production en métabolites secondaires par des cals ou des suspensions cellulaires.

✓ *Composition du milieu de culture*

La teneur et la nature du ou des sucres utilisés, le rapport entre l'azote réduit et l'azote oxydé ainsi que la concentration en ions phosphate sont des paramètres qui sont étudiés en détail par de nombreux auteurs.

Le saccharose est la source carbonée la plus adéquate pour la majorité des suspensions cellulaires ou des cals. Rodriguez-Monroy *et al.* (1994) obtiennent un rendement en bétalaine optimal pour de suspensions cellulaires de *Beta vulgaris* sur un milieu supplémenté avec du saccharose à 1 %. L'addition de galactose, de lactose ou de glucose à des concentrations variées conduit à un rendement inférieur. Le saccharose à une concentration de 4,5 % est également préconisé sur les cultures de *Perilla frutescens* pour une production maximale d'anthocyanines (Zhong *et al.*, 1994). Cresswell *et al.* (1989) suggèrent que la plus forte adéquation du saccharose en terme de rendement en métabolites secondaires serait due au fait que le carbone est acheminé aux cellules dans la plante entière sous forme de saccharose.

Si la nature de la source carbonée est importante, les concentrations auxquelles il est utilisé le sont également. Ainsi, lorsque les concentrations en saccharose sont augmentées de 60 à 360 mM dans des cultures de cals d'*Oxalis linearis*, les concentrations en anthocyanines sont multipliées par un facteur 4 (Meyer et Van Staden, 1995). Il faut toutefois noter que cette amélioration du rendement en anthocyanines s'accompagne d'une diminution très sensible du taux de croissance. Un doublement de la concentration en saccharose est également préconisé par Shure et Acree (1994) pour améliorer la production de β -damascenone (synthétisée sous forme de glucoside) par des suspensions cellulaires de *Vitis labruscana*. Do et Cormier (1991) ont également montré que la production d'anthocyanines par des cultures cellulaires de *Vitis vinifera* est stimulée par de fortes concentrations de saccharose (132 mM). L'augmentation des teneurs en métabolites secondaires en présence de fortes concentrations en saccharose pourrait être due à une perméabilisation cellulaire. En effet, Zhong *et al.* (1994) observent que l'augmentation de la concentration en anthocyanine dans le milieu de culture de suspension cellulaires de *Perilla frutescens* en présence de fortes teneurs de saccharose s'accompagne d'une diminution du volume cellulaire et d'un enrichissement du milieu en composés protéiques. Ces phénomènes seraient liés à une perméabilisation membranaire, conséquence directe de l'augmentation de la pression osmotique causée par la présence de saccharose dans le milieu de culture.

Les teneurs en ions nitrate et phosphate ont également une influence sur la production de métabolites secondaires par des cultures de cals ou des suspensions cellulaires. L'azote est apporté aux cultures de cellules sous forme réduite (NH_4^+) et/ou oxydée (NO_3^-). L'utilisation de l'azote sous forme ammonium est moins coûteuse en énergie que celle des nitrates qui nécessitent une étape de réduction supplémentaire avant l'absorption (Cresswell *et al.*, 1989).

Fujita *et al.* (1981) montrent cependant que l'augmentation des concentrations en ammonium inhibe la synthèse de shikonine par des suspensions cellulaires de *Lithospermum erythrorhizon*. Moreno *et al.* (1995) ont établi qu'une augmentation de la concentration en azote quelle que soit sa forme, dans le milieu de culture de cellules de *Catharanthus roseus* augmente le taux de croissance mais diminue très fortement la production d'alcaloïdes. A l'inverse, Zhong *et al.* (1996) indiquent qu'une augmentation de la teneur en nitrate permet d'améliorer à la fois la croissance et la production de saponines par des suspensions cellulaires de *Panax quinquefolium*.

En ce qui concerne les ions phosphates, il semble clairement établi que l'augmentation des concentrations dans les milieux de culture, dans une certaine mesure, améliore la croissance des suspensions cellulaires et des cals. En effet, les ions phosphates sont très impliqués dans le métabolisme primaire et un accroissement des teneurs en phosphate provoque une stimulation du métabolisme primaire, donc une amélioration de la croissance. Ceci implique une régulation négative sur le métabolisme secondaire et par conséquent une inhibition des voies de biosynthèse correspondant aux métabolites secondaires recherchés (Dedaldechamp *et al.*, 1995). En effet, Moreno *et al.* (1995) constatent qu'une teneur importante en phosphate provoque une diminution des concentrations en alcaloïdes dans les suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus*. Cependant, lorsque la croissance et la biosynthèse sont simultanées, l'effet stimulateur des ions phosphate sur la croissance se répercute de manière positive sur la production en métabolites secondaires. Ainsi, une chute des concentrations en phosphate provoque l'arrêt de la synthèse de bétacyanines chez *Phytolacca americana* (Hirose *et al.*, 1990). De la même façon, une augmentation de la concentration en ions phosphate dans le milieu de culture de cellules de *Gallium vernum* améliore le rendement en anthraquinone (Ströbel *et al.*, 1990).

Par ailleurs, les travaux de Corchete *et al.* (1991) sur l'influence de calcium, du manganèse et du lithium sur la production de cardénolides par des suspensions cellulaires de *Digitalis thapsi* témoignent de l'importance possible des autres éléments du milieu.

✓ Hormones de croissance

Les hormones de croissance ou phytohormones affectent la croissance, la différenciation cellulaire et également le métabolisme secondaire des suspensions cellulaires ou des cultures de cals. Les effets varient selon le type et la quantité de phytohormones additionnées au milieu de culture.

L'application de 2,4.D., souvent recommandée pour améliorer la dédifférenciation cellulaire, a très souvent un effet inhibiteur sur la production de métabolites secondaires. En effet, les synthèses des anthocyanines par des cals d'*Oxalis linearis* (Meyer et Van Staden, 1995) et de *Fragaria ananassa* (Mori *et al.* 1994b), ainsi que la biosynthèse de composés phénoliques par

Vanilla planifolia (Funk et Brodelius, 1990), et de théine par des suspensions cellulaires de *Camellia sinensis* (Takahara-Matsuura *et al.*, 1994) sont inhibées par l'addition de 2,4.D. dans les milieux de culture. Toutefois, Mizukami *et al.* (1988) indiquent une très forte stimulation de la synthèse d'anthocyanines par des suspensions cellulaires d'*Hibiscus sabdariffa* lorsque le milieu est complété par du 2,4.D. De façon générale cependant, il est montré que le 2,4.D. bloque la synthèse des métabolites secondaires de la voie des phénylpropanoïdes par action sur la première enzyme de cette voie de biosynthèse, la phénylalanine-ammonia-lyase (Dörnenburg et Knorr, 1996a; 1996b). Les auxines de type AIA, AIB ou ANA semblent au contraire stimuler la biosynthèse des métabolites secondaires.

Les cytokinines les plus employées (BA et kinétine) ont en général un effet positif sur la production de métabolites secondaires. Cependant leur emploi peut conduire à une réorientation du métabolisme secondaire vers des voies de biosynthèse parallèles à celle du métabolite secondaire recherché. Ainsi, l'addition de cytokinine au milieu de culture de *Vanilla planifolia* conduit à une stimulation de la synthèse des composés phénoliques réorientés vers la synthèse des lignines et non de l'acide vanillique (Funk et Brodelius, 1990). D'autre part, la kinétine, ajoutée à des cals de *Beta vulgaris* modifie le rapport des concentrations des divers pigments synthétisés (Ontiveros-Jimenez et Rodriguez-Monroy, 1993).

Les travaux concernant l'addition de gibbérellines sont beaucoup plus rares en ce qui concerne le domaine de la production de métabolites secondaires. Cependant, Ilan *et al.* (1994) rapportent que l'ajout de GA₃ à des suspensions cellulaires de carotte inhibe la synthèse d'anthocyanines.

✓ Facteurs de conditionnement, précurseurs

Un milieu de culture contient des composés relargués par les cellules qui peuvent affecter la croissance et la production en métabolites secondaires des cultures suivantes. Ce milieu est dit « conditionné » (Steinbrenner *et al.*, 1989). De tels facteurs ont été employés par Paulmann sur des cultures de cals de *Vanilla planifolia* (Dörnenburg et Knorr, 1996a). Ils constatent alors un doublement du rendement en vanilline dans ces cultures. L'effet stimulateur des facteurs de conditionnement a également été observé par Mori *et al.* (1994a) qui indiquent la multiplication par un facteur 8 de la production d'anthocyanines par des suspensions cellulaires de *Fragaria ananassa* en présence de milieu de culture filtré.

L'ajout de précurseurs améliore de façon générale les rendements en métabolites secondaires. Ainsi, l'addition de tyrosine sur *Chenopodium rubrum* (Berlin *et al.*, 1986), de phénylalanine sur *Capsicum frutescens* (Dörnenburg et Knorr, 1996a) ou sur *Nicotiana tabacum* (Berlin, 1979), l'éthylamine sur *Camellia sinensis* (Matsuura *et al.*, 1992) ou encore le férulate sur *Vanilla planifolia* (Dörnenburg et Knorr, 1996a), améliore le rendement en métabolites secondaires. Cependant, Cresswell *et al.* (1989) rapporte que l'addition de tryptophane à des cultures de *Catharanthus roseus* n'augmente pas les teneurs en alcaloïdes de ces cultures

(Stafford et Smith, 1986). Il semblerait qu'un précurseur soit d'autant plus efficace qu'il est apporté tard dans la voie de biosynthèse du métabolite secondaire recherché (Moreno *et al.*, 1995; Baker *et al.*, 1994).

✓ *Lumière, aération, température, pH*

L'augmentation de l'intensité lumineuse semble avoir un effet négatif sur la croissance mais plutôt positif sur la production de métabolites secondaires (Moreno *et al.*, 1995). En effet, Figueiredo *et al.* (1995) montrent qu'en lumière continue, la production d'huile essentielle par de l'*Achillea millefolia* est améliorée. Lorsque l'on augmente l'intensité lumineuse, les teneurs en caféine des suspensions cellulaires de *Coffea arabica* (Frischknecht et Baumann, 1983) ainsi que les concentrations en β -damascenone de *Vitis labruscana* (Shure et Acree, 1994) se trouvent augmentées. La qualité de la lumière appliquée influence également la production de métabolites secondaires. Dörnenburg et Knorr (1996a) montrent ainsi que la lumière bleue améliore sensiblement les rendements en vanilline dans les suspensions cellulaires de *Vanilla planifolia*.

La composition en gaz s'avère essentielle pour la production de métabolites secondaires par des suspensions cellulaires. Mirjalili et Linden (1995) indiquent que la composition adéquate pour la production de taxol par des suspensions cellulaires de *Taxus cuspidata* sont 10% d'O₂, 0,5% de CO₂ et 5 ppm d'éthylène. Une augmentation des teneurs en CO₂ et/ou en éthylène provoque l'inhibition de la synthèse de taxol. Moreno *et al.* (1995) précisent que le rapport O₂/CO₂ est très important puisque toute augmentation de la concentration en CO₂ implique une stimulation du métabolisme primaire au détriment du métabolisme secondaire et donc de la synthèse du métabolite recherché.

Les effets de la température sont très variables selon l'espèce voire la souche avec laquelle on travaille pour une même espèce (Moreno *et al.*, 1995). Cependant, Kim et Lee (1993) montrent qu'une diminution de la température de 27 à 10°C durant une période de 6 heures induit une stimulation de l'accumulation de menthol dans une suspension cellulaire de *Mentha piperita*.

En ce qui concerne le pH, il semblerait que l'augmentation des teneurs en métabolites secondaires dans les milieux de culture à pH faible soit due seulement au relargage dans le milieu de culture des métabolites normalement stockés dans les vacuoles au niveau de la cellule (Moreno *et al.*, 1995 ; Cresswell *et al.*, 1989).

✓ *Contraintes biotiques et abiotiques*

Lorsque le métabolite secondaire est une phytoalexine, l'application de contraintes biotiques et abiotiques peut être envisagée pour améliorer la production. De très nombreux auteurs se sont attachés à augmenter les rendements en métabolites secondaires par ce biais et la littérature est très riche d'exemples. On peut cependant classer les éliciteurs les plus couramment utilisés en deux catégories : les contraintes biotiques et abiotiques. Les contraintes biotiques regroupent les molécules naturelles telles les parois de champignons autoclavées, les extraits de levure, les algues autoclavées, les oligosaccharides d'origine végétale ou fongique, les acides gras ainsi que certaines polyamines. Les éliciteurs abiotiques regroupent toutes les autres molécules ou traitements non issus d'organismes animaux ou végétaux : cuivre, chlorure de sodium, méthyl jasmonate ou encore rayonnement UV. Un aperçu des applications de ces diverses molécules est répertorié dans le tableau 5.

La production de furocoumarines par des cultures de cals et des suspensions cellulaires est envisagée depuis de nombreuses années à partir d'espèces appartenant aux Rutacées et aux Ombellifères (Zobel et Brown, 1988 ; 1993). Plus récemment, des cultures de cals et des suspensions cellulaires de diverses espèces de Coronilles ont été analysées pour leur teneurs en furocoumarines (Piovan *et al.*, 1996). L'ensemble des techniques que nous avons détaillées dans ce paragraphe pourraient à court terme permettre d'améliorer les concentrations en métabolites secondaires de façon à rendre les cultures *in vitro* qui synthétisent les furocoumarines, rentables pour l'industrie pharmaceutique.

La différenciation du matériel végétal est très souvent la condition *sine qua non* pour la production de métabolites secondaires par des cultures de cellules. Ce phénomène impose un système de culture en deux phases, l'une consacrée à la production de biomasse et l'autre à celle de la molécule recherchée. Par ailleurs, une dérive génétique peut se produire au cours du temps, conduisant à des rendements plus faibles voire proche de zéro pour des lignées cellulaires considérées comme hyperproductrices (Moreno *et al.*, 1995 ; Dörnenburg et Knorr, 1996a). En conséquence, la découverte dans les années 80 des racines génétiquement transformées par les bactéries *Agrobacterium* issue du sol, constitue une alternative intéressante aux suspensions cellulaires.

Tableau 5. Molécules synthétisées par des cultures de cals, sous l'action d'éliciteurs divers. Cette liste n'est pas exhaustive.

Eliciteurs	Plantes	Métabolites secondaires	Références bibliographiques
Champignons : <i>Alternaria alternata</i> - <i>carthami</i> - <i>sp</i>	<i>Carthamus tinctorius</i> <i>Carthamus tinctorius</i> <i>Ammi majus</i> <i>Petroselinum crispum</i> <i>Solanum oleagnifolium</i>	pigment rouge pigment rouge umbelliférone, coumarine bergaptène, isopimpinelline marmésine bergaptène, isopimpinelline psoralène, xanthotoxine solasodine	Hanagata <i>et al.</i> , 1994 Tietjen et Matern, 1984 Hamerski <i>et al.</i> , 1990 Tietjen <i>et al.</i> , 1983 Quadri et Giuletti, 1993
<i>Aspergillus fumigatus</i> - <i>niger</i> - <i>versicolor</i>	<i>Carthamus tinctorius</i> <i>Tabernaemontana</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Capsicum annuum</i> <i>Daucus carota</i> <i>Carthamus tinctorius</i>	pigment rouge acide ursolique daidzéine capsidiol 6-methoxymelléine pigment rouge	Hanagata <i>et al.</i> , 1994 Van der Heijden <i>et al.</i> , 1988 Dixon et Fuller, 1976 Brooks <i>et al.</i> , 1986 Marinelli <i>et al.</i> , 1991 ; 1994 Hanagata <i>et al.</i> , 1994
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Daucus carota</i> <i>Papaver somniferum</i> <i>Taxus sp</i>	daidzéine, génistéine 6-methoxymelléine alcaloïdes taxol	Dixon et Fuller, 1976 Marinelli <i>et al.</i> , 1990 Bobak <i>et al.</i> , 1995 Ciddi <i>et al.</i> , 1995
<i>Candida albicans</i>	<i>Tabernaemontana</i> <i>Hyoscyamus albus</i>	acide ursolique lubimine	Van der Heijden <i>et al.</i> , 1988 Miguel et Barroso, 1994
<i>Colletotrichum lindemuthinum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Carthamus tinctorius</i>	kiévitone, 2-hydroxygénistéine pigment rouge	Robbins <i>et al.</i> , 1985 Hanagata <i>et al.</i> , 1994
<i>Cytospora abictis</i>	<i>Taxus sp</i>	taxol	Ciddi <i>et al.</i> , 1995
<i>Fusarium moniliforme</i> - <i>oxysporum</i>	<i>Daucus carota</i> <i>Carthamus tinctorius</i> <i>Medicago sativa</i>	6-methoxymelléine pigment rouge médicarpine	Marinelli <i>et al.</i> , 1990 ; 1991 Hanagata <i>et al.</i> , 1994 Gustine et Moyer, 1982
<i>Phytophthora capsici</i> - <i>infestans</i> - <i>megasperma</i>	<i>Capsicum sp</i> <i>Ammi majus</i> <i>Solanum tuberosum</i> <i>Catharanthus roseus</i> <i>Carthamus tinctorius</i> <i>Daucus carota</i> <i>Glycine max</i> <i>Nicotiana tabacum</i> <i>Petroselinum crispum</i>	capsidiol, H ₂ O ₂ umbelliférone, coumarine bergaptène, isopimpinelline marmésine phytubérine, solavetivone ajmalicine pigment rouge 6-hydroxymelleine glyceolline, daidzéine coumestrol capsidiol, composés phénoliques bergaptène, isopimpinelline	De Donato et Chiavazza, 1994 Hamerski <i>et al.</i> , 1990 Brindle <i>et al.</i> , 1988 Frankmann et Kauss, 1994 Hanagata <i>et al.</i> , 1994 Marinelli <i>et al.</i> , 1994 Fett et Zaccharius, 1983 ; Leguay <i>et al.</i> , 1988 Ikemeyer et Barz, 1989 Hahlbrock et Scheel, 1989

Tableau 5. Molécules synthétisées par des cultures de cals, sous l'action d'éliciteurs divers. (Suite)

- <i>megasperma</i> - <i>parasitaca</i> <i>Phytophthora parasitaca</i> (suite)	<i>Petroselinum crispum</i> <i>Pueraria lobata</i> <i>Rosa damascena</i> <i>Capsicum sp</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	xanthotoxine, psoralène daidzéine H ₂ O ₂ H ₂ O ₂ 1-hydroxydebneyol	Kauss <i>et al.</i> , 1994 Park <i>et al.</i> , 1995 Arnott et Murphy, 1991 De Donato et Chiavazza, 1994 Brooks <i>et al.</i> , 1987
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Glycine max</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	glyceolline, daidzéine, coumestrol phytuberol	Fett et Jones, 1995 Chappell <i>et al.</i> , 1989
<i>Pythium aphanidernatum</i> <i>vexans</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	catharanthine	Moreno <i>et al.</i> , 1995 Moreno <i>et al.</i> , 1993
<i>Rhizopus</i>	<i>Curpressus lusitanica</i> <i>Carthamus tinctorius</i>	thujaplicine pigment rouge	Sakai <i>et al.</i> , 1994 Hanagata <i>et al.</i> , 1994
<i>Rhodotorula</i>	<i>Ruta graveolens</i>	psoralène	Eilert, 1989
<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Gossypium</i> <i>Taxus sp</i> <i>Capsicum</i>	gossypol taxol H ₂ O ₂	Altman <i>et al.</i> , 1985 Ciddi <i>et al.</i> , 1995 De Donato et Chiavazza, 1994

Autres éliciteurs :

Extrait de levure	<i>Ipomea patatas</i> <i>Cicer arienatum</i> <i>Pueraria labata</i> <i>Cupressus lusitanicus</i> <i>Daucus carota</i> <i>Ephdra disthachya</i>	ipomeamacone médicarpine maackianine daidzéine β -thujaplicine 6-méthoxymélléine acide p-coumaroyl aminés	Oba et Uritani, 1979 Kessman et Barz, 1987 Mackenbrock <i>et al.</i> , 1993 Park <i>et al.</i> , 1995 Sakai <i>et al.</i> , 1994 Guo et Ohta, 1994 Song <i>et al.</i> , 1995
Algues autoclavées	<i>Carthamus tinctorius</i>	pigment rouge	Hanagata <i>et al.</i> , 1994
Oligosaccharides (végétaux)	<i>Lycopersicon esculentum</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Lythospermum</i> <i>Morinda citrifolia</i>	perturbations enzymatiques lignines shikonine anthraquinone	Farmer <i>et al.</i> , 1991 Bruce et West, 1989 Tani <i>et al.</i> , 1993 Dörnenburg et Knorr, 1994
Oligasaccharides (fongiques)	<i>Oryza sativa</i> Chitosane <i>Pisum sativum</i> <i>Petroselinum crispum</i> <i>Vanilla planifolia</i> <i>Morinda citrifolia</i> Chitine <i>Cephalocereus senilis</i> Xanthane (gomme) <i>Carthamus tinctorius</i> fucoidane <i>Carthamus tinctorius</i>	monilactones pisatine bergaptène, xanthotoxine lignine anthraquinone aurone pigment rouge pigment rouge	Kuchitsu <i>et al.</i> , 1993 Yamada <i>et al.</i> , 1993 Hadwiger <i>et al.</i> , 1994 Hahlbrock et Scheel, 1989 Dörnenburg et Knorr, 1996b Dörnenburg et Knorr, 1994 Pare <i>et al.</i> , 1991 Hanagata <i>et al.</i> , 1994 Hanagata <i>et al.</i> , 1994

Tableau 5. Molécules synthétisées par des cultures de cals, sous l'action d'éliciteurs divers. (Fin)

<p>Autres molécules :</p> <p>CuSO₄ HgCl₂ CdCl₂ NaCl, KCl, Cu, Cd Vanidyl sulfate Methyl jasmonate UV UV</p>	<p><i>Datura stramonium</i> <i>Canavalia ensiformis</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Datura stramonium</i> <i>Catharanthus roseus</i> <i>Petroselinum crispum</i> <i>Lythospermum erythrorhizon</i> <i>Glycine max</i> <i>Petroselinum crispum</i></p>	<p>rishitine médicarpine médicarpine rishitine catharanthine bergaptène, xanthotoxine acide rosmarinique daidzéine coumestrol flavones glucosylés</p>	<p>Whitehead, 1988 Gustine et Moyer, 1982 Gustine et Moyer, 1982 Whitehead, 1988 Moreno <i>et al.</i>, 1995 Kauss <i>et al.</i>, 1994 Mizukami <i>et al.</i>, 1993 Fett et Zaccharius, 1983 Chappell et Hahlbrock, 1984</p>
<p>Acides gras :</p> <p>acide linoléique acide arachidonique</p>	<p><i>Oryza sativa</i> <i>Capsicum annuum</i> <i>Datura stramonium</i></p>	<p>monilactone A capsidiol lubimine</p>	<p>Li <i>et al.</i>, 1991 Hoshino <i>et al.</i>, 1994 Threfall et Whitehead, 1988</p>
<p>Polyamines :</p> <p>spermidine</p>	<p><i>Thalictrum minus</i></p>	<p>bubérine</p>	<p>Hara <i>et al.</i>, 1991</p>

3.2. Les racines transformées

Les racines génétiquement transformées ou « hairy roots » constituent un tissu génétiquement stable ayant la propriété de croître *in vitro* de façon rapide et indéfinie sur un milieu dépourvu d'hormones de croissance, et ceci lorsqu'elles sont repiquées régulièrement (Tepfer et Tempé, 1981). En effet, en l'absence d'un repiquage régulier, les racines d'*Hyoscyamus muticus*, par exemple, brunissent et meurent en moins de 35 jours (Vanhala *et al.*, 1995).

Les mécanismes à l'origine de la transformation de la racine par *Agrobacterium rhizogenes* sont assez complexes. Nous les détaillerons avant de préciser les nombreuses utilisations des racines transformées pour la production de métabolites secondaires.

3.2.1. Mécanismes de la transformation par *Agrobacterium rhizogenes*

Les bactéries pathogènes du sol appartenant à la famille des agrobactéries sont capables de transférer une partie de leur ADN (l'ADN-T) porté sur un plasmide, dans le génôme de la plante hôte (Chilton *et al.*, 1982). L'infection par *Agrobacterium rhizogenes* se fait par le transfert de l'ADN-T situé sur le plasmide Ri de la bactérie au niveau d'une blessure sur une plante hôte. Ce transfert est régulé par des gènes de virulence qui forment la région *vir* du plasmide Ri. La transcription des gènes *vir* est induite par divers composés phénoliques comme l'acétosyringone, qui sont excrétés par les cellules de la plante blessée (Stachel *et al.*, 1985). L'intégration et l'expression des gènes de l'ADN-T dans la cellule de la plante hôte conduit au développement d'un chevelu racinaire. L'ADN-T contient 4 gènes *rol* qui sont responsables de l'acrosissement de la sensibilité de la plante contaminée aux auxines endogènes (Gartland *et al.*, 1991).

Cultivées *in vitro*, ces racines transformées développent de nombreuses ramifications secondaires, sans géotropisme (Legué *et al.*, 1994), sur un milieu de culture sans hormone de croissance. Elles sont capables de synthétiser des métabolites spécifiques de la bactérie infectante : les opines. Ces composés de faible poids moléculaire sont métabolisés par la bactérie comme source d'azote et de carbone (Petit *et al.*, 1978). Actuellement, 3 types de plasmide Ri ont été identifiés et classés en fonction du type d'opine pour laquelle ils codent : agropine, mannopine ou cucumopine (Rhodes *et al.*, 1990).

Les plasmides de type agropine sont constitués de deux fragments distincts appelés régions TL-DNA (L=Left pour gauche) et TR-DNA (R=Right pour droit) (Huffman *et al.*, 1984). Le fragment TR contient les gènes *aux* codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'auxine AIA, ce qui peut expliquer la différenciation des cellules végétales en racines. Dix-huit cadres de lecture (ORF=Open Reading Frame) ont été identifiés sur le fragment TL. Les loci *rol* A, B, C et D correspondant aux ORF 10, 11, 12 et 15 de cette région TL sont impliqués dans le

contrôle de l'induction du chevelu racinaire (White *et al.*, 1985). Les gènes *rol* A, B et C sont individuellement capables d'induire des racines (Bellincampi *et al.*, 1996). Le fragment TL-DNA modifie le développement des racines transformées. L'induction et la morphologie anormale de ces racines seraient en effet dues à une altération du métabolisme des hormones de la plante ainsi que des polyamines dont la présence est corrélée à la croissance et la morphologie racinaire (Ben-Hayyim *et al.*, 1996).

Les plasmides de type mannopine et cucumopine ne comportent qu'un seul fragment homologue au fragment TL.

3.2.2. Utilisation des racines transformées pour la production de métabolites secondaires

Les intérêts des racines transformées pour la production de métabolites secondaires sont multiples. Nous les aborderons par comparaison aux cultures de cellules isolées.

✓ *Obtention du matériel*

L'obtention de racines transformées est aisée et rapide. De nombreuses souches d'*Agrobacterium rhizogenes* présentent des virulences variées selon les plantes hôtes. Par conséquent, si l'on excepte le cas des Monocotylédones, il est relativement facile d'obtenir la transformation d'une plante hôte particulière. Lorsque la plante étudiée s'avère cependant récalcitrante, il est possible d'utiliser des molécules de type acétylsyringone capables de stimuler la virulence des agrobactéries (Godwin *et al.*, 1991, Bihu et Alfermann, 1993 ; Jacq *et al.*, 1993) et donc de favoriser la transformation. Il faut toutefois noter que l'action stimulante de l'acétylsyringone n'est pas systématique (Drewes et Van Staden, 1995b). Par ailleurs, il existe d'autres inducteurs parfois plus efficaces (Godwin *et al.*, 1992). De très nombreuses plantes ont été transformées (Mugnier, 1988 ; Porter, 1991).

Les capacités de transformation par *Agrobacterium rhizogenes* sont par ailleurs utilisées de la même façon que celles d'*Agrobacterium tumefaciens* pour obtenir des plantes transgéniques. Il est en effet possible d'introduire des gènes d'intérêt agronomique par exemple sur le plasmide Ri désarmé des *Agrobacterium rhizogenes* que l'on mettra ensuite en contact avec la plante à transformer (Tao *et al.*, 1994 ; Handa, 1996 ; Topping *et al.*, 1996 ; Yamakawa et Chen, 1996).

✓ *Croissance*

Les racines transformées présentent une vitesse de croissance particulièrement élevée. Arellano *et al.* (1996) indiquent un temps de doublement de la biomasse de 6,2 jours pour des racines transformées de *Perezia cuernavacana*. Maldonado-Mendoza *et al.* (1993) obtiennent pour leur part une biomasse doublée en moins d'une journée pour des racines transformées de *Datura stramonium*. Ce type de matériel permet donc d'obtenir des biomasses importantes en un temps très réduit. Parr *et al.* (1988) récoltent 96 g de matière fraîche par litre de culture de racines transformées de *Catharanthus roseus* au bout de 28 jours. Kuzovkina *et al.* (1996) indiquent la multiplication par un facteur 30 en 4 semaines de la biomasse racinaire issue de plants de *Rubia tinctorium*. En 8 semaines, ce facteur atteint une valeur de 130.

✓ *Métabolites synthétisés*

Le spectre des métabolites synthétisés par les racines transformées reflète celui des racines de la plante mère à partir de laquelle elles ont été induites (Hamill *et al.*, 1986 ; Parr et Hamill, 1987). Les teneurs peuvent cependant être différentes de celles mesurées dans les racines de la plante mère. Ainsi, les teneurs en hyoscyamine sont plus importantes dans les racines transformées de *Datura stramonium* que dans les racines de la plante mère. La translocation de l'hyoscyamine vers les parties aériennes qui a lieu dans la plante entière ne peut s'effectuer dans les racines transformées, ce qui conduit à l'accumulation de ce métabolite secondaire intermédiaire (Payne *et al.*, 1987). Les rapports de concentrations existant entre les divers composés synthétisés par les racines de la plante mère peuvent être également modifiés dans les racines transformées. Shimomura *et al.* (1991) indiquent en effet que la lignée d'*Agrobacterium* utilisée a une incidence sur les teneurs en métabolites secondaires synthétisés. Par ailleurs, des composés synthétisés normalement au niveau des parties aériennes de la plante mère peuvent être synthétisés par des racines transformées cultivées à la lumière. Ainsi, Ikenaga *et al.* (1995) mettent en évidence la présence de saponines stéroïdes dans les racines transformées de *Solanum aculeatissimum* cultivées à la lumière. Ces métabolites secondaires ne sont pas détectés dans les racines cultivées à l'obscurité.

✓ *Stabilité*

Les racines transformées sont des tissus, constitués de cellules organisées et différenciées, réputées génétiquement stables. Ce dernier paramètre permet d'éviter la croissance anormale et les mutations (polyploïdie, aneuploïdie) qui sont à l'origine de baisses de la

Tableau 6. Aperçu bibliographique des métabolites secondaires identifiés dans des racines transformées de diverses familles de plantes

Plante	Métabolite synthétisé	Souche <i>A. Rhizogenes</i>	Références bibliographiques
<i>Ajuga reptans</i>	cholestérol, clérostérol 20-hydroxyecdysone		Yagi <i>et al.</i> , 1996 Uozomi <i>et al.</i> , 1995
<i>Artemisia annua</i>	artémisinine	ATCC 15834	Weathers <i>et al.</i> , 1994
<i>Astragalus membranaceus</i>	cycloartanetri terpène		Hirofani <i>et al.</i> , 1994 ; Zhou <i>et al.</i> , 1995
<i>Beta vulgaris</i>	betaxanthine, betacyanine		Hamill <i>et al.</i> , 1986
<i>Catharanthus roseus</i>	catharanthine, ajmalicine	ATCC 15834	Sim <i>et al.</i> , 1994
<i>Datura candida</i>	tropane alcaloïdes		Christen <i>et al.</i> , 1989
<i>Datura stramonium</i>	hyoscyamine		Payne <i>et al.</i> , 1987
<i>Duboisia leichhardtii</i>	scopolamine		Muranaka <i>et al.</i> , 1993a ; 1993b
<i>Duboisia myoporoides</i>	scopolamine	A4	Yukimune <i>et al.</i> , 1994a ; 1994b
<i>Fragaria x ananassa</i>	polyphénol	ATCC 15834	Motomori <i>et al.</i> , 1995
<i>Geranium thunbergii</i>	tannins		Ishimaru et Shimomura, 1991
<i>Hyoscyamus albus</i>	tropane alcaloïdes		Doerk-Schmitz <i>et al.</i> , 1994
<i>Hyoscyamus muticus</i>	hyoscyamine	LBA 9402	Oksman-Caldentey <i>et al.</i> , 1994
<i>Leontopodium alpinum</i>	anthocyanines	AR 9402	Hook, 1994
<i>Linum flavum</i>	5-méthoxyphodophyllotoxine		Van Uden <i>et al.</i> , 1991
<i>Lippia dulcis</i>	hernandulcine		Sauerwein <i>et al.</i> , 1991
<i>Lobelia sessifolia</i>	lobetyol, lobetyoline, lobetyolinine	ATCC 15834 MAFF 03-01724	Ishimaru <i>et al.</i> , 1994
<i>Nicotiana tabacum</i>	cadavérine, anabasine capsidiol, debneyol	AR 9402 AR 9402	Feckert <i>et al.</i> , 1993 Wibberley <i>et al.</i> , 1994
<i>Nicotiana rustica</i>	nicotine, anabasine		Hamill <i>et al.</i> , 1986
<i>Rubia tinctorium</i>	anthraquinone		Sato <i>et al.</i> , 1991 ; Van der Heijden <i>et al.</i> , 1994
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	diterpénoides	ATCC 15834 LBA 9402, A4 TR 105, R1601	Bihu et Alfermann, 1993
<i>Scoparia dulcis</i>	6-méthoxybenzo- xazolinone	ATCC 15834	Hayashi <i>et al.</i> , 1994
<i>Solanum aculeatissimum</i>	saponines	ATCC 15834	Ikenaga <i>et al.</i> , 1995
<i>Solanum aviculare</i>	alcaloïdes stéroïdiques		Subroto et Doran, 1994
<i>Swainsona galegifolia</i>	swainsodine	LBA 9402	Ermayanti <i>et al.</i> , 1994a ; 1994b
<i>Tagetes erecta</i>	thiophène		Mukundan et Hjortso, 1990
<i>Tagetes laxa</i>	thiophène		Rodriguez-Talou et Giuletti, 1995
<i>Tagetes patula</i>	α terthienyl		Kyo <i>et al.</i> , 1990
<i>Valeriana officinalis</i>	valdiate	R1601	Gränicher <i>et al.</i> , 1995a ; 1995c

productivité dans la biosynthèse des métabolites secondaires par des cellules isolées en suspension (Deus-Neumann et Zenk, 1984). Maldonado-Mendoza *et al.* (1993) ont ainsi montré que plus de 500 lignées de racines transformées de *Datura stramonium* cultivées pendant 5 années consécutives sont restées stables tant du point de vue de la croissance que de la production en hyoscyamine et scopolamine. Des racines de tomates transformées par *Agrobacterium rhizogenes* R 1601 et cultivées pendant 25 mois par Lipp-Joao et Brown (1994) ont gardé des taux de croissance élevés ainsi que leur phénotype de résistance aux antibiotiques. Les auteurs déduisent de ces résultats que la transformation par le plasmide Ri peut-être maintenue dans des clones de racines transformées de tomates pendant de longues périodes de culture. Cette stabilité de la croissance et de la production en métabolites secondaires des racines transformées est peut-être à mettre en rapport avec des considérations cytologiques. En effet, Ermayanti *et al.* (1993) ont établi que la stabilité du nombre de chromosomes n'était statistiquement pas affectée par la transformation de *Swainsona galegifolia* par *Agrobacterium rhizogenes*. Par conséquent les potentialités de synthèse des métabolites secondaires par les racines de la plante mère seraient génétiquement conservées dans les racines transformées qui en sont issues.

✓ *Facilité de culture*

Un dernier avantage des racines transformées sur les cultures de cellules isolées concerne leur résistance mécanique. En effet, les racines transformées sont beaucoup moins fragiles à manipuler en conditions axéniques que les suspensions cellulaires. Les racines sont ainsi moins sensibles aux phénomènes de cisaillement qui font éclater les cellules isolées lorsque l'agitation qui permet l'oxygénation des cultures est mal contrôlée.

Compte-tenu des avantages développés par les racines transformées, leur culture est envisagée avec beaucoup d'intérêt pour la production de métabolites secondaires. Depuis une quinzaine d'années, de très nombreux composés ont été identifiés et isolés à partir de racines transformées (Tableau 6).

De la même façon que pour les cultures de cellules isolées, un certain nombre de travaux tendent à sélectionner des souches hyperproductrices (Yukimune *et al.*, 1994b) et à optimiser la production en modifiant différents paramètres de culture tels que :

- la nature des milieux de culture (Ashikawa *et al.*, 1991 ; Ishimaru et Shimomura, 1991; Sato *et al.*, 1991)

- la nature et la concentration des sucres (Ermayanti *et al.*, 1994a ; Oksman-Caldentey *et al.*, 1994)
- les teneurs en ions phosphate, nitrate et ammonium (Payne *et al.*, 1987 ; Uozumi *et al.*, 1995)
- les hormones (Sato *et al.*, 1991 ; Sauerwein *et al.*, 1991 ; Subroto et Doran, 1994 ; Ikenaga *et al.*, 1995)
- la taille de l'inoculum (Bhadra et Shanks, 1995)
- l'addition de divers éliciteurs (Ermayanti *et al.*, 1994a ; Sim *et al.*, 1994 ; Wibberley *et al.*, 1994 ; Rodriguez-Talou et Giuletti, 1995)

Certains auteurs s'intéressent d'ores et déjà à la culture en biofermenteur en vue de la production à l'échelle industrielle (Buitelaar *et al.*, 1991, Whitney, 1992 ; Muranaka *et al.*, 1993b ; Nuutila *et al.*, 1994 ; Yu et Doran, 1994). Ainsi l'intérêt porté aux racines transformées depuis une quinzaine d'années n'a cessé de croître. Les travaux de plus en plus nombreux tentent d'améliorer la compréhension du mécanisme de transformation, et, d'un point de vue plus appliqué, de développer la production de métabolites secondaires économiquement intéressants par culture de racines transformées en fermenteur.

3.2.3. La transformation d'espèces de Psoralées par *Agrobacterium*

Les travaux réalisés par Grimal (1989) et par l'équipe d'Innocenti à Padoue (Bourgaud, comm. pers.) ont permis de mettre en évidence la présence de furocoumarines dans les racines de *Psoralea plumosa* et *Psoralea canescens*. Nguyen (1992) a donc entrepris la transformation par *Agrobacterium rhizogenes* de 8 espèces de Psoralées. Il s'avère cependant que si ces cultures croissent de façon tout à fait satisfaisante (temps de doublement de la biomasse de 38 heures en phase exponentielle de croissance), elles semblent ne pas synthétiser les furocoumarines recherchées (Nguyen *et al.*, 1992).

Cette revue bibliographique nous a permis d'appréhender les nombreuses propriétés des furocoumarines et des isoflavonoides qui entraîneront probablement une utilisation accrue des ces composés dans les prochaines années. Nous avons également abordé les problèmes d'approvisionnement, et nous avons souligné l'intérêt particulier des plantes du genre *Psoralea* pour produire du psoralène. Suite aux travaux de Bourgaud (1990), la culture des Psoralées en terre et en serre s'est avérée réalisable et peut être envisagée favorablement comme source d'approvisionnement.

Devant l'intérêt croissant de la production de métabolites secondaires par les techniques de culture *in vitro*, Nguyen (1992) a entrepris l'étude de la production de furocoumarines par des

cultures de cals et de racines transformées de Psoralées. Un soucier de 104 lignées de cals issus de feuilles, de tiges et de cotylédons de *Psoralea cinerea* a été établi. Dix-huit souches de racines transformées sont également été obtenues par transformation de plantules de 7 espèces de Psoralées avec la souche *Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402. Nos travaux ont donc porté sur l'étude du métabolisme secondaire développé par les cultures *in vitro* de Psoralées. Trois axes ont été définis.

Le premier objectif consiste à identifier et à quantifier les métabolites secondaires produits par les lignées de cals et de racines transformées qui constituent le soucier. Dans cette optique, la stabilité de l'expression du génôme sera tout d'abord évaluée avant d'effectuer la détermination et le dosage des métabolites secondaires. Une comparaison avec le profil métabolique de la plante entière sera également envisagée. Cette étude sera développée dans notre premier chapitre.

Le deuxième axe de notre travail, qui sera exposé dans un second chapitre, aura pour but d'améliorer la production des métabolites secondaires synthétisés par les cultures *in vitro* de cals. La recherche de souches hyperproductrices par élargissement du soucier à d'autres espèces de Psoralées ainsi que par modification des paramètres de culture constitue effectivement une étape essentielle avant l'établissement de suspensions cellulaires qui pourraient autoriser une synthèse à grande échelle des métabolites produits par ce matériel végétal.

Dans un troisième et dernier chapitre, nous présenterons les résultats de notre étude concernant l'amélioration de la production des métabolites secondaires par les cultures de racines transformées. Ce matériel présente une croissance rapide et continue sans qu'il soit nécessaire d'apporter de substances de croissance. En outre, les cellules sont organisées en tissus ce qui permet de s'affranchir des multiples cycles de repiquage nécessaires aux suspensions cellulaires pour fixer les modifications du génôme induites lors de la mise en culture *in vitro*. Par conséquent, l'étude de l'amélioration de la production de métabolites secondaires par les racines transformées constitue une étape importante pour optimiser les rendements si ce matériel végétal est envisagé comme ressource naturelle pour la production de métabolites secondaires synthétisés par les Psoralées.

Après une brève introduction, nous exposerons dans chacun des chapitres présentés ci-dessus, les résultats que nous discuterons ensuite avant de conclure succinctement. Une conclusion plus générale nous permettra enfin de préciser les perspectives qui émanent de notre travail.

CHAPITRE 1

***Identification et quantification des métabolites secondaires
synthétisés par les cultures in vitro.
Comparaison avec la plante entière***

INTRODUCTION

Un soucier constitué de cals et de racines transformées a été établi au laboratoire dans le but de produire des furocoumarines par des cultures *in vitro*. Notre premier objectif est donc de vérifier la stabilité de l'expression du génôme dans ces cultures avant d'envisager l'identification des métabolites secondaires synthétisés par ces deux types de matériel végétal. Une comparaison du profil métabolique obtenu pour les cultures *in vitro* avec celui que nous aurons soin d'établir pour la plante entière nous renseignera sur l'utilisation potentielle des cals et des racines transformées pour la production de métabolites secondaires.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Travail en conditions d'asepsie

Pour éviter toute contamination fongique ou bactérienne, des conditions d'asepsie rigoureuses sont nécessaires. Par conséquent, les milieux de culture, les pinces, la verrerie et les cônes de pipette Gilson sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes. Les scalpels, qui s'oxyderaient, ainsi que tout le matériel qui ne résiste pas à l'autoclavage sont nettoyés à l'alcool à 96%, flambés puis refroidis avant utilisation.

Les manipulations sont effectuées sous une hotte à flux laminaire vertical préalablement nettoyée à l'alcool 96% et exposée aux UVC durant 20 minutes.

1.2. Matériel végétal

1.2.1. Les racines transformées

1.2.1.1. Etablissement d'un soucier

1.2.1.1.1. Obtention du soucier

Les 7 espèces de Psoralées transformées sont *Psoralea canescens*, *Psoralea cinerea*, *Psoralea lachnostachys*, *Psoralea leucantha*, *Psoralea obtusifolia*, *Psoralea plumosa* et *Psoralea pustulata*.

1.2.1.1.2. Entretien du soucier

Les racines transformées sont conservées en boîte de Pétri de 90 mm de diamètre, à l'obscurité, à 25 °C, sur un milieu B5 (Gamborg *et al.*, 1968) sans substance de croissance et additionné de 0,3% de gélifiant (Phytigel, Sigma).

Toutes les 4 semaines, un apex en croissance d'environ 2 cm est prélevé et repiqué à la surface d'un milieu neuf. Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées au moyen d'un film de cellobiose.

1.2.1.1.3. Culture en milieu liquide

Les cultures en milieu liquide ont été conduites dans des fioles de type Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu B5 liquide sans régulateur de croissance. L'inoculum de départ est constitué de 3 apex d'environ 2 cm de longueur, prélevés à partir d'une préculture liquide de 12 jours en phase exponentielle de croissance.

Les fioles Erlenmeyer sont ensuite bouchées avec du coton et enrobées de papier aluminium dans le but d'obtenir l'obscurité avant d'être placées sur une table d'agitation orbitale (100 révolutions.min⁻¹), à 25°C.

1.2.1.2. Expérimentations : obtention d'un soucier de racines photosynthétiques

1.2.1.2.1. Entretien du soucier

Des cultures de racines transformées ont été menées à la lumière dans le but d'obtenir des racines vertes. L'éclairement de 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a été obtenu par des tubes fluorescents de 60 W (Mazda, lumière du jour) avec une photopériode de 16 heures. Les souches sont conservées sur milieu B5 sans phytohormone en boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, à la lumière, à 25°C. Toutes les 4 semaines, un apex d'environ 2 cm de longueur est prélevé et placé à la surface d'un milieu frais. Les boîtes sont scellées par un film de cellobiose.

1.2.1.2.2. Culture en milieu liquide

Les cultures en milieu liquide sont conduites comme indiqué précédemment (cf 1.2.1.1.3.). Les fioles Erlenmeyer bouchées avec du coton sont placées sur la table d'agitation orbitale (100 révolutions.min⁻¹) à 25°C, exposées à la lumière.

1.2.1.3. Analyse des échantillons

Des analyses ont été conduites sur la matière sèche récoltée ainsi que sur les milieux de culture.

1.2.1.3.1. Analyse du matériel végétal

1.2.1.3.1.1. Détermination de la biomasse

Les racines transformées sont récoltées à l'issue d'un temps de culture de 3 semaines. Rincées soigneusement à l'eau distillée et séchées, elles sont ensuite congelées rapidement dans l'azote liquide avant d'être lyophilisées puis pesées sur une balance de précision. Les échantillons sont stockés dans un dessiccateur avant l'analyse CLHP.

1.2.1.3.1.2. Extraction des métabolites secondaires

L'extraction est menée selon le protocole établi par Bourgaud *et al.* (1994b). Brièvement, les racines sont broyées finement au broyeur à bille ou au mortier selon la biomasse récoltée. Environ 5 mg, pesés très précisément, sont ensuite extraits dans un Eppendorf avec 1,5 ml d'eau bouillante. Après une agitation d'une demi-heure, les échantillons sont centrifugés à 10300 g (soit 12000 tours.min⁻¹ sur une centrifugeuse Jouan M14.11) pendant 7 minutes. Le surnageant qui contient les métabolites secondaires est ensuite filtré sur un filtre de nitrocellulose de porosité 0,45 µm avant d'être analysé.

1.2.1.3.2. Analyse des milieux de culture

Récolté en fin de culture, un aliquote de 10 ml de milieu de culture est prélevé et filtré sur un filtre de nitrocellulose de porosité 0,45 µm avant d'être analysé. En cas d'analyse différée dans le temps, les milieux de culture sont récoltés et stockés dans des piluliers placés au congélateur à -30°C. L'étape de filtration indispensable est réalisée juste avant l'analyse.

1.2.2. Les cals

1.2.2.1. Etablissement du souchier

Le souchier de cals a été obtenu par Nguyen (1992). Nous rappellerons brièvement le protocole alors établi. Trois types d'explants ont été utilisés pour obtenir des cals : des feuilles et des tiges issues de *Psoralea cinerea* cultivées en serre, et des cotylédons provenant de plantules de *Psoralea cinerea* stériles obtenues en phytotron.

Les feuilles et les tiges des plantes cultivées en serre sont stérilisées par un bain d'hypochlorite de calcium à 3 % (p/v) pour les feuilles et à 5 % pour les tiges. Après 5 rinçages à l'eau distillée stérile, les parties brûlées par l'hypochlorite sont écartées

1.2.2.1.1. Obtention du souchier

Les explants stériles sont disposés sur le milieu de culture de Cierna *et al.* (1991) solidifié par 3 g.l⁻¹ de Phytigel (Sigma) et complété par 9,3 µM de kinétine et 9 µM de 2,4.D.

Les cotylédons ainsi que les fragments d'hypocotyles de 6 à 8 mm de longueur ont été directement prélevés sur les plantules stériles.

En ce qui concerne les explants issus de plantes cultivées en serre, les feuilles sont découpées en demi-folioles. Les explants de tiges sont constitués par des segments de 6 à 8 mm.

Après de 10 à 15 jours de culture, des cals verts sont apparus aux extrémités des segments de tiges et d'hypocotyles, ainsi qu'à la périphérie et au niveau des nervures foliaires en contact avec le milieu pour les feuilles découpées.

1.2.2.1.2. Entretien du souchier

Les cals sont cultivés en boîte de Pétri 60 mm et en tubes, à la lumière (45 µmol.m⁻².s⁻¹). La température est maintenue à 25 °C et l'hygrométrie est fixée à 65%. Après trois semaines de culture, les cals sont très bien développés et commencent à se nécroser au pourtour. Des repiquages sont par conséquent effectués toutes les trois semaines sur le souchier constitué de 75 souches issues de feuilles (souches dites F), 52 souches issues de tiges (souches T) et 4 souches établies à partir de cotylédons (souches C).

1.2.2.2. Expérimentations: addition de *p*-coumarate

Une expérience ayant pour but de bloquer la voie de biosynthèse des isoflavonoïdes a été conduite sur 8 lignées de cals différentes : 4 souches issues de feuilles, 3 souches issues de tiges et 1 souche issue de cotylédons de *Psoralea cinerea*. Des concentrations de 0 μ M, 0,1 μ M ou 0,2 μ M de *p*-coumarate ont été additionnées au milieu de culture (Cierna *et al.*, 1991). Pour chaque traitement, 7 à 9 répétitions ont été réalisées, chaque cal étant cultivé en boîte de Pétri à raison d'un cal par boîte et étant considéré comme une répétition. Les souches testées ont été choisies au hasard dans l'ensemble du soucier. Il s'agit des lignées T1, T23, T32, T33, F3, F10B, F17 et C2. Les cals sont cultivés trois semaines à la lumière et à une température de 25°C avant d'être récoltés et analysés pour leur teneur en métabolites secondaires.

1.2.2.3. Analyse des échantillons

1.2.2.3.1. Analyse du matériel végétal

1.2.2.3.1.1. Détermination de la biomasse

Le détermination de la biomasse se fait par des mesures planimétriques. En effet, pour évaluer la croissance des cals de façon non destructive, des mesures de surface ont été envisagées. En 1992, Nguyen a déterminé le coefficient de corrélation entre la biomasse fraîche des cals et la surface mesurée par un intégrateur de surface (Delta T) couplé à une caméra (RCA). Les boîtes de Pétri sont disposées sur une table lumineuse et les réglages de la caméra et de l'intégrateur sont établis de manière à ce que seul le cal soit pris en compte pour la mesure de la surface. Avant chaque série de mesure, l'appareil est étalonné avec des carrés de papier de surface connue.

1.2.2.3.1.2. Extraction des métabolites secondaires

Les cals sont récoltés à l'issue d'un cycle de trois semaines de culture. Le prélèvement est réalisé avec une pince de façon à séparer au maximum le cal du milieu de culture qui y adhère. Emballés séparément, les cals sont ensuite plongés dans l'azote liquide puis lyophilisés. Ils sont ensuite broyés au broyeur à bille ou au mortier selon la biomasse récoltée. Environ 5 mg pesés avec précision sont ensuite extraits dans un Eppendorf avec 1,5 ml d'eau bouillante selon le protocole établi par Bourgaud *et al.* (1994b). Après une demi-heure d'agitation, les échantillons sont centrifugés (centrifugeuse JOUAN M14.11) à

10300 g (soit 12000 tr/min) pendant 7 minutes. Le surnageant est alors filtré sur un filtre de nitrocellulose de porosité 0,45 µm puis analysé.

1.2.2.3.2. Analyse des milieux de culture

Les milieux de culture sont extraits selon deux protocoles : l'extraction à l'eau bouillante et l'extraction au méthanol. Le milieu est directement broyé dans un mortier avec 1 ml d'eau bouillante ou 1 ml de méthanol à froid. La gelée obtenue est laissée à décanter pendant une dizaine de minutes, puis le surnageant est filtré selon le protocole précédemment décrit pour le matériel végétal.

1.2.3. La plante entière

1.2.3.1. Matériel végétal

Les expériences réalisées sur plante entière ont été conduites en serre sur *Psoralea cinerea*.

Après avoir été scarifiées chimiquement avec de l'acide sulfurique concentré pendant 45 minutes (Bourgaud, 1990) puis rincées à l'eau distillée, les graines sont déposées en boîtes de Pétri sur du papier Whatmann humide et placées à l'obscurité dans une étuve à 25°C pendant 48 heures. Les graines germées sont ensuite repiquées en pots individuels (11 x 11 x 12 cm) contenant un mélange sablo-limoneux pour faciliter l'accès aux racines à la récolte. Les pots sont disposés en serre dont la température est maintenue à 12 °C pendant la nuit. Les plantes sont arrosées faiblement et régulièrement, de manière plus fréquente en fonction de leur âge.

Pour s'affranchir des problèmes de nutrition azotée et se rapprocher le plus possible des conditions de croissance naturelles, les plantes sont inoculées 21 jours après le repiquage (stade 3 feuilles) par la souche *Bradyrhizobium* CB 2063 établie comme étant la plus efficace pour la croissance de *Psoralea cinerea* (Bourgaud *et al.*, 1990).

1.2.3.2. Analyse des échantillons

1.2.3.2.1. Récolte et échantillonnage

Quatre ou cinq plantes sont récoltées aux stades suivants : 4-feuilles (début de végétation), 7 feuilles (apparition des premiers bourgeons floraux), floraison,

fructification et maturité (semences disséminables). Chaque plante constitue une répétition qui sera analysée séparément.

Les plantes sont dépotées et les racines sont lavées soigneusement. Séparées ensuite par organes, les plantes sont entièrement analysées une par une. Nous distinguons :

- racines
- tiges
- feuilles
- apex
- organes reproducteurs
- rejets

1.2.3.2.2. Détermination de la biomasse

La biomasse totale de la plante est déterminée juste après récolte. Les organes sont ensuite séparés et pesés au fur et à mesure des extractions dans le but de limiter les éventuelles variations de teneurs en furocoumarines en réponse à l'agression subie par la plante. En conséquence, les analyses sont réalisées sur la matière fraîche.

1.2.3.2.3. Extraction des métabolites secondaires

Après pesée, chaque échantillon est broyé dans un mortier avec une pincée de sable de Fontainebleau dans un volume d'eau bouillante proportionnel à la biomasse prélevée (de 1 à 4 ml). La partie liquide du broyat est récupérée dans un Eppendorf et centrifugée à 10300g (centrifugeuse Jouan M14.11) durant 5 minutes. Le surnageant est récupéré et filtré sur un filtre de nitrocellulose de porosité 0,45 μm avant d'être analysé.

1.3. Technique d'analyse

1.3.1. Analyse des métabolites secondaires par CLHP

Nous avons procédé à l'analyse des métabolites secondaires par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) sur une chaîne Beckman «Système Gold ». Nous avons travaillé en phase inverse avec une colonne de 250 mm de long et d'un diamètre interne de 4 mm remplie de la phase Lichroprep RP 18 (porosité 5 μm) (Merck). Une précolonne constituée de la même phase stationnaire protège la colonne. Elle est changée régulièrement, dès que la pression augmente trop fortement.

La phase mobile est constituée d'un mélange isocratique d'eau/méthanol/acétonitrile dans les proportions 50/25/25, dont le débit est maintenu constant à 0,5 ml.min⁻¹.

Des volumes de 20 ou 100 µl sont injectés selon qu'il s'agit de végétaux ou de milieux de culture, respectivement. La détection des métabolites secondaires est réalisée par mesure d'absorbance à 300 nm, qui représente un maximum relatif d'absorption des molécules recherchées. Nous avons utilisé un détecteur à barette de diodes qui permet d'effectuer à des intervalles de temps réguliers et paramétrables, un spectre UV entre 190 et 400 nm. Cette option a facilité l'identification des pics observés. Un environnement informatique permet de piloter l'ensemble de la chaîne et de traiter rapidement les chromatogrammes (intégration des pics, études des spectres UV...).

Les molécules correspondant à des pics non identifiés ont été récoltées puis analysées en spectrométrie de masse.

1.3.2. Quantification des métabolites secondaires

La quantification des métabolites secondaires identifiés est faite à partir de la mesure de la surface des pics. Des gammes étalons ont été réalisées avec des témoins correspondants à chaque molécule identifiée de manière à établir un coefficient de corrélation entre la surface mesurée du pic et la concentration en métabolite.

1.4. Identification des molécules

Les furocoumarines ont été identifiées par comparaison de leur spectre UV entre 190 et 400 nm avec des molécules étalons. Une attention particulière a été accordée au profil de ces spectres aux alentours de 300 nm, longueur d'onde qui représente le maximum d'absorption des furocoumarines recherchées.

Les molécules non identifiées ont été recueillies à la sortie de la CLHP après 20 à 30 passages du même extrait. Seule la partie médiane du pic a été recueillie chaque fois dans le but d'obtenir un échantillon le plus pur possible avant l'identification par spectrométrie de masse (EI, CI ou MS-MS) au Laboratoire de Géochimie Organique de Strasbourg. Après détermination, nous avons confirmé l'identité de ces composés par comparaison de leur spectre UV avec des molécules étalons.

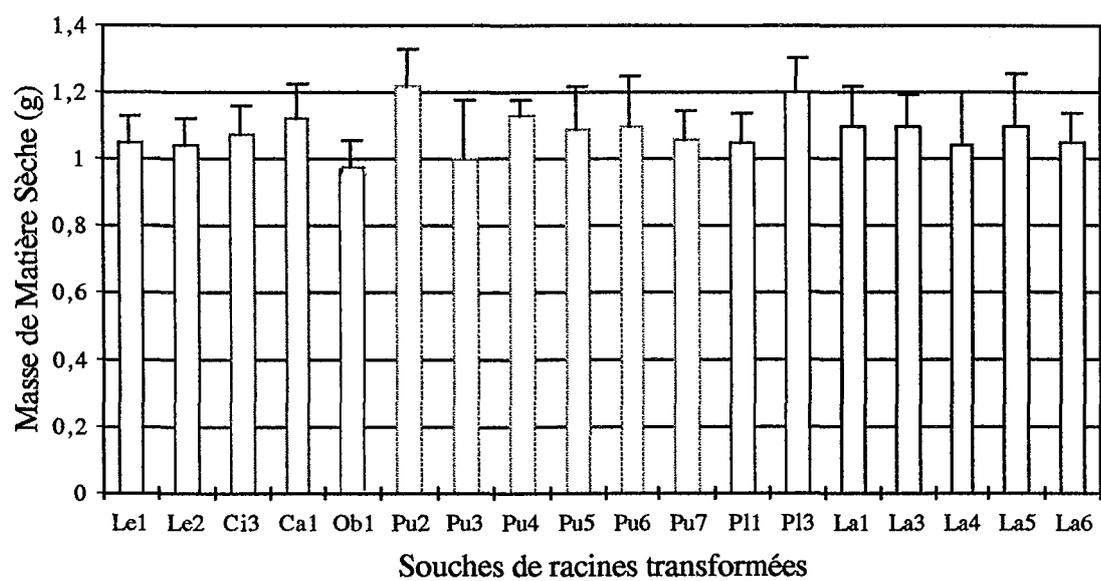


Figure 7. Biomasse racinaire récoltée à l'issue de 4 semaines de culture sur milieu B5 liquide

Le: *P. leucantha*; Ci: *P. cinerea*; Ca: *P. canescens*; Ob: *P. obtusifolia*; Pu: *P. pustulata*; Pl: *P. plumosa*; La: *P. lachnostachys*. Les masses de matière sèches sont des moyennes calculées pour 2 Erlenmeyers par souche.

2. RESULTATS

2.1. Analyse du soucier de racines transformées

Toutes les souches de racines transformées disponibles dans le soucier ont été analysées pour déterminer d'un point de vue qualitatif et quantitatif leur production en métabolites secondaires.

La culture a été conduite en milieu liquide pendant une période de 4 semaines dans le but de récolter une biomasse racinaire assez importante pour pouvoir réaliser plusieurs analyses CLHP par souche de racine transformée. L'établissement des cultures en milieu liquide permet en outre de déterminer plus rapidement la présence de métabolites secondaires éventuellement excrétés.

2.1.1. Biomasse des racines transformées cultivées en milieu liquide

Pour chaque souche de racines transformées, trois apex en phase exponentielle de croissance ont été mis en culture dans chaque Erlenmeyer, ce qui représente une biomasse racinaire de départ d'environ 1,6 mg de matière fraîche. A l'issue des 4 semaines de culture, les biomasses obtenues sont équivalentes pour toutes les souches étudiées (Figure 7). La masse de matière sèche varie de 1 à 1,2 g, ce qui équivaut à la multiplication par un facteur 375 de la biomasse de l'inoculum de départ.

Si la biomasse ne semble pas varier avec l'espèce à l'issue de 4 semaines de culture, la morphologie au contraire est très différente. La texture ainsi que la couleur sont caractéristiques de chaque espèce transformée. Les racines provenant de *Psoralea canescens* sont très épaisses et présentent peu de ramifications alors que les racines issues des autres espèces de Psoralées sont fines et très ramifiées. Les ramifications secondaires sont, en outre, longues pour la majorité des espèces mises en culture, à l'exception de *Psoralea obtusifolia* dont les ramifications sont assez courtes (0,5 à 1,5 cm). D'autre part, après 4 semaines de culture, les racines principales deviennent marrons pour l'ensemble des racines transformées cultivées, à l'exception de *Psoralea obtusifolia* et *Psoralea canescens* dont la couleur reste blanche à jaune.

2.1.2. Etude de la production de métabolites secondaires

Chaque souche de racine transformée est analysée qualitativement et quantitativement à l'issue des 4 semaines de culture.

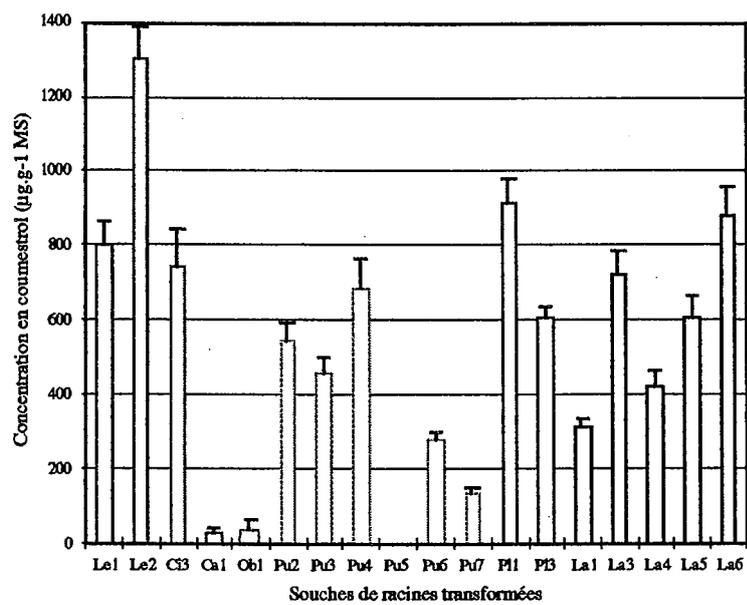
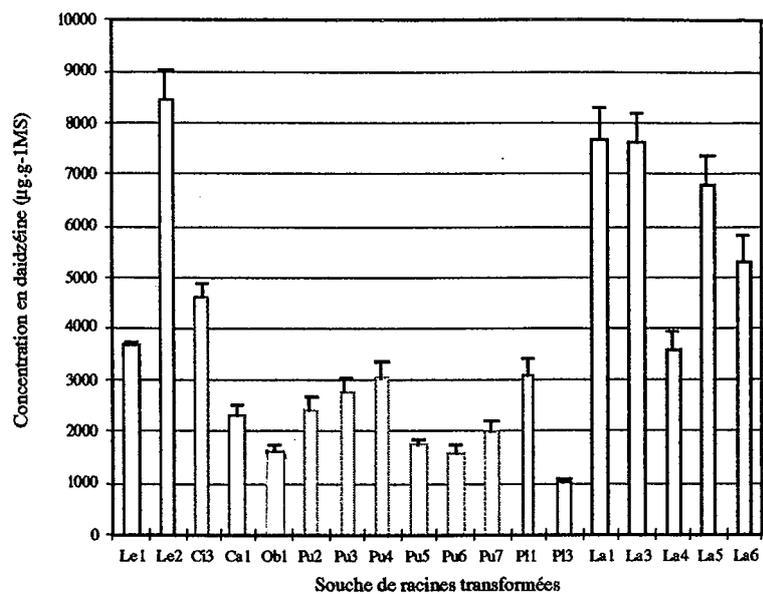


Figure 8. Teneurs en daidzine et coumestrol dans la biomasse racinaire sèche. Le: *P. leucantha* ; Ci: *P. cinerea* ; Ca: *P. canescens* ; Ob: *P. obtusifolia* ; Pu: *P. pustulata* ; Pl: *P. plumosa* ; La: *P. lachnostachys*. Les teneurs en daidzine et coumestrol sont des moyennes établies pour 2 Erlenmeyers par souche.

2.1.2.1. Détermination de la nature des métabolites secondaires produits

Après analyse CLHP, les chromatogrammes obtenus ne révèlent la présence d'aucune furocoumarine, et ce, quelle que soit la souche étudiée. L'analyse d'échantillons plus concentrés donne un résultat analogue.

Cependant, 2 composés sont détectés dans les 18 souches analysées. Ces molécules ont été récoltées et identifiées par spectrométrie de masse. Le premier composé apparaît dans tous les échantillons analysés. La fragmentation en spectrométrie de masse et la présence de l'ion moléculaire 254 ont permis de déterminer qu'il s'agit d'un dihydroxyisoflavone présentant deux groupements hydroxyle distribués de part et d'autre des 2 noyaux benzène. Le métabolite secondaire ainsi analysé a été identifié comme étant la daidzéine. Cette hypothèse a été vérifiée par comparaison du spectre de ce composé avec celui de la daidzéine pure : les 2 spectres sont entièrement superposables et les temps d'élution CLHP sont identiques.

La seconde molécule correspond au coumestrol. En analyse CLHP, ce composé présente un pic à 24 minutes dans nos conditions d'analyse, et un spectre UV entre 190 et 400 nm caractéristique du coumestrol (Le Bars et Le Bars, 1984). Cette molécule appartient à la famille chimique des pyranocoumarines ou coumestanes, rattachées au métabolisme des phénylpropanoïdes (Brown, 1981). Elle est fréquemment identifiée chez les Légumineuses.

2.1.2.2. Quantification des métabolites secondaires dans la biomasse racinaire sèche

Les 2 molécules identifiées, daidzéine et coumestrol, ne sont pas présentes dans les mêmes proportions. En effet, les quantités de daidzéine récoltées sont 7 à 8 fois supérieures aux quantités de coumestrol (Figure 8).

Nous pouvons constater qu'il existe pour ces deux molécules une variabilité à la fois inter et intraspécifique.

En ce qui concerne la daidzéine, la variabilité intraspécifique est importante pour les racines transformées provenant de *P. plumosa* ou *P. leucantha*. En revanche, elle est beaucoup plus faible pour *P. pustulata* et *P. lachnostachys*. Ne disposant que de 2 souches issues de la même espèce pour *P. leucantha* et *P. plumosa*, il est difficile d'établir si la forte variabilité observée est effectivement liée à l'espèce. La variabilité interspécifique est marquée. Ainsi, toutes les souches issues de *P. lachnostachys* présentent des teneurs en daidzéine supérieures à celles de *P. pustulata*.

Pour le coumestrol, il semble que la variabilité intraspécifique soit plus importante que celle mise en évidence pour la daidzéine. Ainsi, la souche Pu4 présente des teneurs en coumestrol de près de 700 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS alors que pour la souche Pu5, issue de *P. pustulata*

également, les teneurs en coumestrol, si elles existent, ne sont pas détectables dans la matière sèche.

La variabilité interspécifique se manifeste également pour la molécule de coumestrol. Cependant, elle est beaucoup moins marquée que pour la daidzéine, ce qui ne permet pas de déterminer une espèce hyperproductrice en particulier.

Globalement, il est intéressant de noter que si les souches produisant le plus de daidzéine ne sont pas forcément les mêmes que celles qui synthétisent le coumestrol en grande quantité, les souches Le2, Ci3, La1, La3, La5 et La6 présentent des teneurs en métabolites secondaires les plus élevées.

2.1.2.3. Quantification des métabolites secondaires dans le milieu de culture

Les milieux de culture de chaque souche de racines transformées ont été analysés à l'issue des 4 semaines de culture. De la même façon que pour la matière sèche, aucune trace de furocoumarine n'a pu être détectée dans les milieux de culture des 18 souches de racines transformées. Les teneurs en daidzéine sont nulles également. Quelques traces sont cependant mises en évidence dans les milieux de culture des souches Ci3, La5 et La6. Le coumestrol n'est identifié dans les milieux de culture d'aucune souche de racines transformées analysées.

A l'issue de l'étude du soucier de racines transformées, il apparaît que ce matériel végétal croît rapidement quelle que soit l'espèce d'origine. Les conditions de culture et le milieu B5 sont adaptés à la culture de racines transformées de Psoralées. Ceci a déjà été démontré par Nguyen et al. (1992).

L'analyse du soucier révèle une absence de furocoumarines. En revanche, 2 molécules issues du métabolisme des phénylpropanoïdes : daidzéine et coumestrol, sont identifiées dans la matière sèche en quantité variable selon la souche étudiée. Les teneurs en daidzéine varient de 1000 (Ob1) à 8400 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS (Le2), et les concentrations en coumestrol de 0 (Pu4) à 1300 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS (Le2). L'analyse des milieux de culture ne permet de détecter la présence d'aucune furocoumarine ni de coumestrol. La daidzéine est par ailleurs retrouvée à l'état de trace dans les milieux de culture de quelques souches.

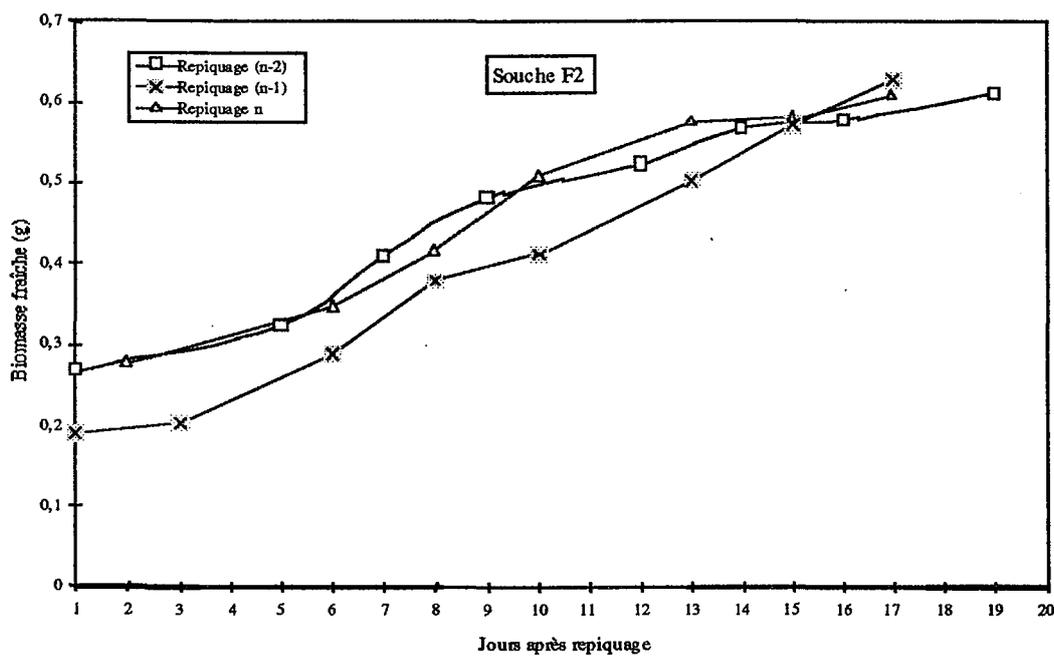
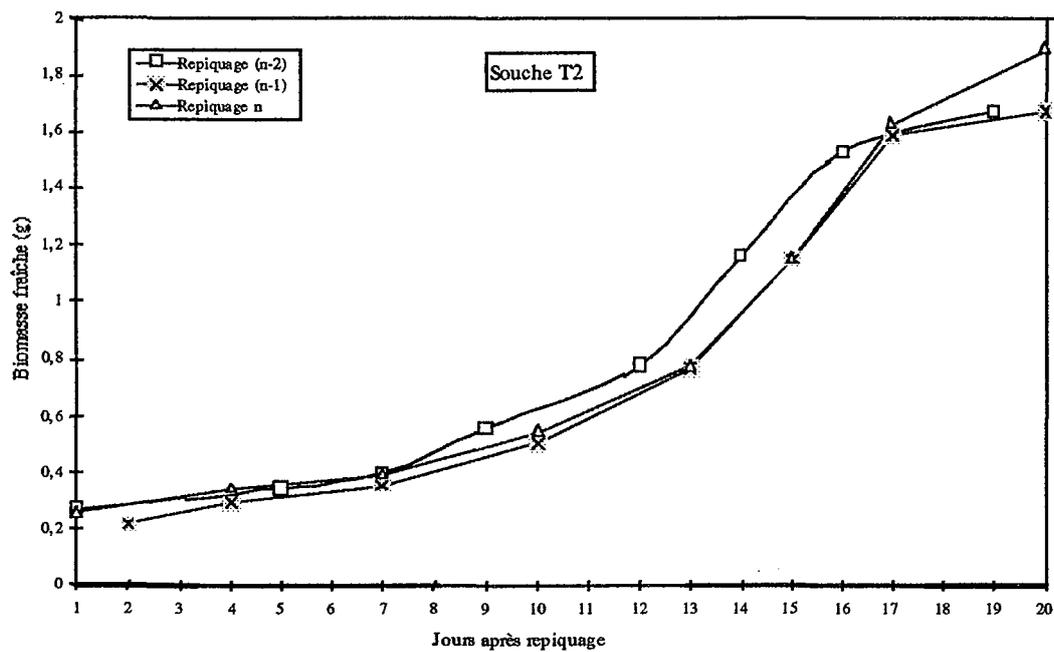


Figure 9. Evolution de la biomasse fraîche de deux souches de cals de *P. cinerea* durant trois repiquages. Les souches F2 (issue d'un fragment de feuille) et T2 (issue d'un fragment de tige) sont toutes deux stabilisées.

2.2. Analyse du souchier de cals

A l'issue des travaux menés par Nguyen (1992), un souchier de 131 cals issus de trois catégories d'explant était disponible. Cent quatre ont été étudiées par suivi de croissance et analyse des métabolites secondaires synthétisés.

2.2.1. Etude de la croissance des cals issus de *Psoralea cinerea*

2.2.1.1. Stabilisation du souchier

Après observation des premiers cycles de croissance, il est apparu que les lignées subissaient de grandes variations somaclonales, telles des variations de couleur, des vitesses de croissance variables ou encore présentaient des tendances organogènes. Par conséquent, il nous a semblé judicieux de vérifier la stabilité des souches avant d'entreprendre des analyses précises sur les métabolites secondaires synthétisés.

La stabilité des souches peut s'apprécier par des observations visuelles, comme la perte de l'aptitude à la régénération spontanée ou la constance d'aspect des cals, et notamment la couleur. Dans notre cas, nous n'avons jamais observé de régénération de plantules à partir d'une zone du cal. Par ailleurs, l'ensemble du souchier présente une couleur vert/jaune et ne synthétise pas de pigments particuliers qui pourraient transcrire une quelconque constance d'expression du génôme. Une évaluation de la stabilité sur des critères de production aurait été idéale. Cependant, une telle méthode présente l'inconvénient d'être d'une part assez longue et d'autre part destructive. En conséquence, nous avons décidé d'évaluer la stabilité génétique des lignées en suivant un caractère fortement polygénique : la production de biomasse. Nous avons considéré qu'une souche était stable lorsque trois courbes de croissance successives étaient reproductibles. Trois paramètres ont été étudiés : la vitesse de croissance et la durée des phases de latence et exponentielle.

La figure 9 présente un exemple de souches stabilisées. Les trois dernières courbes de croissances se superposent, témoignant d'une constance des paramètres de croissance que l'on considère comme représentatifs de la stabilisation des modifications induites par la mise en cultures *in vitro*. L'ensemble du souchier de cals issus de *Psoralea cinerea* a été ainsi étudié et s'est révélé stabilisé depuis le 21^{ème} repiquage, soit 63 semaines. Cette période assez longue est à mettre en relation avec le fait que le souchier est stabilisé de façon globale en effectuant des repiquages synchrones : lorsque l'on effectue le repiquage, toutes les souches ne sont pas au même point de leur cycle de croissance simultanément.

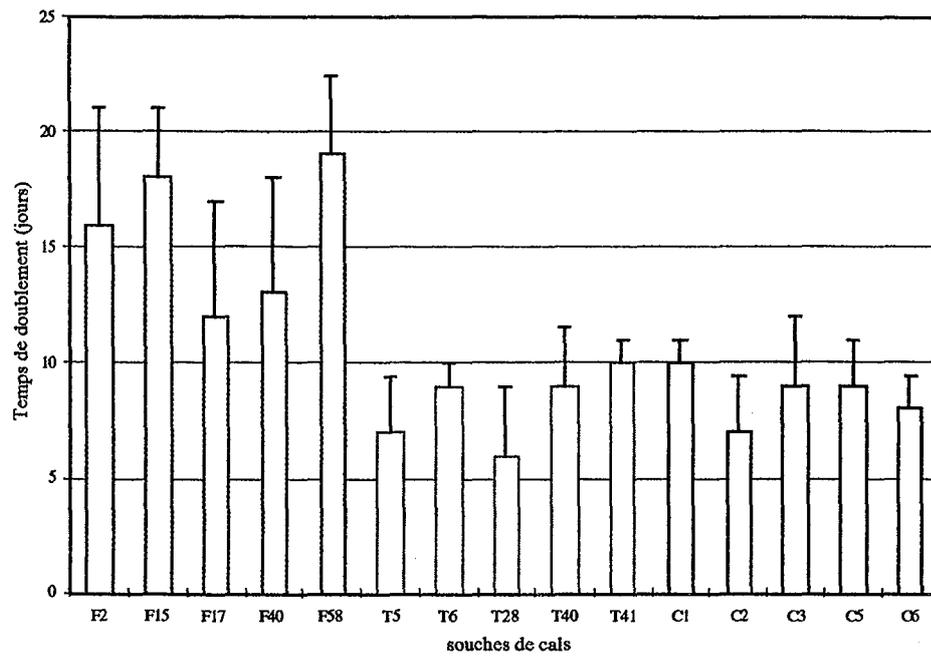


Figure 10. Comparaison des temps de doublement pour des cals de *P. cinerea* issus de feuilles (F2, F15, F17, F40, F58), de tiges (T5, T6, T28, T40, T41) ou de cotylédons (C1, C2, C3, C5, C6). Les temps de doublement sont des moyennes calculées sur 5 cycles de culture pour chaque lignée.

2.2.1.2. Croissance des souches de cals issus de *P. cinerea*

Les biomasses fraîches récoltées à l'issue de trois semaines de culture sont variables selon la souche étudiée et selon la taille de l'explant de départ. En effet, lors du repiquage de l'ensemble du souchier, un morceau du cal en fin de cycle est prélevé et déposé à la surface d'un milieu neuf. La taille initiale de cet explant n'est pas calibrée et par conséquent la biomasse finale du cal ne peut pas être considérée comme un indicateur de croissance. Nous avons donc choisi d'évaluer cette croissance par le calcul du temps mis par le cal en culture pour doubler sa biomasse. La figure 10 présente ces résultats pour 5 souches provenant de chaque type d'explant (feuille, tige, cotylédons).

Les temps de doublement varient de 6 (souche T28) à 19 jours (souche F58). Une analyse de variance effectuée permet de conclure que les temps de doublement mesurés pour les cals issus de feuilles sont significativement plus longs ($p < 0,01\%$) que ceux des cals issus de tige et de cotylédons. Il semble par conséquent que la nature de l'explant ait une incidence sur la production de biomasse.

2.2.2. Etude de la production de métabolites secondaires par des cals issus de *P. cinerea*

La totalité des souches de cals issus de *P. cinerea* ainsi que les milieux de culture correspondants ont été analysés par CLHP. Aucune trace de furocoumarine n'a pu être détectée, quelle que soit la souche et le type d'explant envisagés. En revanche, la daidzéine a pu être identifiée dans 97 souches sur les 104 initiées à partir d'explants de *P. cinerea*.

2.2.2.1. Teneurs en daidzéine dans la matière sèche

La concentration moyenne dans les souches de cals issus de *P. cinerea* est de $174 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS. Sept souches ne présentent pas de daidzéine et la concentration maximale ($504 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) est obtenue pour la souche T5 issue d'un fragment de tige.

La répartition des cals de différentes origines par classe de concentration en daidzéine est représentée dans le tableau 7.

Tableau 7. Distribution (%) des lignées de cals issus de deux types d'explants de *P. cinerea*, classées par classe de concentration en daidzéine.

Souche	Classe de concentration ($\mu\text{g.g}^{-1}$ MS)					
	0-100	100-200	200-300	300-400	400-500	500-600
T (45 cals)	25 %	29,5 %	29,5 %	9,1 %	4,6 %	2,3 %
F (52 cals)	26,9 %	30,8 %	28,8 %	9,6 %	3,9 %	

Nous pouvons constater que les cals issus de tiges et de feuilles de *P. cinerea* présentent un profil de distribution relativement similaire : environ 1/4 des lignées synthétisent moins de $100 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS de daidzéine, la majorité des souches présente des teneurs comprises entre 100 et $200 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS, et le nombre de cals par classe diminue de façon inversement proportionnelle à la concentration en daidzéine.

En revanche, les cals issus de cotylédons synthétisent, pour 3/4 d'entre eux, moins de $100 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS de daidzéine et une seule souche présente des teneurs en daidzéine comprises entre 100 et $200 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS (données non représentées).

Il est cependant délicat de comparer les 3 types d'explants. Nous ne disposons en effet que de 7 souches de cals issus de cotylédons à répartir en 6 classes de concentration, ce qui est nettement insuffisant pour conclure sur les capacités de production de ces lignées de cals.

La similitude des profils de répartition entre les souches issues de feuille et de tiges de *Psoralea cinerea* est confirmée par un test de Student (au seuil de 5%) sur les moyennes. Les cals provenant de ces 2 types d'explant ne sont statistiquement pas différents en terme de potentialité moyenne de production de daidzéine.

2.2.2.2. Teneurs en daidzéine dans les milieux de culture

Les milieux de culture de 19 souches issues de tiges, 23 souches issues de feuilles et 2 souches issues de cotylédons ont été extraites à l'eau bouillante et au méthanol à froid dans le but de déterminer la présence de métabolites secondaires dans les souches de cals. Quel que soit le protocole d'extraction envisagé, nous n'avons pas pu détecter la présence de daidzéine. Ce métabolite, synthétisé par plus de 93% des cals issus de *Psoralea cinerea* n'est pas excrété dans le milieu dans nos conditions de culture (culture en boîte de Pétri sur milieu gélosé).

2.2.2.3. Teneurs en coumestrol

Aucune trace de coumestrol n'a pu être mise en évidence dans la matière sèche ou les milieux de culture des 104 lignées de cals issus de *Psoralea cinerea*. Cette molécule, synthétisée par des cultures de racines transformées en quantité importante (environ 750 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) semble ne pas l'être par cultures de cals issus de plusieurs types d'explant de cette même espèce.

L'étude du souchier de cals provenant de feuilles, tiges et cotylédons de Psoralea cinerea montre, après une période de stabilisation de 63 semaines, un temps de doublement de la biomasse de 6 à 19 jours selon le type d'explant mis en culture. La production de biomasse des cals semble liée à l'origine de l'explant de départ.

En revanche, la production de métabolites secondaires apparaît indépendante de l'origine de l'explant mis en culture. En effet, les lignées de cals issues de feuilles et de tiges présentent qualitativement et quantitativement le même profil : on note l'absence de synthèse de furocoumarine, et de coumestrol pour les 2 types d'explants. La comparaison des moyennes indique que la répartition par classe de concentration de la daidzéine n'est statistiquement pas différente pour les souches F et T. Les teneurs moyennes en daidzéine sont de 174 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS. Ce métabolite n'est pas détecté dans 7 souches sur les 104 analysées.

A l'issue du dosage de l'ensemble du souchier de cal et de racines transformées, il apparaît qu'aucun type de matériel végétal cultivé *in vitro* ne synthétise de furocoumarines. En revanche, deux autres métabolites appartenant également à la voie de la biosynthèse des phénylpropanoïdes sont détectés à des concentrations d'environ 1/10^{ème} de $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière sèche pour les souches issues de *Psoralea cinerea*, et de l'ordre du $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de matière sèche pour les racines transformées obtenues à partir de 7 souches de Psoralées.

Les teneurs en furocoumarines dans les Psoralées à l'état de plante entière sont importantes et bien répertoriées dans la littérature. En revanche, l'existence de la daidzéine n'a été mise en évidence que dans les feuilles de plusieurs espèces de Psoralées (Boardley *et al.*, 1986). Devant cette apparente inadéquation entre le métabolisme secondaire exprimé par les cultures *in vitro* et par les cultures de plantes entières de Psoralées, nous avons entrepris de déterminer de façon plus précise la répartition de la daidzéine et du psoralène au cours d'un cycle de croissance de *Psoralea cinerea*.

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence l'évolution des teneurs et la localisation de la daidzéine et du psoralène dans les organes de *Psoralea cinerea* au cours du temps, et éventuellement d'identifier à l'échelle de la plante les lieux de biosynthèse des deux métabolites, et ce, dans le but de mieux comprendre l'absence de synthèse de psoralène dans les cultures *in vitro* de *Psoralea cinerea*.

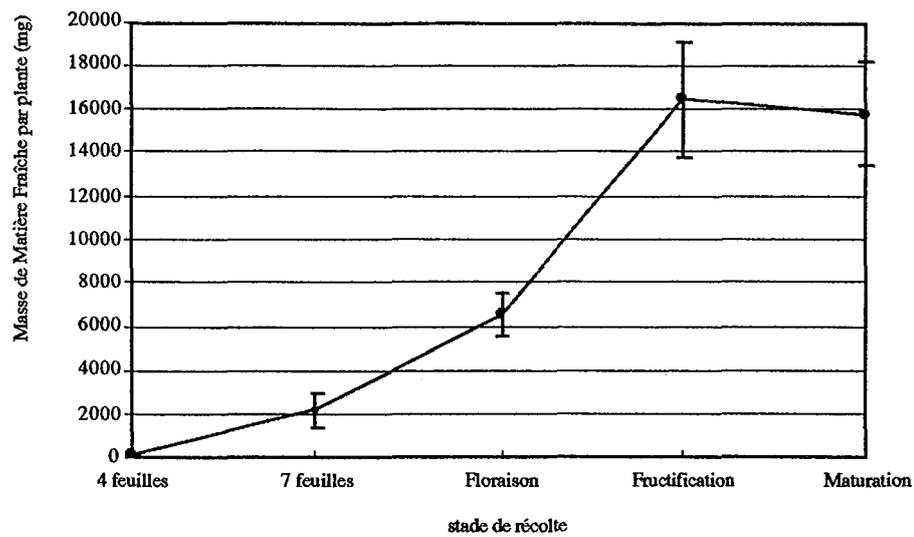


Figure 11. Evolution de la biomasse fraîche de *Psoralea cinerea* à 5 stades de récolte. Les chiffres sont obtenus en effectuant la moyenne par compartiment pour 5 plantes. Les barres verticales représentent des écarts types.

2.3. Analyse de la plante entière

2.3.1. Production de biomasse

La figure 11 représente l'évolution de la biomasse de matière fraîche de *Psoralea cinerea* récoltée à 5 stades de culture différents. Six compartiments sont définis : feuilles, tiges, racines, apex, organes reproducteurs et jeunes pousses.

La biomasse fraîche produite par *Psoralea cinerea* augmente jusqu'au stade de la fructification pour atteindre environ 16 g. Cette biomasse reste stable, voire diminue légèrement au stade de la maturation en raison de l'assèchement et de l'égrainage des fruits, ainsi qu'en raison de la chute des premières feuilles sénescentes. La répartition de la biomasse par compartiment évolue peu en ce qui concerne la tige et les racines. Aux stades tardifs, la biomasse foliaire diminue au profit de celle des organes reproducteurs et des ramifications.

2.3.2. Teneurs en métabolites secondaires

Les teneurs moyennes en daidzéine et en psoralène ont été quantifiées pour 5 plantes à 5 stades de récolte différents (Tableau 8).

Tableau 8. Teneurs moyennes en daidzéine et psoralène dans la plante entière à 5 stades de récolte. Les valeurs indiquées sont des moyennes établies pour 5 plantes sans distinction d'organes.

Stade de récolte	Daidzéine ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF)	Psoralène ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF)
4-feuilles	1 \pm 0,3	1 \pm 0,2
7-feuilles	31 \pm 4,8	24 \pm 2,7
Floraison	72 \pm 7	461 \pm 27
Fructification	71 \pm 11	576 \pm 63,5
Maturation	40 \pm 5,9	387 \pm 13,3

Nous pouvons constater que la daidzéine et le psoralène sont tous deux synthétisés par *Psoralea cinerea*, à des concentrations 6 à 9 fois plus élevées pour le psoralène que pour la daidzéine aux 3 derniers stades de récolte. C'est en revanche la daidzéine que l'on trouve en quantité plus importante au stade 7-feuilles. La diminution des teneurs observées pour les deux métabolites au stade maturation est lié à la chute des fruits mûrs, organes riches en métabolites secondaires, ainsi que des premières feuilles. Dans les conditions de l'expérimentation, les quantités

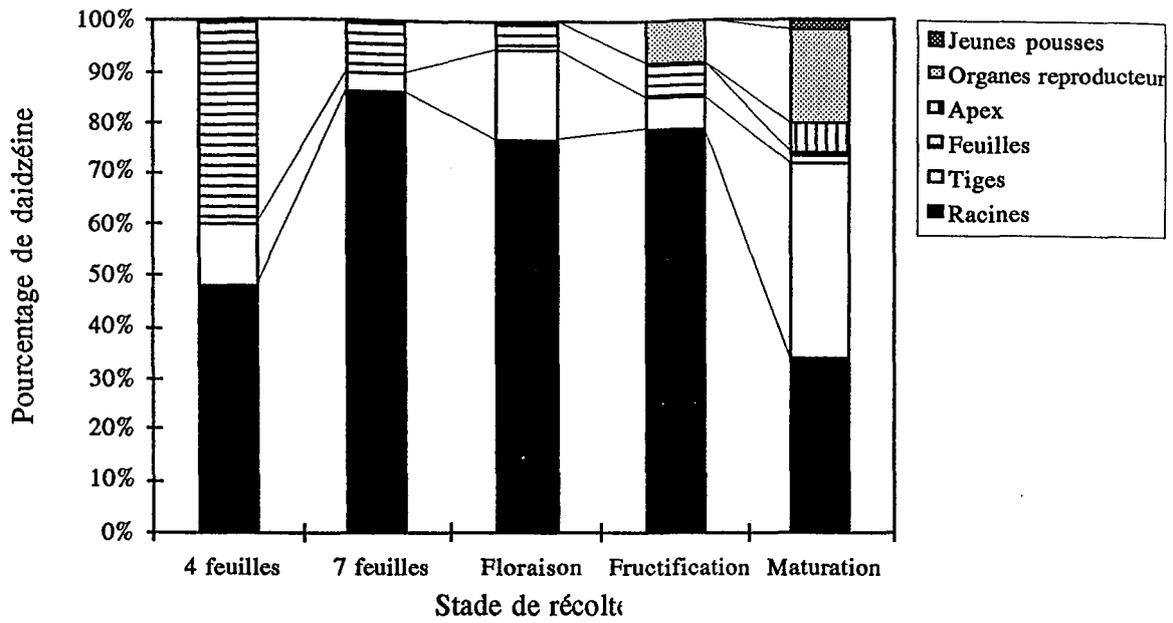


Figure 12. Répartition de la daidzéine en pourcentage dans 6 compartiments de la plante entière à 5 stades de récolte différents

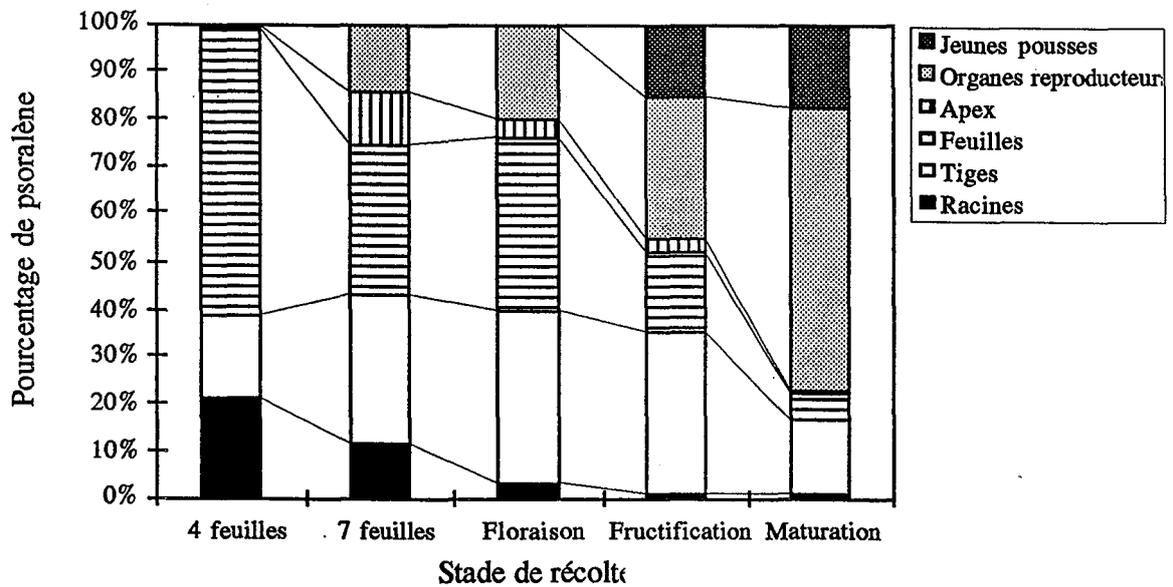


Figure 13. Répartition du psoralène en pourcentage dans 6 compartiments de la plante entière à 5 stades de récolte différents

maximales de daidzéine et de psoralène (71 et 576 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF, respectivement) sont détectées au stade fructification. Il est probable que le stade maturation aurait donné des résultats équivalents voire supérieurs si aucune perte de matière fraîche n'avait été à déplorer.

2.3.3. Localisation des métabolites

La répartition de la daidzéine et du psoralène sont variables dans le temps et selon l'organe étudié.

2.3.3.1. Localisation de la daidzéine

La figure 12 représente le pourcentage de daidzéine détecté dans les 6 compartiments de la plante entière analysés pour chaque stade de récolte.

L'analyse de ce graphique montre que la daidzéine s'accumule de façon préférentielle dans les racines de *Psoralea cinerea*, et ce, pour 4 des 5 stades étudiés. Au stade maturation, la tige devient l'organe le plus riche en daidzéine alors que les teneurs détectées dans les racines représentent encore 34% de la quantité totale. Les teneurs en daidzéine allouées aux feuilles ne cessent de décroître du stade 4-feuilles au stade maturation. Des données non représentées précisent par ailleurs que ce sont les feuilles jeunes qui contiennent la daidzéine.

Nous observons également sur cette figure que la daidzéine est détectée dans les organes reproducteurs au stade fructification et dans les apex au stade maturation. Pourtant, ces organes existent dès le stade 7-feuilles. Si la synthèse de la daidzéine s'effectue dans ces organes, il est possible que leur niveau de différenciation au stade 7-feuilles soit insuffisant pour permettre l'expression de la voie de biosynthèse de la daidzéine. Il ne serait atteint qu'aux stades ultérieurs de la fructification et de la maturation. Ces données autorisent également l'hypothèse d'une redistribution de la daidzéine de la racine vers les organes jeunes (jeunes pousses et organes reproducteurs). La forte teneur en daidzéine de la tige pourrait alors traduire l'existence d'un transfert important des organes de synthèse vers les organes ne synthétisant pas ce métabolite.

En fin de végétation, près de 75% de la daidzéine synthétisée est détectée dans les organes végétatifs (feuilles, tiges et racines). Environ 25% sont alloués aux organes jeunes : organes reproducteurs, jeunes pousses et apex.

2.3.3.2. Localisation du psoralène

La répartition en pourcentage des teneurs en psoralène dans 6 compartiments de la plante entière ont été représentés à 5 stades de récolte sur la figure 13.

La répartition des concentrations en psoralène dans la plante entière est très différente de celle observée pour la daidzéine. En effet, alors que les racines étaient l'organe privilégié d'accumulation de la daidzéine, ce sont les feuilles et les tiges qui contiennent la majorité des teneurs en psoralène, jusqu'au stade floraison. Au stade fructification et maturation, les teneurs maximales en psoralène sont détectées dans les organes reproducteurs. Le pourcentage de psoralène alloué aux racines est d'environ 20% au stade 4-feuilles et ne cesse de décroître pour atteindre un niveau proche de 0 dès le stade fructification, ce qui semblerait indiquer que la synthèse de ce métabolite n'a pas lieu dans les racines.

Par ailleurs, le psoralène est détecté dans les organes reproducteurs dès le stade 7-feuilles, et dans les jeunes pousses au stade floraison. Par conséquent, la synthèse de furocoumarines au niveau de ces organes n'est pas à exclure. L'évolution des teneurs en psoralène entre les compartiments feuilles et les organes reproducteurs pourrait également traduire une redistribution de ce métabolite secondaire de la feuille vers les organes reproducteurs.

Au stade maturation, à la fin du cycle de croissance de *Psoralea cinerea*, on constate que 75% du psoralène est détecté dans les organes reproducteurs et les jeunes pousses. Les 25% restant sont quantifiés presque exclusivement dans la tige. L'hypothèse d'une redistribution déjà formulée pour la daidzéine pourrait une fois encore expliquer le fort pourcentage attribué aux tiges : ces organes auraient pour rôle d'assurer le transfert du psoralène des organes qui synthétisent (feuilles) vers des organes accumulateurs (organes reproducteurs et jeunes pousses). On peut en outre noter que la répartition du psoralène entre le compartiment feuilles-tiges-racines (25%) et le compartiment organe reproducteur-jeunes pousses (75%) est inverse de celle établie pour la molécule de daidzéine.

L'étude de la répartition du psoralène et de la daidzéine dans 6 organes de *Psoralea cinerea* au cours du temps nous permet d'émettre plusieurs hypothèses quant aux lieux de synthèse de ces deux métabolites secondaires.

En ce qui concerne la daidzéine, plusieurs constatations nous conduisent à situer le site de biosynthèse de ce métabolite au niveau des racines. En effet, dès le stade 4-feuilles, la racine contient 50% de la daidzéine quantifiée. Il est assez peu probable qu'une telle quantité de daidzéine résulte d'un transfert à partir d'un autre organe à un stade aussi précoce. De plus la daidzéine reste majoritairement présente dans la racine pendant tout le cycle de culture (excepté durant le stade de maturation), alors que les quantités détectées dans les feuilles ne cessent de s'amenuiser d'un stade de récolte au stade suivant. Le fait que la daidzéine ne soit quantifiée dans les organes reproducteurs et les jeunes pousses qu'aux stades fructification et maturation alors que ces compartiments existent dès le stade 7-feuilles semble confirmer que la synthèse de daidzéine n'a pas lieu dans ces organes. La distribution par organe au stade maturation pourrait par conséquent s'expliquer par la redistribution de la daidzéine synthétisée dans les racines vers les nouveaux organes, par l'intermédiaire des tiges.

Pour le psoralène, il semble très peu probable que la synthèse ait lieu dans les racines. La teneur relative dans cet organe n'est en effet que de 20% au stade 4-feuilles et ne cesse de diminuer jusqu'à atteindre des valeurs proches de 0 pour les stades fructification et maturation. En revanche, le psoralène est détecté de façon largement majoritaire dans les feuilles au stade 4-feuilles. Au fur et à mesure de la croissance de *Psoralea cinerea*, les teneurs en psoralène diminuent dans les feuilles alors qu'elles augmentent dans les tiges et les organes jeunes, indiquant peut-être l'existence d'un transfert de ce métabolite de la feuille vers les nouveaux organes par l'intermédiaire de la tige. Les proportions de psoralène retrouvées dans les organes reproducteurs et les jeunes pousses semblent très fortes et l'existence d'une synthèse de psoralène au niveau de ces organes ne serait en conséquence pas à exclure.

2.4. Tentative de rétablissement de la synthèse de psoralène dans les cultures *in vitro* de *Psoralea cinerea*

A la lumière des résultats précédents obtenus sur la plante entière, nous avons tenté de façon simple de rétablir la synthèse de furocoumarines dans les cultures *in vitro* de *Psoralea cinerea*.

L'analyse du souchier de cals nous a permis de mettre en évidence la présence de daidzéine variant de 0 à 600 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS. Dans la plante entière, nous avons pu établir l'existence de façon simultanée de psoralène ainsi que de daidzéine à des concentrations moyennes de l'ordre de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF pour ce dernier métabolite. Par ailleurs, les deux voies métaboliques conduisant aux

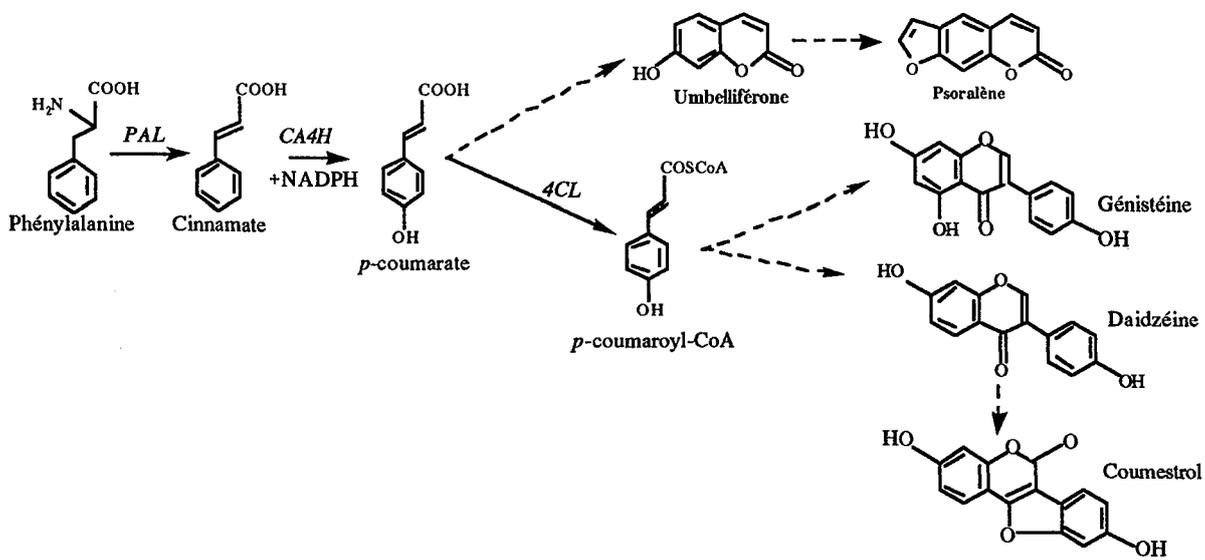


Figure 14. Schéma simplifié des voies de biosynthèse conduisant aux furocoumarines et aux isoflavonoïdes

furocoumarines et aux isoflavonoïdes sont communes pour plusieurs étapes (Figure 14). En conséquence, il nous a semblé possible que l'absence de synthèse de psoralène dans les cultures de cals aient pour origine une régulation enzymatique différente entre cals et plante entière. Plusieurs enzymes de la voie de biosynthèse pourraient être mise en cause. Le fait que les quantités de daidzéine détectées dans les cals soient supérieures à celles détectées dans les plantes entières ramenées à des concentrations dans la matière sèche nous a conduit à nous intéresser à la 4-coumarate CoA ligase. Cette enzyme est en effet la première de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes qui ne soit pas impliquée dans la biosynthèse du psoralène. Une régulation modifiée au niveau de la 4-coumarate CoA ligase pourrait expliquer l'orientation du 4-coumarate exclusivement vers la voie de biosynthèse des isoflavonoïdes. Cette hypothèse permettrait d'expliquer simultanément l'absence de psoralène et la synthèse accrue de daidzéine dans les cultures de cals. Pour rétablir la synthèse de psoralène, nous avons donc mis en place une expérience ayant pour but l'inhibition de la 4-coumarate CoA ligase.

Une seconde expérience a été conduite sur les racines transformées. L'analyse de la répartition des métabolites secondaires synthétisés par la plante entière laisse supposer que la synthèse de psoralène s'effectue dans les feuilles et éventuellement dans les organes reproducteurs et les jeunes pousses. En revanche, les racines ne paraissent pas synthétiser ce métabolite. Il semble donc que la synthèse de psoralène n'ait lieu que dans les organes chlorophylliens. Par ailleurs, l'étude bibliographique sur les enzymes de la voie de biosynthèse des furocoumarines révèle que l'hydroxylase, première enzyme de la voie spécifique des furocoumarines, est chloroplastique chez plusieurs espèces de plantes (Dixon et Paiva, 1995). Ces éléments nous ont conduit à établir des cultures de racines transformées à la lumière, de façon à obtenir des racines vertes et par conséquent chlorophylliennes.

2.4.1. Rétablissement de la synthèse de furocoumarines par les cultures de cals

Plusieurs inhibiteurs de cette enzyme sont répertoriés dans la littérature (Tahara et Ibrahim, 1995). L'utilisation du substrat de l'enzyme, le *p*-coumarate, à des concentrations supérieures à 0,1 μ M est l'un des inhibiteurs efficaces de la 4-coumarate CoA ligase. C'est celui que nous avons choisi afin d'inhiber la synthèse de daidzéine et de rétablir la synthèse de psoralène par les cultures de cals de *Psoralea cinerea*. Sept souches différentes ont été choisies au hasard parmi les trois catégories d'explants du souchier, dont 3 issues de feuilles (souches F), 3 de tiges (souches T) et 1 de cotylédon (souche C). Des concentrations de 0 ; 0,1 et 0,2 μ M de *p*-coumarate ont été additionnées au milieu de culture.

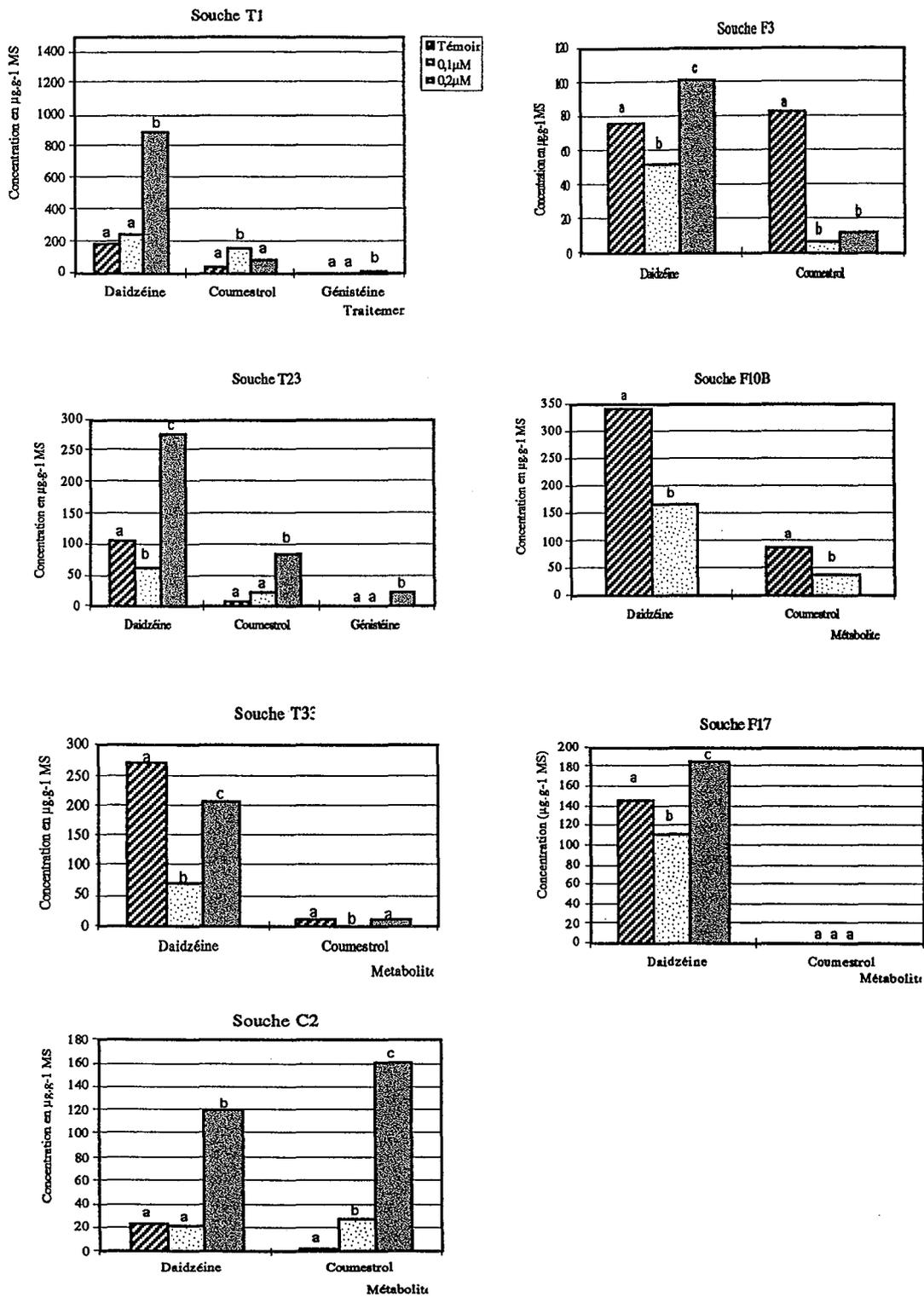


Figure 15. Teneurs en daidzéine, coumestrol et génistéine de 7 souches de cals issues de feuilles (souches F), de tiges (souches T) et de cotylédons (souche C) de *Psoralea cinerea* et cultivées sur milieu Z (Cierna *et al.*, 1991) additionné de 0 ; 0,1 ou 0,2 µM de *p-coumarate*. Pour un métabolite et une souche donnés, des lettres différentes représentent des concentrations statistiquement différentes au seuil de 5 %.

2.4.1.1. Effet de l'addition de *p*-coumarate sur la croissance des 7 souches de cals de *Psoralea cinerea*

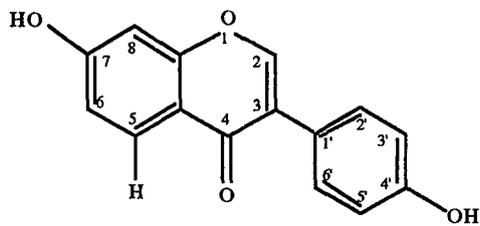
Une analyse de variance réalisée en randomisation totale sur les facteurs souche et traitement indique que les temps de doublement mesurés pour les cals issus de feuilles sont significativement plus longs (seuil de 5%) que ceux des cals issus de tiges ou de cotylédons. Ce phénomène a déjà été mis en évidence précédemment (cf 2.2.1.2.). En revanche, on ne note aucun effet du traitement sur les temps de doublement de la biomasse de ces 7 souches de cals, ce qui indique que l'addition de *p*-coumarate n'a pas d'incidence globale sur la croissance des cals issus de *Psoralea cinerea*.

2.4.1.2. Effet de l'addition de *p*-coumarate sur la production de métabolites secondaires par 7 souches de cals de *Psoralea cinerea*

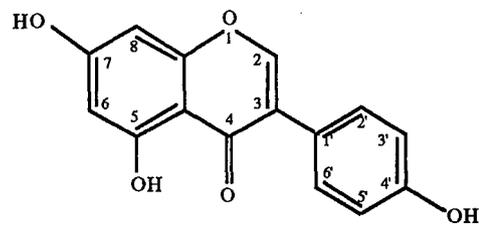
2.4.1.2.1. Analyse de la matière sèche

Les analyses réalisées sur la matière sèche sont représentées sur la figure 15. L'objectif de l'expérimentation qui consistait à inhiber la voie de biosynthèse des isoflavonoïdes et de rétablir la synthèse de furocoumarine n'est pas atteint. En effet, aucune des souches de cals de *Psoralea cinerea* testées ne synthétise le psoralène à des concentrations suffisantes pour être détectées par notre méthode d'analyse, et ce, quelle que soit la dose de *p*-coumarate appliquée. De plus, la synthèse de daïdzéine n'est pas inhibée et le coumestrol est identifié dans la matière sèche de 6 souches sur 7 analysées. En conséquence, l'addition du précurseur *p*-coumarate dans les quantités préconisées par la littérature pour inhiber la 4-coumarate CoA ligase ne semblent pas adaptées pour des cultures de cals de *Psoralea cinerea*.

Une analyse de variance réalisée en randomisation totale effectuée sur les 7 souches testées (seuil de 5%) indique que pour les souches prises dans leur ensemble, le traitement 0,1 μM n'est pas différent du traitement témoin pour la production de daïdzéine. Il semble cependant, d'après la figure 14, qu'une tendance à une diminution des teneurs en daïdzéine peut-être observée pour ce traitement, bien qu'elle ne soit significative que pour les souches T23, T33, F3 et F17. Le traitement 0,2 μM est pour sa part significativement différent des deux autres modalités (Témoin et 0,1 μM), mais conduit à une augmentation des teneurs en daïdzéine et non à la diminution que nous escomptions obtenir. La lignée a une grande incidence sur la production de daïdzéine. En effet, l'analyse de variance révèle que chacune des 7 souches est différente en terme de production, ce que nous avons mis en évidence précédemment, lors de l'étude de la répartition des différentes souches de cals issues du soucier de *Psoralea cinerea* par classe de concentration (tableau 7).



Daidzine



Genistein

Figure 16. Structure chimique comparée de la daidzine et de la génistéine. On note la présence d'un groupe OH en position 5 pour la molécule de génistéine.

En ce qui concerne le coumestrol, aucun groupe homogène ne peut être mis en évidence, traduisant une synthèse aléatoire de ce métabolite par les trois types d'explants soumis à trois traitements différents.

Lors de l'analyse des chromatogrammes obtenus par CLHP, un pic non encore observé a été mis en évidence au temps d'élution 11 minutes pour les souches T1 et T23. Le profil UV et le temps d'élution s'avérant relativement similaires à ceux de la daidzéine, il nous a semblé probable qu'il s'agissait d'un isoflavonoïde. Après comparaison avec plusieurs molécules étalons appartenant à cette famille chimique, il est apparu que le composé observé est la génistéine, molécule qui diffère de la daidzéine par la présence d'un groupement OH en position 5 (Figure 16).

La génistéine est détectée à des concentrations faibles ($10 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS) dans deux souches issues de tiges. Par ailleurs, on ne l'observe que pour le traitement $0,2 \mu\text{M}$ de *p*-coumarate. Si l'addition de *p*-coumarate ne suffit pas à restaurer la voie de biosynthèse des furocoumarines, il est indéniable qu'en fonction de la concentration à laquelle il est ajouté au milieu de culture, il agit sur la régulation de la voie de biosynthèse des isoflavonoïdes.

2.4.1.2.2. Analyse des milieux de culture

Les milieux de culture gélosés ont été traités comme indiqués dans le Matériel et Méthodes avant d'être analysés par CLHP. La présence de psoralène, de daidzéine de coumestrol ou de génistéine n'a pu être détectée dans aucun des échantillons analysés.

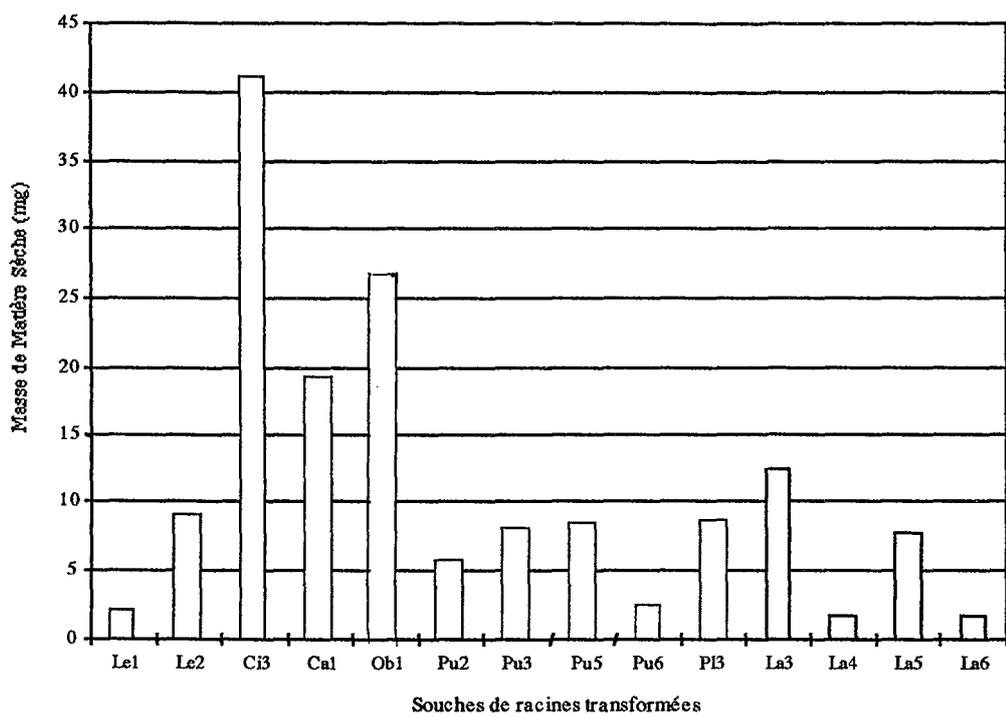


Figure 17. Biomasse racinaire récoltée à l'issue de 4 semaines de culture en milieu B5 liquide à la lumière.

Le: *P. leucantha* ; Ci: *P. cinerea* ; Ca: *P. canescens* ; Ob: *P. obtusifolia* ; Pu: *P. pustulata* ; La: *P. lachnostachys*.

L'addition de trois concentrations de p-coumarate aux milieux de culture de 7 souches de cals issus de Psoralea cinerea n'a pas permis de mettre en évidence la synthèse de psoralène. L'analyse des échantillons révèle en outre que la synthèse de daidzéine n'est non seulement pas inhibée, mais qu'elle est même augmentée par l'addition de p-coumarate à une concentration de 0,2 μ M. Enfin, une nouvelle molécule appartenant à la famille chimique des isoflavonoïdes a été identifiée dans la matière sèche de 2 souches de cals de Psoralea cinerea issues de tiges soumises au traitement 0,2 μ M de p-coumarate. Par conséquent, le traitement que nous avons envisagé semble avoir une action sur la 4-coumarate CoA ligase, mais non dans le sens escompté. La tendance à une diminution de la concentration en daidzéine observée pour le traitement 0,1 μ M sur toutes les souches pourrait indiquer que c'est la dose de p-coumarate appliquée et non la nature de la molécule qui serait mal adaptée pour inhiber la 4-coumarate CoA ligase dans les cultures de cals de Psoralea cinerea.

Le fait qu'aucun métabolite secondaire ne soit détecté dans les milieux de culture confirme par ailleurs que l'absence de psoralène dans la matière sèche n'est pas due à un transfert dans le milieu de culture mais bien à une absence de synthèse de ce métabolite.

2.4.2. Rétablissement de la synthèse de furocoumarines par des cultures de racines transformées chlorophylliennes

La synthèse des furocoumarines n'étant mise en évidence qu'au niveau des organes chlorophylliens chez la plante entière, nous avons initié des cultures liquides de 14 souches de racines transformées à la lumière, à partir d'explants issus du souchier entretenu dans les mêmes conditions. A l'issue d'un cycle de culture la matière sèche et les milieux de culture sont analysés par CLHP.

2.4.2.1. Biomasse des racines transformées cultivées à la lumière

Pour chacune des 14 souches de racines transformées, trois apex en phase exponentielle représentant une biomasse d'environ 1,6 mg de matière fraîche ont été mis en culture dans un Erlenmeyer. Les biomasses récoltées à l'issue des 4 semaines de culture sont représentées dans la figure 17.

La biomasse produite par les cultures de racines transformées « vertes » est en moyenne de 10,9 mg de matière sèche pour l'ensemble du souchier. Les mêmes souches cultivées à l'obscurité présentaient une biomasse sèche comprises entre 1 et 1,2 g, soit environ 100 fois plus (Figure 7) pour la même durée de culture.

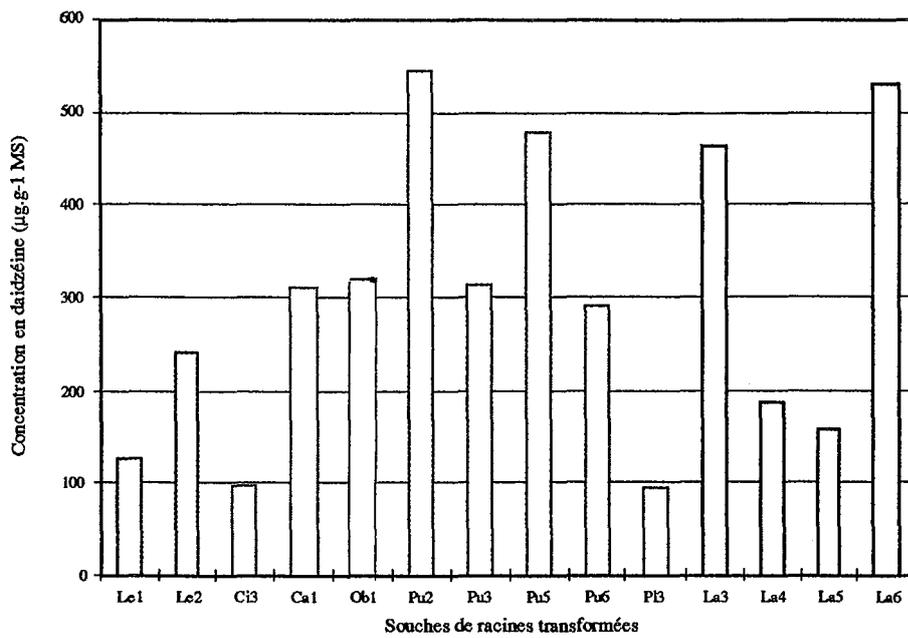


Figure 18a. Teneurs en daidzéine dans la biomasse sèche des racines vertes.

Le: *P. leucantha* ; Ci: *P. cinerea* ; Ca: *P. canescens* ; Ob: *P. obtusifolia* ; Pu: *P. pustulata* ; La: *P. lachnostachys*.

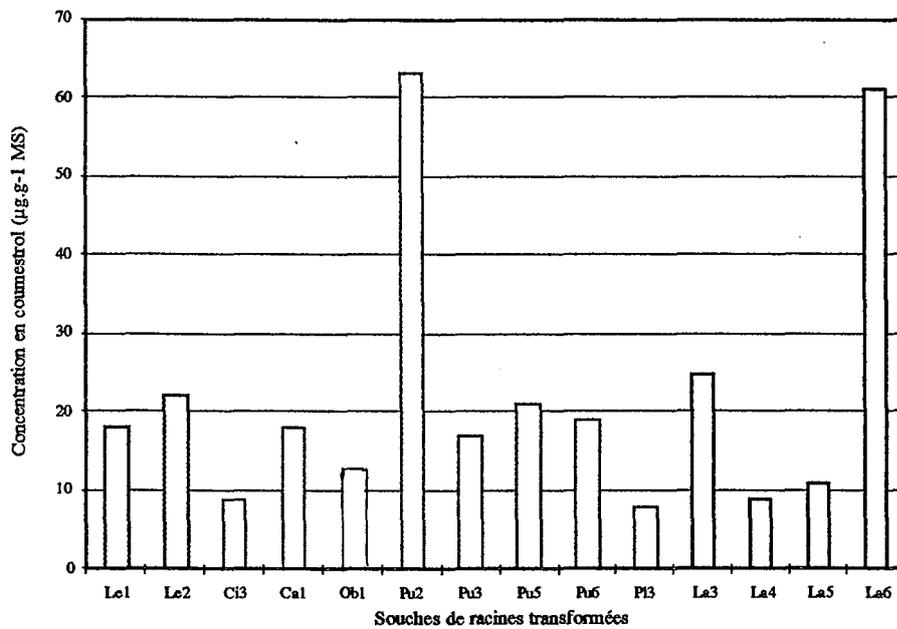


Figure 18b. Teneurs en coumestrol dans la biomasse sèche des racines vertes.

En outre, la masse de matière sèche récoltée varie considérablement d'une souche à une autre. Ainsi, les souches Le1, Pu6, La4 et La6 ne parviennent pas à doubler leur biomasse de départ, alors que la souche Ci3 voit sa biomasse initiale multipliée par un facteur 25 en 4 semaines de culture. Cette grande hétérogénéité entre souches, observée au niveau de la masse de matière sèche récoltée, est également mise en évidence pour la morphologie des racines transformées « vertes ». Les variations d'épaisseur ainsi que celles du nombre et de la taille des ramifications secondaires constatées au niveau du souchier cultivé à l'obscurité sont également visibles pour le souchier cultivé à la lumière. Les différences de pigmentation ajoutent encore à la variabilité inter et intraspécifique. En effet, seules les souches Ob1, Ca1 et Ci3 deviennent verdâtres, les autres souches de racines transformées gardent la couleur brun clair que l'on observait déjà dans le souchier cultivé à l'obscurité.

2.4.2.2. Analyse de la production de métabolites secondaires identifiés dans les racines transformées « vertes »

2.4.2.2.1. Analyse de la matière sèche

L'analyse des 14 souches de racines transformées cultivées à la lumière ne révèle pas la présence de furocoumarines. En effet, aucune trace de psoralène n'a pu être détectée dans nos conditions d'analyse. En revanche la daidzéine et le coumestrol sont identifiés sur les chromatogrammes de toutes les souches testées (Figure 18a et 18b).

De la même façon que pour le souchier cultivé à l'obscurité, les concentrations en daidzéine sont 8 à 10 fois supérieures aux quantités de coumestrol. Cependant, les teneurs obtenues pour les souches de racines transformées cultivées à la lumière sont 10 à 20 fois inférieures à celles récoltées dans le souchier de racines transformées cultivé à l'obscurité.

Nous pouvons constater qu'il existe pour ces deux molécules une forte variabilité inter et intraspécifique. Ainsi, en ce qui concerne la daidzéine, on observe que les teneurs détectées pour P13 sont inférieures de 1/50^{ème} à celles quantifiées chez Pu2. Si l'on s'attache à l'étude des souches issues de *Psoralea lachnostachys*, on peut noter que la souche La6 contient 3,3 fois plus de daidzéine que la souche La5, ce qui traduit une forte variabilité intraspécifique.

En ce qui concerne le coumestrol, toutes les souches synthétisent moins de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS, indiquant une synthèse faible et relativement homogène pour toutes les souches. Seules les souches Pu2 et La6 synthétisent des quantités de coumestrol supérieures à 60 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS.

Il est intéressant de noter que ces deux souches sont par ailleurs celles qui synthétisent les quantités maximales de daidzéine dans ces conditions de culture. En effet, la daidzéine est un des précurseurs du coumestrol et il semble par conséquent vraisemblable qu'à une forte concentration de daidzéine corresponde une concentration élevée en coumestrol. Ce phénomène

n'avait pas pu être mis en évidence lors de l'analyse du souchier de racines transformées cultivées à l'obscurité.

Il faut par ailleurs noter que les souches produisant les quantités maximales de métabolites secondaires (Pu2, La6) sont également celles qui croissent le moins vite (Figure 17). Cette opposition entre métabolismes secondaire et primaire est très fréquemment notée par les auteurs qui étudient l'influence de divers facteurs extérieurs sur le matériel végétal. La culture à la lumière pourrait par conséquent constituer une contrainte pour les racines transformées de Psoralées pourtant préalablement entretenues dans ces mêmes conditions.

2.4.2.2.2. Analyse des milieux de culture

L'analyse CLHP des milieux de culture des 14 souches de racines transformées « vertes » ne révèle la présence d'aucune trace des métabolites secondaires recherchés : ni isoflavonoides, ni furocoumarines ne sont détectés.

L'analyse du souchier de racines transformées cultivées à la lumière a permis de mettre en évidence plusieurs phénomènes. Il faut tout d'abord constater que la lumière a une grande incidence au niveau de la production de biomasse. Les masses de matière sèche récoltées à l'issue de 4 semaines de culture sont en effet environ 100 fois inférieures à celles établies pour les racines transformées cultivées à l'obscurité. La morphologie cependant n'est pas modifiée, excepté le léger verdissement constaté pour les souches Ob1, Ca1 et Ci3.

La lumière agit également sur la production de métabolites secondaires. L'analyse du souchier par CLHP n'a pas permis de mettre en évidence la présence de psoralène : aucune trace de ce métabolite n'est détectée quelle que soit la souche ou l'espèce de Psoralée envisagée. En revanche, la synthèse de daidzéine et de coumestrol est toujours effective, mais les teneurs maximales en daidzéine ($545 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$) et de coumestrol ($63 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$) sont inférieures d'un facteur 10 à 20 à celles détectées dans le souchier cultivé à l'obscurité. Dans le milieu, aucun métabolite recherché ou produit résultant de leur éventuelle dégradation n'est identifié, confirmant une absence de synthèse de furocoumarine dans les racines transformées cultivées à la lumière. Si l'éclairement que nous avons appliqué ($45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) montre un effet négatif sur la production de biomasse et d'isoflavonoides, il ne suffit pas à induire le verdissement des racines transformées, exceptées Ob1, Ca1 et Ci3. Ceci pourrait constituer une explication à l'absence de synthèse de psoralène.

3. DISCUSSION

3.1. Notion de stabilité génétique du matériel végétal *in vitro*

Avant d'entreprendre le dosage des souchiers de cals et de racines transformées issus de *Psoralées*, nous nous sommes attachés à obtenir une stabilisation génétique du matériel végétal. En effet, l'objectif de ce travail étant de caractériser de façon qualitative et quantitative la production de métabolites secondaires par les cultures de cals et de racines transformées déjà étudiées, il importait de s'assurer que les fluctuations éventuelles soient minimales dans le cas des dosages de souchier et uniquement dues aux traitements appliqués dans le cas des expériences que nous avons menées.

En ce qui concerne les racines transformées, elles ont été considérées comme stables *a priori*. En effet, ce type de matériel végétal est tout d'abord un tissu histologiquement organisé. Cela suppose des cellules différenciées ayant une expression génomique fixée. D'autre part, les racines transformées sont obtenues par l'insertion, au niveau du génôme de la cellule végétale, d'un fragment de l'ADN-T d'*Agrobacterium rhizogenes* (Chilton *et al.*, 1982). Par conséquent, le matériel végétal résultant de cette transformation présente une stabilité au niveau de l'expression de son génôme (Maldonado-Mendoza *et al.*, 1993 ; Lipp-Joao et Brown, 1994). Si l'on observe les résultats obtenus (Figure 7 et 8) il semble que les racines transformées de *Psoralées* soient effectivement stables. Les écarts-types indiqués sur les figures sont faibles tant du point de vue de la biomasse que de la production de métabolites secondaires, traduisant une bonne répétabilité et par extension une stabilité de l'expression des métabolismes primaires et secondaires.

En ce qui concerne les cultures de cals, il s'agit d'un tissu non organisé composé de cellules de types méristématiques qui se multiplient de façon anarchique. En conséquence, il nous a semblé important d'établir la stabilité de ce matériel végétal avant d'entreprendre le dosage des métabolites secondaires éventuellement synthétisés. Le repiquage régulier sur un milieu strictement identique et dans des conditions de culture contrôlées a été effectué. Le maintien de ces paramètres de culture est en effet essentiel pour fixer l'expression du génôme. Nous avons entrepris d'évaluer la stabilité du souchier de cals issus de *Psoralea cinerea* sur le critère de la croissance. Le choix de ce critère se justifie par la nécessité de pouvoir mesurer ce facteur sans détruire le matériel végétal et dans un délai très bref, le souchier contenant 104 souches différentes. Nous avons déterminé qu'une période de 63 semaines, soit 21 cycles de culture, était nécessaire à la stabilisation de l'ensemble du souchier. Très peu d'auteurs relatent le temps nécessaire pour obtenir des cultures de cals stables, sans par ailleurs préciser le critère d'évaluation de la stabilité. Il est par conséquent très difficile de confronter les résultats que nous avons obtenus à la littérature existant à ce propos. Cependant, il semble que la période que nous avons déterminée pour nos cals dans les conditions de culture que nous avons appliquées

soit relativement faible comparée à celles rapportées par Fett Neto *et al.* (1994) pour les cals de l'espèce ligneuse *Taxus cuspidata* (2 ans).

D'un point de vue expérimental, il semble en effet que le soucier de cals issus de feuilles, tiges ou cotylédons de *Psoralea cinerea* soit stabilisé. Les taux de croissance mesurés au cours de l'expérience ayant pour but d'inhiber la 4-coumarate CoA ligase par addition de *p*-coumarate ne sont pas différents de ceux calculés lors du dosage du soucier. De plus, bien que la stabilisation soit mesurée sur un critère de croissance, la production de métabolites secondaires est elle aussi stabilisée. En effet, les teneurs en métabolites détectées dans les traitements témoins des 7 souches de cals étudiées dans le cadre de cette expérimentation sont d'un ordre de grandeur tout-à-fait compatible avec la répartition en classes de concentration établie dans le soucier (Tableau 7).

Par conséquent, les cals et les racines transformées qui constituent notre matériel végétal semblent avoir atteint un niveau de stabilité suffisant pour un dosage des métabolites secondaires.

3.2. Production de biomasse

Les biomasses sèches récoltées après 4 semaines de culture pour les 18 souches de racines transformées cultivées à l'obscurité sont d'environ 1 à 1,2 g, ce qui équivaut à la multiplication par un facteur 375 de la biomasse de l'inoculum de départ. Ce résultat est comparable à celui rapporté par Nguyen *et al.* (1992) qui indique un facteur de multiplication de 452 pour la souche RTLach 1 issue de la transformation de *Psoralea lachnostachys* par la souche LBA 9402. Kuzovkina *et al.* (1996) rapportent la multiplication par un facteur 30 en 4 semaines et 130 en 8 semaines de la biomasse racinaire issue de plantes de *Rubia tinctorium*. Ce coefficient de multiplication est important puisqu'il confirme l'adéquation du milieu de culture B5 pour les cultures de racines transformées issues de Psoralées (Nguyen *et al.*, 1992). Dans un objectif de production de métabolites secondaires, un coefficient élevé implique une production de biomasse importante et rapide pouvant éventuellement compenser un niveau de production de métabolites secondaires par unité de biomasse trop moyen.

La production de biomasse par les racines transformées de Psoralées est fortement affectée par les conditions d'éclairage. En effet, dans des conditions de lumière ($45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de photon), la biomasse sèche récoltée est divisée par un facteur 100 par rapport à celle obtenue à l'obscurité. Il faut pourtant noter qu'un éclairage de $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ est faible. La quantité de lumière par temps couvert est en effet proche d'une valeur de $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Par conséquent, les racines transformées de Psoralées sont particulièrement sensibles à la lumière en ce qui concerne leur croissance. Ce phénomène est rapporté par plusieurs auteurs dans la littérature. Ikenaga *et al.* (1995) notent l'effet positif de la lumière sur la production de biomasse par des racines transformées de *Solanum aculeatissimum*. Partant d'un inoculum initial de 0,5 mg cultivé

sur milieu B5, la biomasse sèche est multipliée par un facteur 300 pour les racines cultivées à la lumière alors qu'il n'est que de 200 pour les racines transformées cultivées à l'obscurité, après 21 jours. Si Ishimaru *et al.* (1994) rapportent également un effet de la lumière sur la croissance des racines transformées vertes, ils constatent que cet effet peut-être positif ou négatif selon le milieu de culture. En effet, les racines issues de la transformation de *Lobelia sessilifolia* par la souche ATCC 15834 produisent plus de biomasse à la lumière qu'à l'obscurité lorsqu'elles sont cultivées sur milieu Murashige et Skoog. En revanche, sur milieu WP, les biomasses sèches récoltées sont supérieures à celles obtenues à l'obscurité. La production de biomasse par des racines vertes ne semble donc pas uniquement dépendre des conditions d'éclairage appliquées à ce matériel végétal.

En ce qui concerne la production de biomasse par des cultures de cals issus de *Psoralea cinerea*, elle est variable selon le type d'explant d'origine. Les cals issus de feuilles de *Psoralea cinerea* ont un temps de doublement de la biomasse significativement plus long que celui des tiges et des cotylédons. Cette différence constatée pour ce paramètre de croissance lors de l'analyse du souchier est à nouveau mise en évidence lorsque du *p*-coumarate est additionné à des doses de 0,1 ou 0,2 μM dans le milieu de culture des cals. Cette similarité dans le comportement des cals placés dans des conditions de culture différentes indique qu'il n'existe pas d'interaction détectable entre cette molécule et la nature de l'explant pour la production de biomasse. Le traitement avec du *p*-coumarate ne modifie pas non plus les temps de doublement de biomasse des cals. Les valeurs mesurées, comprises entre 6 et 19 jours sont par ailleurs plus élevées que celles répertoriées par Zenk et Deus (1982) pour *Catharanthus roseus* (3 jours), ou par Kato *et al.* (1972) pour *Nicotiana tabacum* (3 jours également). Cependant les temps de doublement chiffrés pour les cals de *Psoralea cinerea* sont très inférieurs à ceux d'espèces ligneuses comme *Callitris drumondii* qu'Uden *et al.* (1990) estiment à 40 jours.

Les temps de doublement moyens de la biomasse des cals issus de *Psoralea cinerea* et des racines transformées de 7 espèces de Psoralées sont tout-à-fait comparables à ceux répertoriés dans la bibliographie. La production de biomasse ne serait donc pas un facteur limitant, dans l'éventualité d'une production à grande échelle des métabolites secondaires synthétisés par ces 2 types de matériel végétal.

3.3. Production de métabolites secondaires

3.3.1. Production d'isoflavonoïdes

La daïdzéine et le coumestrol sont tous deux synthétisés par les cals et les racines transformées de Psoralées. Ces deux métabolites appartiennent à la famille chimique des

isoflavonoides et sont particulièrement bien représentés chez les Légumineuses (Tahara et Ibrahim, 1995).

Les quantités de daidzéine synthétisées par les cals de *Psoralea cinerea* sont en moyenne de $174 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS avec une concentration maximale de $504 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS obtenue pour la souche T5 issue de tige. Les teneurs détectées dans les racines transformées de 7 espèces de Psoralées varient entre 1000 et $8400 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS. Ces résultats sont intéressants à deux titres :

D'une part, les teneurs en daidzéine sont élevées si nous les comparons à la plante de soja, considérée comme une source importante de daidzéine et qui en contient environ $3000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS (Walz, 1931). Les cals de Psoralées sont moins productifs que les plantes entières de soja, mais les racines transformées présentent des teneurs en daidzéine très supérieures. En conséquence, les racines transformées de Psoralées pourraient constituer une source intéressante de daidzéine.

D'autre part, la forte variabilité constatée au sein du souchier de cals en terme de classe de concentration en daidzéine (Tableau 7) laisse entrevoir la possibilité de mettre en évidence une ou plusieurs lignées hyperproductrices. En effet, dans le cas des cals issus de tiges de *Psoralea cinerea*, 84% des souches produisent moins de $300 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS de daidzéine, cependant la souche T5 produit $504 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS de daidzéine. Par conséquent, la large gamme de concentration observée dans le souchier de cals issus de trois types d'explants de *Psoralea cinerea* constitue une source potentielle de souches hyperproductives.

L'expérience menée sur 7 souches de cals dans le but de rétablir la synthèse de furocoumarines a permis de mettre en évidence l'action positive du *p*-coumarate à une dose de $0,2 \mu\text{M}$ sur la production de daidzéine. Ceci confirme, comme pour un grand nombre d'autres espèces cultivées *in vitro*, que les teneurs en métabolites secondaires extraites des cals de *Psoralea cinerea* peuvent être augmentées par ajout de certains composés au milieu de culture, contribuant ainsi à améliorer le potentiel de production de ce matériel végétal. L'addition de *p*-coumarate a par ailleurs conduit à l'apparition d'un nouveau métabolite secondaire appartenant également à la famille des isoflavonoides : la génistéine. Ce composé est synthétisé selon une voie métabolique identique à celle de la daidzéine jusqu'à la molécule de *p*-coumaroyl-CoA, à partir de laquelle l'action de la chalcone synthase seule conduit à la daidzéine alors que l'action coordonnée de la chalcone synthase avec la chalcone réductase mène à la génistéine (Figure 5). L'ajout de *p*-coumarate à $0,2 \mu\text{M}$ conduit ainsi non seulement à l'amélioration des teneurs en daidzéine mais induit également l'apparition d'une molécule non détectable chez les traitements témoins. Il faut rappeler à ce propos que le *p*-coumarate est un précurseur commun de la voie de biosynthèse des isoflavonoides. Ajouté en quantité supérieure aux règles de la stochiométrie, cette molécule n'a semble-t-il pas inhibé la 4 coumarate-CoA ligase. Par conséquent, il semble probable que la forte concentration de *p*-coumarate ait conduit à une teneur accrue en *p*-coumaroyl-CoA puis à une activation simultanée des deux voies enzymatiques conduisant respectivement à la daidzéine et à la génistéine.

La production d'isoflavonoïdes par les racines transformées de Psoralées semble affectée par la culture en condition lumineuse. En effet, les teneurs en daïdzéine mesurées dans les racines « vertes » sont inférieures d'un facteur 10 à 20 à celles détectées dans les racines transformées cultivées à l'obscurité. Kyo *et al.* (1990) rapportent également l'inhibition de l'accumulation de composés nématocides par des racines transformées de *Tagetes patula* cultivées à la lumière. En revanche, Sauerwein *et al.* (1991) n'obtiennent la synthèse d'hernandulcine, ainsi que de plusieurs autres terpénoïdes, que lorsque les racines transformées de *Lippia dulcis* sont cultivées à la lumière. Aucun métabolite n'est détecté à l'obscurité. Ce même phénomène est montré par Ikenaga *et al.* (1995) pour des racines transformées de *Solanum aculeatissimum* qui ne synthétisent l'aculéatiside A et B (saponines) qu'en conditions de lumière. Il faut noter que dans les deux cas cités, la synthèse de métabolite secondaire est en étroite relation avec la production de biomasse, et n'a lieu qu'en phase exponentielle de croissance. Dans le cas des racines transformées de Psoralées, nous avons pu déterminer que la production de biomasse par les racines vertes est diminuée par un facteur 5 par rapport aux racines cultivées à l'obscurité. Ce retard de croissance pourrait par conséquent être à l'origine de la chute de rendement en daïdzéine observée pour les racines transformées « vertes ».

Quel que soit le matériel végétal cultivé *in vitro*, il s'avère que les concentrations moyennes en daïdzéine sont supérieures ou au moins égales aux teneurs moyennes détectées dans la plante entière. Ainsi, pour les racines transformées issues de *Psoralea cinerea*, les teneurs en daïdzéine sont de 4600 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS alors que la concentration maximale déterminée aux stades floraison et fructification pour la plante entière, est de 72 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS. Il est assez fréquent que les racines transformées issues d'une plante synthétisent des quantités de métabolites secondaires comparables (Gränicher *et al.*, 1995a) voire supérieures à celles détectées dans la plante entière (Ermayanti *et al.*, 1994b ; Subroto et Doran, 1994). La comparaison des teneurs en daïdzéine entre cals et plante entière montre que de nombreuses lignées de cals de *Psoralea cinerea* (174 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) synthétisent moins de daïdzéine que la plante entière au stade floraison ou fructification. Ce phénomène, très largement répertorié dans la littérature, est souvent la cause principale des coûts prohibitifs qui limitent l'utilisation des cultures *in vitro* comme ressource naturelle pour la production de molécules d'intérêts économiques divers : colorants, métabolites d'intérêt médical... (Moreno *et al.*, 1995).

A l'issue du dosage des souchiers disponibles au laboratoire, il semble que la production de daïdzéine soit intéressante dans les racines transformées, et qu'un potentiel, constitué par la large gamme de concentration en métabolites, existe pour la lignée de cals issus de *Psoralea cinerea*.

3.3.2. Production de furocoumarines

Nous n'avons pu détecter de psoralène dans aucune des lignées de cals ou de racines transformées de *Psoralées*, et ce, qu'il s'agisse de la matière sèche ou des milieux de culture. L'absence de ces métabolites nous a conduit à analyser la plante entière dans le but de mieux comprendre la répartition des furocoumarines et des isoflavonoïdes et d'appréhender de façon simple leurs sites de biosynthèse. Il résulte de cette analyse que les furocoumarines semblent être synthétisées dans les parties aériennes avant d'être transloquées dans les racines (Figures 12 et 13). Ce phénomène serait en accord avec les résultats de Brown (1979) qui indique que l'hydroxylase déterminant l'orientation du *p*-coumarate vers la voie de biosynthèse des furocoumarines est localisée au niveau des chloroplastes dans les parties aériennes de la plante. Les teneurs en furocoumarines détectées dans les racines de la plante entière résulteraient par conséquent d'une translocation de ce métabolite depuis les parties aériennes photosynthétiques pour prévenir les infections du système racinaire. Il faut en effet rappeler que les furocoumarines sont des phytoalexines chez les *Psoralées* (Bourgaud *et al.*, 1992) ainsi que chez les Ombellifères (Johnson *et al.*, 1973).

L'absence de furocoumarines aurait une origine différente dans les cals et les racines transformées.

Dans le cas des cals de *Psoralea cinerea*, l'impossibilité de détecter les furocoumarines ne peut être attribuée à l'absence de structures chloroplastiques. En effet, les cals sont très verts, ce qui traduit la présence de ces structures et potentiellement des enzymes qui y sont associées. Cependant, si l'existence des structures chloroplastiques est une condition nécessaire à la synthèse des furocoumarines, ce n'est pas une condition suffisante. En effet, il est généralement admis que la synthèse de métabolites secondaires est liée à un degré de différenciation élevé, qui ne serait atteint que dans un tissu assimilé à un organe (Wink, 1987). Dans le cas des *Psoralées*, la localisation histologique et cellulaire est assez peu étudiée, cependant des cellules spécifiques d'accumulation ont été mises en évidence dans des embryons de *Psoralea bituminosa* (Zobel et Brown, 1991a). Ceci confirmerait donc l'existence de cellules hautement différenciées capables de synthétiser ou de stocker les furocoumarines chez les *Psoralées*. La notion de différenciation est en opposition totale avec la nature des cals, constitués d'un amas de cellules embryonnaires indifférenciées.

Supposant l'existence de l'hydroxylase comme effective, nous avons entrepris de l'activer et de restaurer la synthèse des furocoumarines en inhibant la voie métabolique parallèle des isoflavonoïdes dérivant du même précurseur, le *p*-coumarate. Cette expérience n'a pas donné les résultats escomptés, l'inhibition de la 4-coumarate CoA ligase n'ayant pas été réalisée. Il serait intéressant de renouveler cette expérience en choisissant un inhibiteur plus efficace. En effet, si l'inhibition de la 4-coumarate CoA ligase conduit à la restauration de la voie de biosynthèse des furocoumarines, il sera possible d'en déduire que cette voie métabolique existe effectivement dans les cals mais que sa régulation est différente dans la plante entière et dans les cultures de

cals. En revanche, si l'inhibition de la 4-coumarate CoA ligase ne permet pas de rétablir la voie de biosynthèse des furocoumarines, nous ne pourrions pas déterminer si cette voie est absente ou si elle se trouve seulement inhibée à une étape ultérieure. Cette voie métabolique est en effet complexe. Ainsi, la prénylation de l'umbelliférone qui conduit au psoralène est sous la dépendance d'une prényltransférase localisée dans les chloroplastes pour *Ruta graveolens* (Brown et Steck, 1972) ou dans la membrane du reticulum endoplasmique chez *Ammi majus* (Matern *et al.*, 1988).

D'après nos résultats, il apparaît qu'un certain nombre d'expériences seraient à mener pour envisager la production de furocoumarines par des cultures de cals de Psoralées. Une meilleure connaissance des voies enzymatiques est indispensable. A cet effet, il est possible d'envisager l'extraction puis le dosage de l'activité des diverses enzymes de la voie de biosynthèse. Ce procédé nécessite la mise au point de protocoles propres à chaque enzyme qui pourrait s'avérer longue et fastidieuse. Il est également possible d'envisager le suivi d'un précurseur marqué par un élément radioactif dans le but de déterminer l'étape limitante de la voie de biosynthèse. Cette expérience nécessite un matériel performant et les prélèvements doivent être effectués à des intervalles de temps réduits pour pouvoir identifier toutes les étapes de la chaîne biosynthétique avant que les métabolites intermédiaires ne soient catabolisés.

L'absence de furocoumarines dans les racines transformées peut s'expliquer également en se fondant sur l'analyse réalisée sur la plante entière. En effet, les quantités de psoralène détectées dans les racines de la plante entière ainsi que l'évolution de la répartition de ce métabolite semblent indiquer que la synthèse des furocoumarines n'a pas lieu dans cet organe, mais résulte uniquement d'un transfert entre partie aérienne et racines. Nguyen *et al.* (1992) avait déjà pu constater ce phénomène dans des cultures de racines transformées issues de *Psoralea lachnostachys* : aucune trace de furocoumarine n'avait pu être mise en évidence dans la matière sèche ou le milieu de culture. Le psoralène et l'angélicine étaient également absents dans des cultures de racines non transformées excisées. L'absence de synthèse de furocoumarines dans les racines transformées peut donc avoir deux origines: la non occurrence de cette voie de biosynthèse dans ces organes, ou l'absence des structures chloroplastiques et des enzymes qui y sont rattachées et dont dépendrait la synthèse des furocoumarines.

L'établissement d'un soucier de racines transformées cultivées à la lumière n'a pas permis d'obtenir de furocoumarines, ce qui semblerait indiquer que la chaîne biosynthétique des furocoumarines n'existe pas dans les racines transformées. Cependant, l'éclairement que nous avons appliqué aux cultures est faible et les racines transformées ne sont devenues que partiellement chlorophylliennes. Il est par conséquent possible que cet éclairement ait été insuffisant pour induire l'apparition et l'activation de l'hydroxylase ou des autres enzymes chloroplastiques impliquées dans la synthèse des furocoumarines. L'hypothèse d'une chaîne biosynthétique inexistante dans les racines transformées nous semble toutefois la plus

vraisemblable, et les racines transformées de Psoralées ne seraient pas le matériel végétal approprié pour la synthèse de furocoumarines.

L'absence de synthèse de furocoumarines par les cultures *in vitro* de Psoralées peut paraître surprenante. En effet, d'autres auteurs ont obtenu la production de ces métabolites par des cultures *in vitro* de *Ruta graveolens* (Zobel et Brown, 1993), de *Petroselinum crispum* (Kauss *et al.*, 1994) ou plus récemment de *Coronilla vaginalis* et *Coronilla viminalis* (Piovan *et al.*, 1996). Les cals de Rue et de Persil synthétisent cependant des concentrations inférieures à celles détectées dans la plante entière, même lorsqu'elles sont soumises à des traitements éliciteurs comme l'application de méthyl jasmonate pour les cultures de Persil ou l'addition, dans les milieux de culture, de parois autoclavées de *Rhodotorula* dans les cas des cals de *Ruta graveolens*. En ce qui concerne les cultures de Coronilles, il faut, de plus, noter que la synthèse de furocoumarines est optimale dans des conditions d'obscurité. Par conséquent, il semble que des conditions particulières soient nécessaires à la production de furocoumarines par les cultures *in vitro*, conditions qui sont de plus variables d'une espèce végétale à une autre. L'ensemble de ces constatations confirme la complexité de la voie de biosynthèse des furocoumarines, et l'implication d'enzymes très spécifiques étroitement régulées par de nombreux facteurs. Il est donc fortement probable que les cultures de cals de Psoralées ne présentent pas toutes les conditions de régulation nécessaire à la biosynthèse des furocoumarines, ou même qu'elles soient déficientes pour une enzyme de la voie métabolique.

Une alternative aux cultures de cals et de racines transformées pour la production de furocoumarines pourrait être l'établissement de tératomes (Subroto *et al.*, 1996). En effet, ce matériel végétal résultant de la transformation d'une plante par *Agrobacterium tumefaciens* serait à la fois chlorophyllien et différencié, deux conditions qui semblent nécessaires à la synthèse des furocoumarines par les Psoralées.

CONCLUSION

L'analyse des souchiers de cals et de racines transformées de Psoralées disponibles au laboratoire a été réalisée après évaluation de la stabilité génétique. Si la production de biomasse est tout-à-fait satisfaisante dans nos conditions de culture, il semble en revanche que la production de métabolites secondaires soit profondément modifiée par rapport à celle établie dans la plante entière. Ainsi, les cals et les racines transformées de Psoralées ne synthétisent pas

de furocoumarines, métabolites pourtant détectés en quantités importantes dans les plantes entières. La présence de daidzéine, également identifiée dans les plantes entières, semble en revanche égale, voire très supérieure dans les cultures *in vitro*. Tenter de rétablir la synthèse des furocoumarines nécessiterait au préalable et comme nous l'avons déjà précisé, une étude approfondie des étapes, des métabolites intermédiaires et enzymes liées à cette voie de biosynthèse. Ces travaux sont relativement complexes étant donné le nombre d'étapes enzymatiques de la voie des furocoumarines et les liens étroits avec le métabolisme des phénylpropanoïdes (Figure 5). Des connaissances solides en enzymologie ainsi qu'un matériel spécifique seraient indispensables pour obtenir des résultats appréciables. La synthèse de furocoumarines n'étant pas l'objectif principal de ce travail, nous avons préféré orienter nos recherches vers la production des isoflavonoïdes mis en évidence lors du dosage des souchiers et de la plante entière. En effet, la daidzéine est un métabolite d'intérêt pharmaceutique au même titre que les furocoumarines et les teneurs détectées dans les racines transformées pourraient s'avérer intéressantes d'un point de vue de la production. Par conséquent, nous nous sommes attachés à mieux comprendre les mécanismes de biosynthèse ainsi qu'à améliorer les rendements en isoflavonoïdes dans les cultures de cals et de racines transformées de Psoralées. Les résultats de nos travaux seront présentés successivement pour les cultures de cals et pour les racines transformées.

CHAPITRE 2

Etude de la production d'isoflavonoïdes par des cals de Psoralées

INTRODUCTION

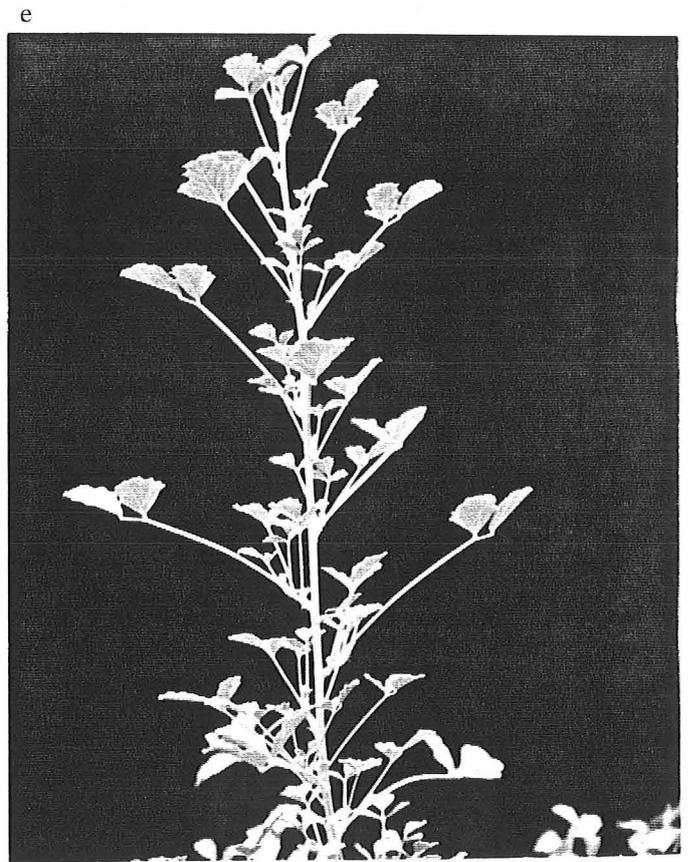
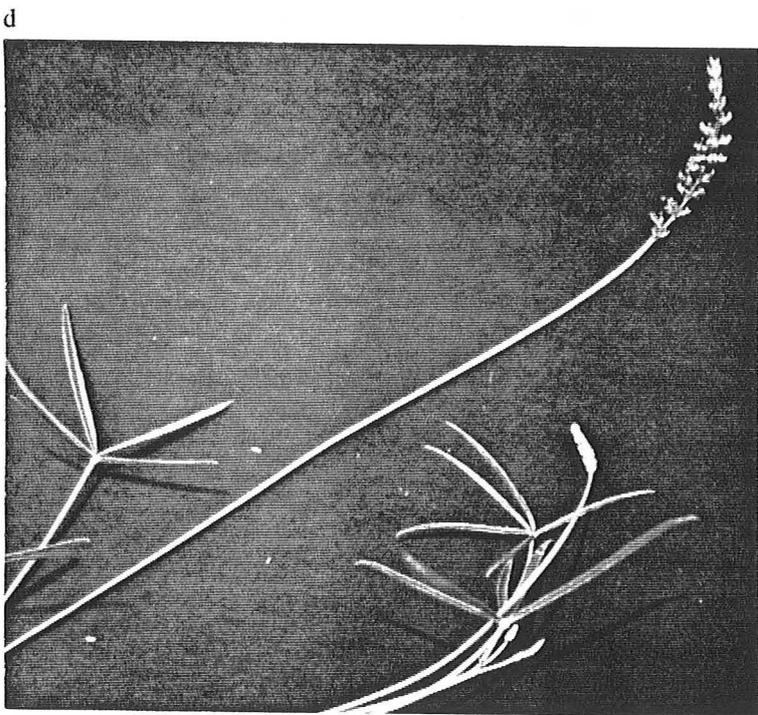
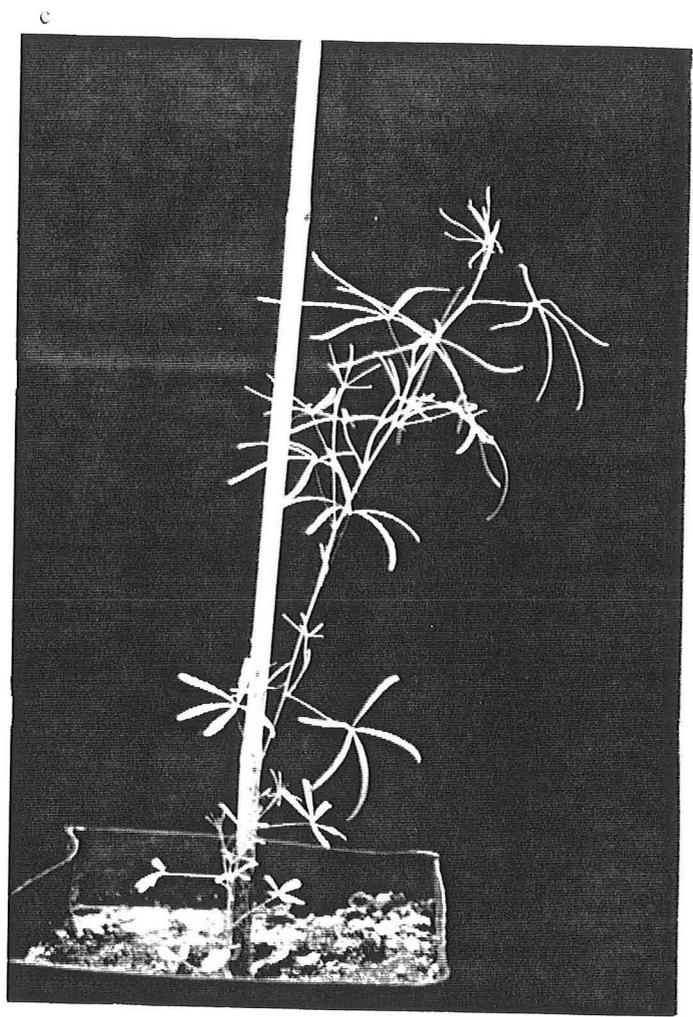
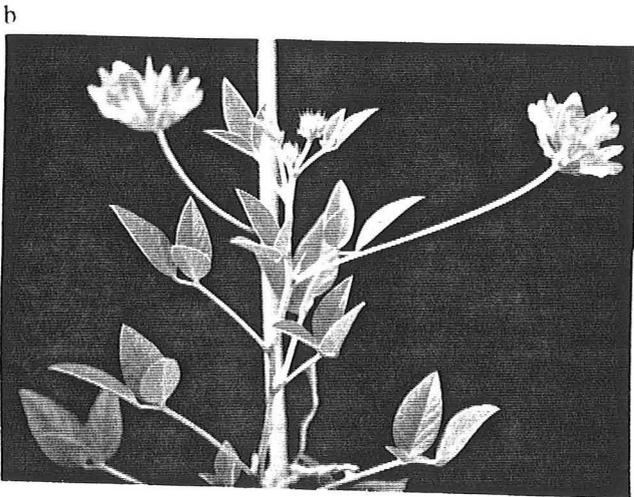
L'analyse du souchier de cals issus de feuilles tiges et cotylédons de *Psoralea cinerea* a révélé la présence de daïdzéine et de coumestrol. La gamme de concentration pour la daïdzéine s'avère très large, de 0 à 504 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS avec une teneur moyenne de 174 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS pour l'ensemble du souchier. Cette variabilité en terme de concentration pour des lignées issues de la même espèce de Psoralée nous a permis de mettre en évidence l'existence de souches hyperproductrices. Elargir le souchier de cals à d'autres espèces contribuera par conséquent à augmenter cette variabilité et ainsi à optimiser les chances d'obtenir des souches présentant des concentrations élevées en métabolites secondaires.

Par ailleurs, nous avons entrepris de modifier les conditions de culture appliquées au souchier dans le but d'augmenter la production en métabolites secondaires. Le changement des paramètres de culture ainsi que l'application de contraintes biotiques et abiotiques ont été envisagées.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Etablissement d'un souchier de cals issu de cinq espèces de Psoralées

Faisant référence aux travaux de Ngyuen (1992) sur *Psoralea cinerea*, nous avons entrepris d'établir un souchier à partir de cinq autres espèces de Psoralées. Le milieu de base (Cierna *et al.*, 1991) ainsi que la nature des hormones de croissance qui sont adéquates pour la callogénèse et la croissance de *Psoralea cinerea* ont été conservées. En revanche, les balances hormonales ont été modifiées de façon à réduire le plus possible la dose de 2,4.D. appliquée. Cette hormone est en effet référencée comme un inhibiteur puissant de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (Ozeki *et al.*, 1989).



Photos 1. Culture en serre des 5 espèces de Psoralées d'où sont issus les cals étudiés. a: *P. bituminosa* ; b: *P. macrostachya* ; c: *P. lupinellus* ; d: *P. tenax* ; e: *P. obtusifolia*

1.1.1. Obtention du soucier

1.1.1.1. Matériel végétal

1.1.1.1.1. Les plantes

Cinq espèces ont été choisies : *Psoralea bituminosa*, (région méditerranéenne) *Psoralea lupinellus*, *Psoralea macrostachya*, *Psoralea tenax* et *Psoralea obtusifolia* (Australie). Elles sont cultivées au laboratoire, en serre (photo 1).

1.1.1.1.2. Obtention d'explants stériles

Les explants foliaires sont prélevés sur des plantes en pot. Ils sont désinfectés par un bain de 20 minutes dans une solution d'hypochlorite de calcium à 3% (p/v) à laquelle sont ajoutées quelques gouttes de détergent, puis laissés dans l'éthanol à 95° durant quelques secondes. Les explants sont ensuite rincés 5 fois à l'eau distillée stérile pendant 5 minutes, le dernier rinçage durant 15 minutes. Les parties brûlées par l'hypochlorite de calcium sont éliminées. Les explants sont ensuite découpés en demi-folioles et mis en culture.

1.1.1.2. Culture en conditions stériles

1.1.1.2.1. Préparation des milieux

Nous avons utilisé le milieu Z solide (Cierna *et al.*, 1991) dont la composition est indiquée en annexe 1. La solution est préparée avec de l'eau ultrapure (résistivité de 18 M Ω /cm). Le milieu est gélifié avec 3 g.l⁻¹ de Phytigel (Sigma). Les explants foliaires sont mis en culture dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre contenant environ 20 ml de milieu.

1.1.1.2.2. Conditions de culture

Nous déposons 4 demi-folioles par boîte de Pétri de 90 mm de diamètre. Ces folioles sont placées la face supérieure en contact avec le milieu. En effet, il semble qu'en plaçant la face inférieure contre le milieu, les échanges gazeux se trouvent limités et la callogenèse qui s'initie à partir des tissus cambiaux est alors inhibée (Nguyen, 1992). Les

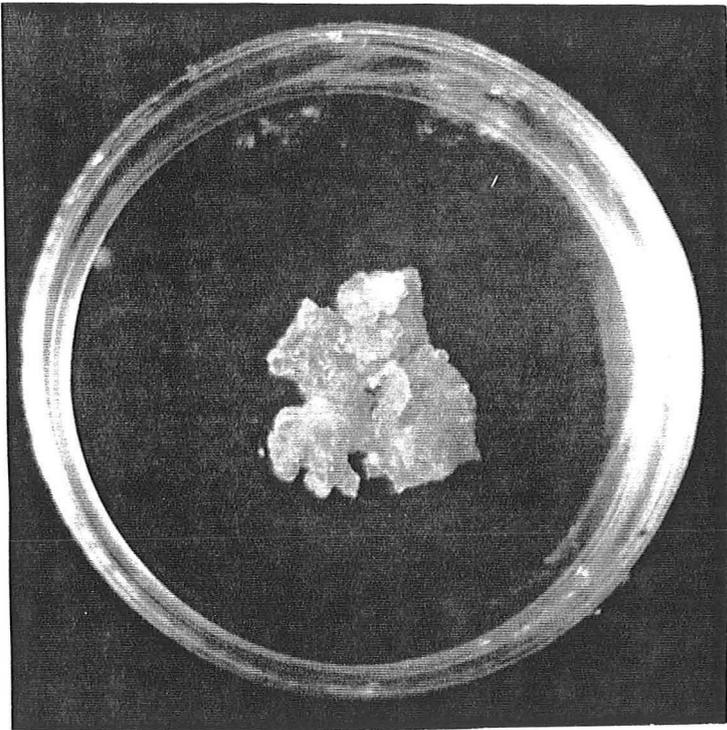


Photo 2a

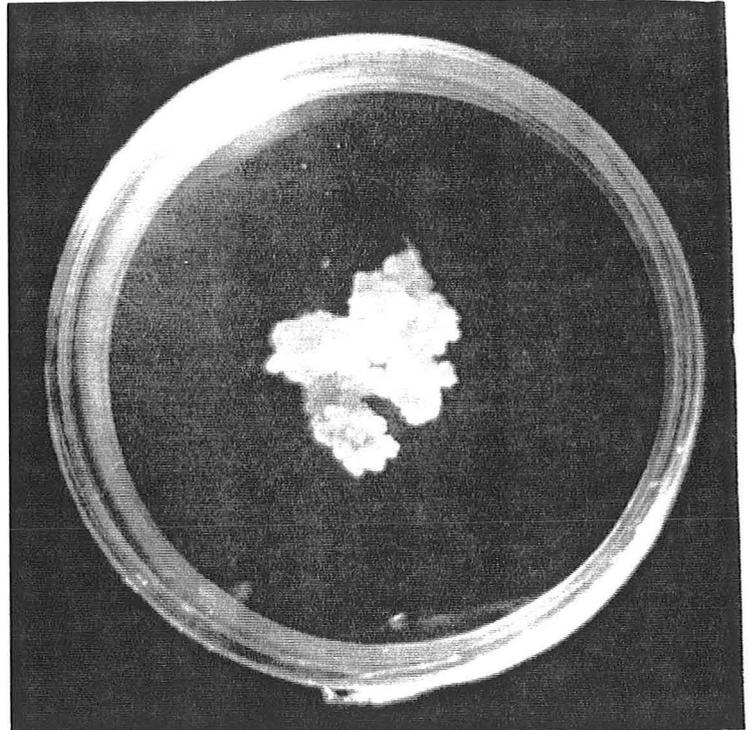


Photo 2b

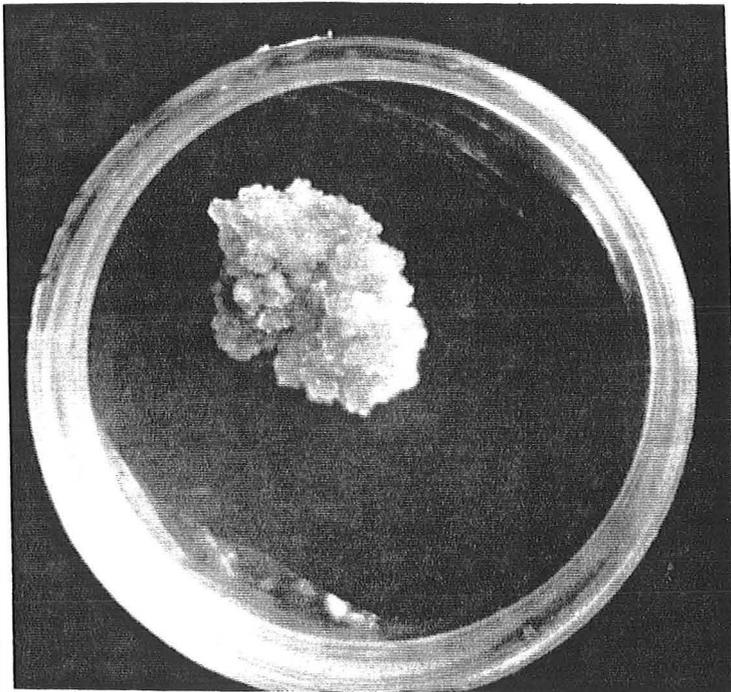


Photo 2c

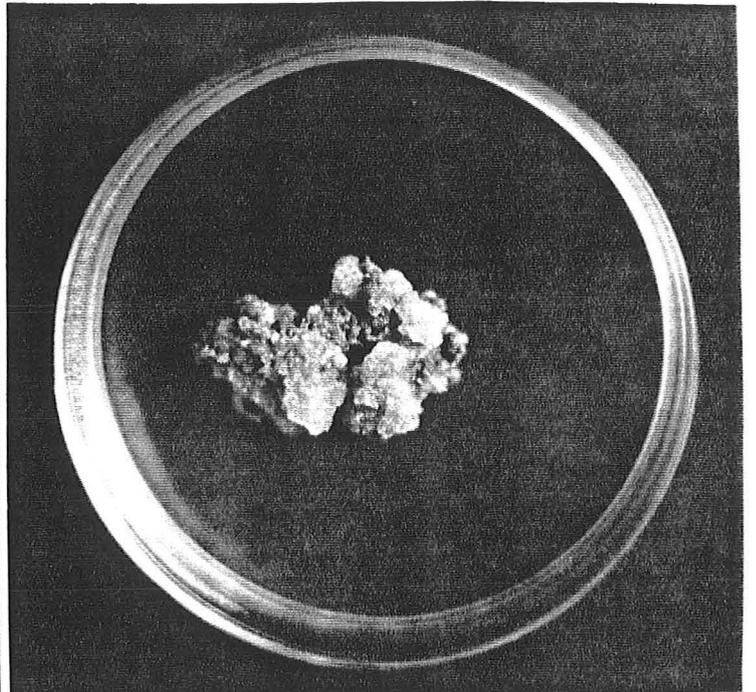


Photo 2d

Photos 2. Nuances de la couleur pour des cals cultivés à la lumière. 2a: cal vert ; 2b: cal vert/brun ; 2c: cal brun/vert ; 2d: cal noir.

cultures sont placées en chambre phytotronique où la température est maintenue constante à 25°C. Un éclairage de 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ est obtenu par des tubes fluorescents de 60 W (Mazda, lumière du jour) avec une photopériode de 16 heures de jour.

1.1.1.3. Appréciation de la callogenèse

Les cals obtenus à partir de la dédifférenciation de l'explant sont de taille variable. Afin de suivre leur croissance, 3 paramètres sont étudiés. Ils rendent compte du potentiel callogène de la combinaison de régulateurs de croissance appliquée. Ces paramètres sont les suivants (méthode Nguyen, 1992) :

- ✓ le pourcentage de callogenèse (%C) : rapport du nombre d'explants ayant formé un cal sur le nombre d'explants mis en culture.
- ✓ la taille moyenne des cals : mesure de la plus grande longueur de chaque cal.
- ✓ la couleur des cals obtenus : la couleur peut varier du vert au brun-noir (photo 2).

1.1.2. Entretien du souchier

Une fois séparés de l'explant d'origine, les cals sont cultivés en boîtes de Pétri de 60 mm, à la lumière (Tubes Mazda, lumière du jour, 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, photopériode de 16 heures), dans une chambre phytotronique dont la température est maintenue à 25°C et l'hygrométrie est fixée à 65%. Un repiquage est effectué toutes les trois semaines, simultanément avec les lignées F, T et C issues de *Psoralea cinerea*.

1.2. Expérimentations

1.2.1. Influence de la durée de culture

1.2.1.1. Matériel végétal

Cette expérimentation est menée sur 8 souches de cals issus de 6 espèces de Psoralées :

souche TEN1 : *P. tenax*

souche OBT15 : *P. obtusifolia*

souche L7A : *P. lupinellus*

souche B52 : *P. bituminosa*

souche M2' : *P. macrostachya*

souches F57, T45, C4 : *P. cinerea*

1.2.1.2. Conditions de culture

Les lignées de cals sont cultivées dans les conditions précisées dans le paragraphe 1.1.2. Le milieu de culture est identique à celui préconisé pour l'entretien du soucier des lignées issues de *Psoralea cinerea*. Deux balances hormonales sont établies :

- 9,3 μM de kinétine et 9 μM de 2,4.D. : souches TEN1, OBT15, L7A, F, T, C.

- 2 μM de kinétine et 2 μM de 2,4.D : souches B52, M2'

Les cals, repiqués régulièrement tous les 21 jours dans les conditions d'entretien du soucier, sont mis en culture pour une durée de 60 jours dans le cadre de cette expérimentation. Cinq cals sont mis en culture pour chaque souche, chacun d'entre eux constituant une répétition.

1.2.2. Influence de la composition du milieu de culture

1.2.2.1. Influence de la concentration en 2,4.D.

Quatre souches issues de *Psoralea cinerea* (F66, F73, T45, et C4) sont mises en culture pendant 21 jours sur milieu Z (Cierna *et al.*, 1991) complété avec 9,3 μM de kinétine et une dose variable de 2,4.D. Trois traitements sont envisagés :

- traitement Témoin : 9 μM de 2,4.D.

- traitement 1/2 : 4,5 μM de 2,4.D.

- traitement 0 : pas de 2,4.D.

Trois cals sont mis en culture pour chaque souche à chaque traitement.

1.2.2.2. Influence d'un éliciteur

Le sulfate de cuivre et le chitosane sont les deux éliciteurs que nous avons testé sur les quatre souches issues de *Psoralea cinerea* citées ci-dessus. Les cals sont cultivés sur

milieu Z (Cierna *et al.*, 1991) complété par 9,3 μM de kinétine et 9 μM de 2,4.D. Trois traitements sont appliqués pour chaque éliciteur :

✓ Sulfate de cuivre :

- traitement Témoin : pas de CuSO_4
- traitement Cu100 : 100 μM de CuSO_4
- traitement Cu200 : 200 μM de CuSO_4

✓ Chitosane :

- traitement Témoin : pas de chitosane
- traitement CHI : 30 mg.l^{-1} de chitosane

Trois cals sont mis en culture pour chaque souche à chaque traitement.

1.2.2.3. Influence de la nutrition azotée

Cette expérimentation est menée sur cinq souches de cals issues de *Psoralea obtusifolia*, OBT1, OBT3, OBT7, OBT13 et OBT14. Les teneurs en azote sont modifiées selon 4 modalités, dans le but de faire varier la concentration sans altérer le ratio ammonium/nitrate. Les cals sont cultivés sur milieu Z (Cierna *et al.*, 1991) complété par 9,3 μM de kinétine et 9 μM de 2,4.D. Les traitements appliqués sont :

- traitement Témoin : milieu Z d'entretien
- traitement N/2-P : teneur en azote divisée par 2 et teneur en phosphate identique au traitement témoin
- traitement N/2-P/2 : teneur en azote divisée par 2 et teneur en phosphate divisée par 2
- traitement Nx2-P : teneur en azote multipliée par 2 et teneur en phosphate identique au traitement témoin

Quatre cals sont mis en culture pour chaque souche à chaque traitement.

1.3. Analyse des échantillons

1.3.1. Analyse du matériel végétal

1.3.1.1. Détermination de la biomasse

La détermination de la biomasse se fait par des mesures planimétriques selon le protocole précisé dans le paragraphe 1.2.2.3.1.1. du chapitre 1.

1.3.1.2. Extraction des métabolites secondaires

Les cals sont récoltés à l'issue d'un cycle de trois semaines de culture, excepté dans le cas de l'expérimentation menée sur les cals de 6 espèces de Psoralées conduites sur une période de 60 jours. A l'issue de cette période, les cals sont récoltés avec une pince pour éliminer le milieu adhérent avant d'être emballés séparément, congelés dans l'azote liquide, puis lyophilisés et réduits en poudre. Environ 5 mg de cette poudre sont prélevés très précisément, puis hydrolysés à 100°C dans un Eppendorf avec 1,5 ml d'acide sulfurique 3M. Après une demi-heure d'agitation, les échantillons sont centrifugés (centrifugeuse JOUAN M14.11) à 10300 g (soit 12000 tr/min) pendant 7 minutes. Un aliquote du surnageant est ensuite dilué à moitié avec de l'éthanol 96°, puis filtré sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0,45 µm avant d'être analysé (Nguyen *et al.*, 1997).

1.3.2. Analyse des milieux de culture

Les milieux de culture sont analysés selon le protocole suivant :
700 µl de milieu de culture sont prélevés et hydrolysés à 100°C dans un Eppendorf avec 1,5 ml d'acide sulfurique concentré 6M. Après centrifugation (centrifugeuse JOUAN M14.11) à 10300 g (soit 12000 tr/min) pendant 7 minutes, le milieu est dilué à moitié avec de l'éthanol 96°, puis filtré sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0,45 µm avant d'être analysé (Nguyen *et al.*, 1997).

1.4. Technique d'analyse et identification des métabolites

Les analyses sont réalisées par CLHP selon le même protocole que celui développé dans le premier chapitre (paragraphe 1.3.).

Pour les métabolites mis en évidence au cours de ces expérimentations et non encore identifiés, la détermination est réalisée par comparaison des spectres UV et des temps d'élution avec des molécules étalons.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Etablissement d'un soucier de cals de Psoralées

131 souches de cals ont été initiées à partir d'explants de *Psoralea cinerea* par Nguyen (1992). Nous avons entrepris d'établir un second soucier à partir de 5 autres espèces de Psoralées.

2.1.1. Etude de la callogenèse

2.1.1.1. Espèces *Psoralea obtusifolia* et *Psoralea tenax*

Une étude préliminaire nous a conduit à tester l'efficacité du milieu utilisé pour l'obtention de cals à partir de *Psoralea cinerea* sur deux autres espèces de Psoralées : *P. tenax* et *P. obtusifolia*. Dans cette première étude, seul le pourcentage de callogenèse est mesuré.

Vingt explants sont mis en culture pour chaque espèce, dans 5 boîtes de Pétri différentes. Pour les explants issus de *Psoralea obtusifolia*, on obtient une dédifférenciation puis un cal dans 18 cas sur 20, soit un pourcentage de callogenèse de 90%. Ce pourcentage est inférieur en ce qui concerne les explants de *Psoralea tenax* : seul 12 explants sur 20 (soit 60%) montrent une dédifférenciation conduisant à l'obtention d'un cal après une période de culture de 18 jours.

Ces pourcentages de callogenèse sont tout à fait comparables à ceux rapportés par Nguyen pour *Psoralea cinerea*. Le milieu de culture de Cierna *et al.* (1991) est donc adapté à la callogenèse de toutes les espèces de Psoralées testées.

A l'issue de cette première étude, nous avons envisagé de travailler avec trois autres espèces de Psoralées en réduisant les doses d'hormones de croissance de façon à maintenir une callogenèse et une croissance maximale des cals en optimisant les balances de facteurs de croissance.

2.1.1.2. Espèces *P. bituminosa*, *P. lupinellus* et *P. macrostachya*

Nous avons employé le milieu Z (Cierna *et al.*, 1991), auquel nous additionnons du 2,4.D. et de la kinétine en concentrations variables. Les concentrations testées

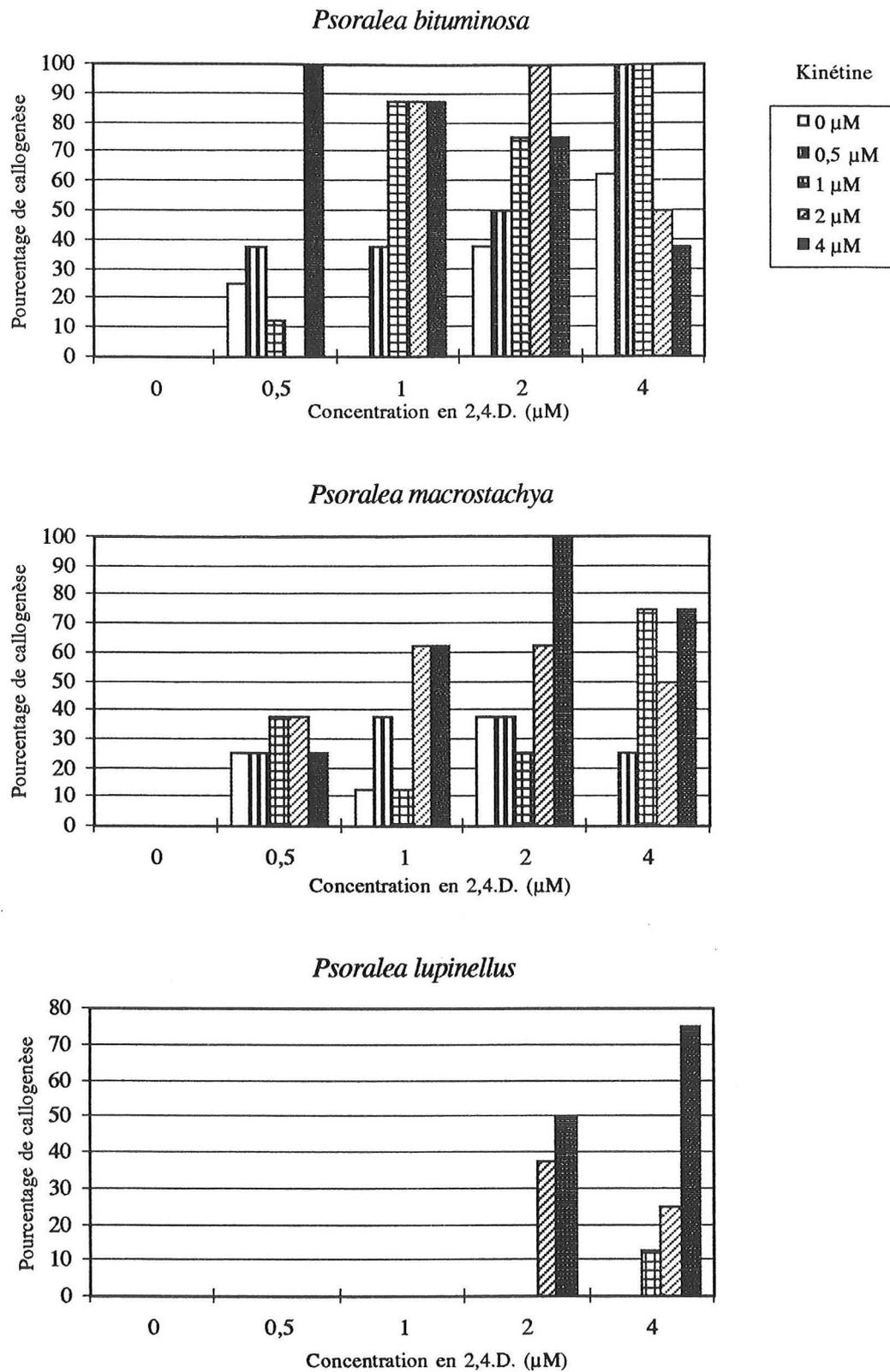


Figure 19. Influence des concentrations en kinétine et 2,4.D. sur le pourcentage de callogénèse de *Psoralea bituminosa*, *Psoralea macrostachya* et *Psoralea lupinellus*.

sont 0 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; et 4 μM et toutes les combinaisons possibles entre les concentrations des deux hormones sont réalisées, ce qui correspond à 25 combinaisons kinétine/2,4.D. pour chacune des espèces. Chaque traitement est répété trois fois.

Les explants foliaires sont prélevés sur des organes jeunes afin d'augmenter les chances de dédifférenciation du matériel végétal. En effet, plus un tissu est jeune et plus les cellules sont aptes à se dédifférencier. Le dédifférenciation se traduit par des divisions cellulaires qui conduisent à la formation de cellules à l'aspect méristématique. Ceci explique la plus grande réactivité des cellules embryonnaires ou des tissus rejuvénilisés (Zrýd, 1988).

Les trois espèces ont initié des cals après une période de culture de trois semaines et demi pour au moins un traitement donné. Ce délai est en accord avec les chiffres rapportés par Bois (1992) qui établit des cals à partir des pétioles et des feuilles de *Fragaria vesca* en 4 semaines sur du milieu Murashige et Skoog (1962). En outre, il apparaît que l'espèce *Psoralea bituminosa* est la plus apte à se dédifférencier pour permettre l'obtention de cals (Figure 19). En absence de 2,4.D., aucune des 3 espèces ne présente de callogenèse, quelle que soit la concentration en kinétine appliquée. En revanche, la kinétine est nécessaire pour *Psoralea lupinellus* mais n'est pas indispensable pour observer la callogenèse des 2 autres espèces. Jafari *et al.* (1995) observent également qu'aucun cal n'est obtenu à partir de pétioles de peupliers en l'absence de 2,4.D. dans le milieu de culture. Mita *et al.* (1994) indiquent par ailleurs que le 2,4.D. est l'auxine la plus efficace pour initier des cals à partir de feuilles, de tiges et de racines d'*Alkanna tinctoria*. L'absence de callogenèse pour les explants des 3 espèces de *Psoralées* cultivés sans 2,4.D. n'est donc pas un phénomène isolé.

2.1.1.2.1. Etude du pourcentage de callogenèse

L'étude des pourcentages de callogenèse obtenus pour *Psoralea bituminosa* nous permet de dégager 4 traitements pour lesquels nous obtenons 100% de callogenèse et 3 autres pour lesquels plus de 80% des explants deviennent callogènes. Parmi ces traitements, la balance hormonale 2 μM de 2,4.D. / 2 μM de kinétine permet d'obtenir un phénomène de callogenèse pour plus de 60% des explants issus de *Psoralea macrostachya*. Par ailleurs, la balance 2 μM de 2,4.D. / 4 μM de kinétine, qui est la plus adéquate pour *Psoralea macrostachya* permet d'obtenir des cals dans plus de 70% des cas avec *Psoralea bituminosa*. Ayant pour objectif d'obtenir les meilleurs résultats avec des concentrations hormonales minimales, c'est la balance 2 μM de 2,4.D. / 2 μM de kinétine qui a été adoptée à l'issue de l'étude des pourcentages de callogenèse pour les espèces *Psoralea bituminosa* et *Psoralea macrostachya*. En ce qui concerne *Psoralea lupinellus*, il semble que cette espèce nécessite des teneurs en hormones supérieures à celles requises par les 2 autres espèces de *Psoralées* testées,

le phénomène n'apparaissant que pour les concentrations en hormones les plus élevées, et n'atteignant jamais les 100%.

Les diverses balances hormonales nécessaires à la callogenèse des 3 espèces étudiées indiquent que les teneurs endogènes en auxine et cytokinine sont probablement très différentes d'une espèce de Psoralée à l'autre.

2.1.1.2.2. Détermination des balances hormonales optimales

Les résultats obtenus pour la taille et la couleur des cals (résultats non représentés) confirment ceux précédemment obtenus pour le pourcentage de callogenèse : les combinaisons de régulateurs de croissance qui permettent d'obtenir les cals les plus verts et de tailles maximales sont identiques à celles qui ont permis l'obtention des pourcentages de callogenèse maximum. Ainsi, pour *Psoralea bituminosa* et *Psoralea macrostachya*, les cals de plus grande taille sont obtenus avec des concentrations de 2 μM de 2,4.D. et 2 μM de kinétine. Pour *Psoralea lupinellus* les valeurs maximales concernant la taille et le pourcentage de callogenèse sont toutes deux obtenues avec la balance 2,4.D. / kinétine 4 μM / 4 μM , mais n'atteignent pas les maxima obtenus pour les 2 autres espèces. Des concentrations supérieures à celles appliquées sont donc nécessaires pour l'obtention et le maintien des souches de cals issues de *Psoralea lupinellus*.

Au vu des résultats et afin de faciliter le repiquage de l'ensemble du soucier établi, les cals de *Psoralea bituminosa* et *Psoralea macrostachya* ont par la suite été repiqués sur milieu Z complété par 2 μM de 2,4.D. et 2 μM de kinétine. Ce milieu est en effet le plus adéquat pour la callogenèse de *Psoralea bituminosa* et correspond à un coefficient de callogenèse important pour *Psoralea macrostachya*. En outre, c'est le milieu commun à ces deux espèces qui donnent les meilleurs résultats avec des doses de régulateurs de croissance minimales. En revanche, les cals de *Psoralea lupinellus* semblent nécessiter des apports exogènes en hormones supérieurs à ceux que nous avons testés. Par conséquent, et dans le but de faciliter le repiquage du soucier complet, les cals issus de *Psoralea lupinellus* ont été repiqués sur le milieu employé pour les cals de *Psoralea cinerea*, soit le milieu Z supplémenté par 9 μM de 2,4.D. et 9,3 μM de kinétine. Il est intéressant de constater que le phénomène de callogenèse est obtenu dans les meilleures conditions sur des milieux équilibrés pour leurs concentrations en auxine et en cytokinine. Les espèces de *Psoralées* suivent donc le principe mis en évidence par Skoog et Miller (1957) selon lequel l'obtention d'un cal à partir d'un explant végétal est lié à l'équilibre existant entre les teneurs en auxines et les cytokinines ajoutées au milieu de culture.

Une soixantaine de cals de *Psoralea bituminosa*, environ 50 cals de *Psoralea macrostachya* et 10 issus de *Psoralea lupinellus* ont été séparés des explants de départ. Après cinq repiquages, 52 cals de *Psoralea bituminosa*, 42 cals de *Psoralea macrostachya* et 7 cals de *Psoralea lupinellus* ont continué à se développer, constituant, avec les souches issues de *Psoralea obtusifolia* et *Psoralea tenax*, un second soucier de cals de *Psoralées*.

2.1.2. Etude de la croissance du soucier de cals de *Psoralées*

2.1.2.1. Stabilisation du soucier

A la lumière des observations faites sur le soucier de cals issus de *Psoralea cinerea*, nous avons entrepris de stabiliser le soucier nouvellement constitué à partir des 5 autres espèces de *Psoralées*. L'évaluation de la stabilité génétique des lignées a été réalisée en suivant le caractère polygénique de la production de biomasse. De la même manière que pour les cals de *Psoralea cinerea*, les lignées ont été considérées comme stables lorsque trois courbes de croissance successives étaient superposables. La constance des paramètres de croissance considérés comme représentatifs de la stabilisation des modifications induites par la mise en culture *in vitro* (vitesse de croissance, longueur de la phase de latence et de la phase exponentielle) a été obtenue après un nombre de cycles de repiquage variable selon l'espèce. Nous avons représenté le pourcentage de souches stabilisées sur la totalité du soucier (cals de

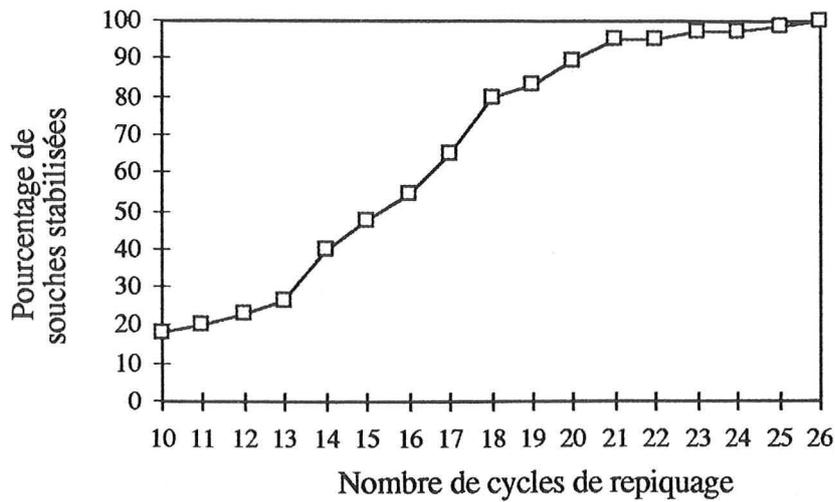


Figure 20. Evolution du pourcentage de souches de cals stabilisées. Cette courbe est réalisée avec un échantillon de 147 lignées établies à partir d'explants de six espèces de Psoralées.

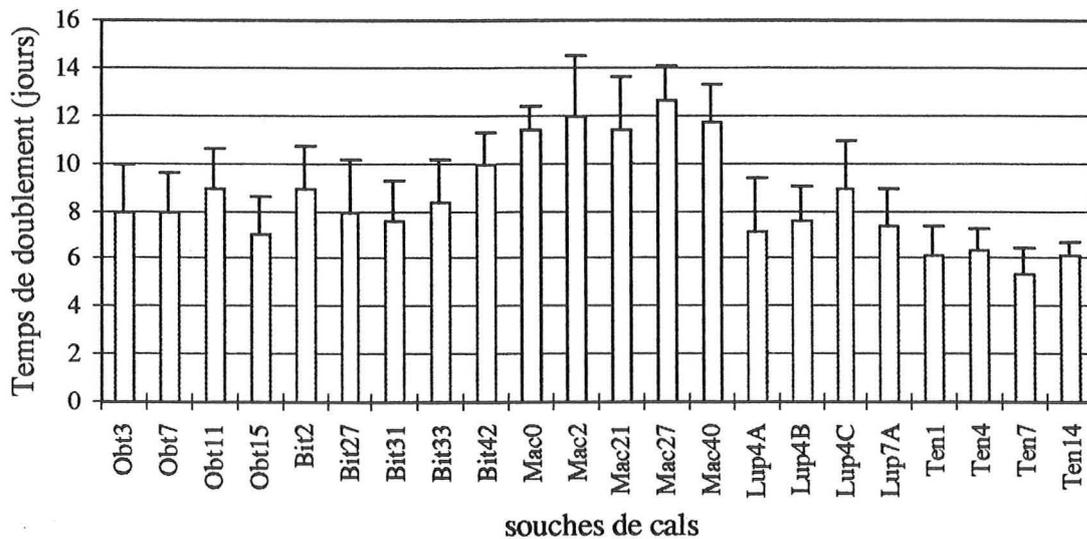


Figure 21. Comparaison des temps de doublement pour des lignées de cals issues de feuilles de *P. obtusifolia* (Obt3, Obt7, Obt11, Obt15), de *P. bituminosa* (Bit2, Bit27, Bit31, Bit33, Bit42), *P. macrostachya* (Mac0, Mac2, Mac21, Mac27, Mac40), *P. lupinellus* (Lup4A, Lup4B, Lup4C, Lup7A) et *P. tenax* (Ten1, Ten4, Ten7, Ten14). Les valeurs représentées sont calculées sur 5 cycles de culture pour chaque lignée. Les barres verticales représentent des écarts types.

Psoralea cinerea compris) sur la figure 20. Nous pouvons constater que 26 cycles de culture ont été nécessaires pour fixer les caractères de production de biomasse des cals issus des cals de Psoralées. Cette période est plus longue que celle calculée pour le soucier de cals de *Psoralea cinerea* seul (21 cycles de culture), ce qui pourrait confirmer l'hypothèse selon laquelle toutes les souches ne sont pas au même point de leur cycle de croissance au moment du repiquage synchrone de l'ensemble du soucier. En effet, les souches issues d'une même espèce de Psoralée n'étant pas strictement identique en terme de cinétique de croissance, des souches issues d'espèces diverses peuvent *a fortiori* présenter des cycles de croissance asynchrones. Rappelons que cette période d'environ 20 mois est cependant toujours inférieure à celle rapportée par Fett-Neto *et al.* (1994) qui indiquent qu'une période de 2 ans, soit 24 mois est nécessaire à la stabilisation des cals provenant de *Taxus cuspidata*.

2.1.2.2. Croissance des souches de cals

La figure 21 représente les temps de doublement de la biomasse pour 4 ou 5 souches provenant de chaque espèce de Psoralée étudiée. La souche Ten7 présente le temps de doublement le plus faible avec 5,4 jours, alors que la souche Mac27 nécessite 11,8 jours pour doubler sa biomasse. Ces données sont plus faibles que celles obtenues pour les lignées de cals issus des divers explants de *Psoralea cinerea*, les temps de doublement variant de 6 à 19 jours pour ces souches. Une analyse de variance effectuée sur le facteur souche indique que les temps de doublement mesurés pour les cals de *Psoralea macrostachya* sont significativement supérieurs à ceux de *Psoralea tenax*. En revanche, aucune différence significative ne peut être mise en évidence pour les temps de doublement de la biomasse des cals issus des autres espèces de Psoralées.

Ces temps de doublement calculés pour les cals issus de 5 nouvelles espèces de Psoralées sont légèrement plus faibles que ceux mesurés pour les cals provenant de *P. cinerea* mais restent cependant supérieurs à ceux répertoriés par Zenk et Deus (1982) pour *Catharanthus roseus* ou par Kato *et al.* (1972) pour *Nicotiana tabacum* (3 jours).

2.1.3. Etude de la production de métabolites secondaires par les cals de Psoralées

Les souches de cals issus de *P. bituminosa*, *P. macrostachya*, *P. obtusifolia* et *P. tenax*, ainsi que les milieux de culture correspondants ont été analysés par CLHP. La daidzéine est identifiée dans toutes les souches nouvellement initiées. Les cals provenant de *Psoralea lupinellus* synthétisent également la daidzéine, cependant seules trois souches ont pu être maintenues. Par conséquent, les chiffres correspondant aux cals provenant de cette espèce n'apparaissent pas dans les figures suivantes.

Tableau 9. Distribution des lignées de cals de 5 espèces de Psoralées par classe de concentration en daidzéine (OBT : *P. obtusifolia* ; MAC : *P. macrostachya* ; TEN : *P. tenax* ; BIT : *P. bituminosa*, CIN. F , CIN. T et CIN. C : Feuilles, Tiges et Cotylédons de *P. cinerea*, respectivement).

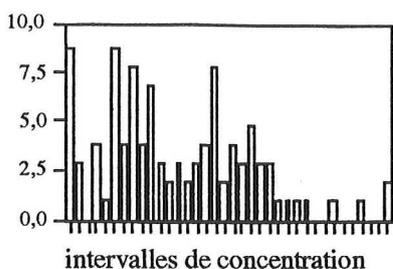
Teneur en daidzéine ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS)	Souches de cals (% de lignées)						
	OBT.	MAC.	TEN.	BIT.	CIN. F	CIN. T	CIN. C
0 - 1660	0	35,7	0	90,5	100	100	100
1660 - 3320	7,1	35,7	55,5	9,5			
3320 - 4980	35,7	28,6	44,5				
4980 - 6640	38,6						
6640 - 8300	21,4						
8300 - 9600	0						
> 9600	7,2						
Nombre total de lignées	17	42	14	40	52	45	7

2.1.3.1. Teneurs en daïdzéine dans la matière sèche

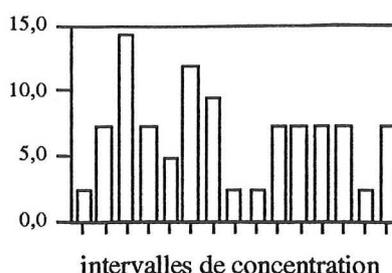
Les teneurs en daïdzéine sont très variables selon l'espèce de *Psoralee* envisagée. Cette variation interspécifique est montrée dans le tableau 9 qui représente la distribution de toutes les lignées de cals (ceux issus de *Psoralea cinerea* compris) en 7 classes de concentration en daïdzéine. Toutes les lignées issues de *Psoralea cinerea* contiennent des teneurs en daïdzéine inférieures à 1660 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS. Quatre-vingt-dix pour cent des cals de *Psoralea bituminosa* présentent des teneurs en daïdzéine analogues. Ces concentrations sont relativement faibles comparées à celles mesurées pour les lignées issues de *Psoralea macrostachya* et *Psoralea tenax*, qui s'élève jusqu'à 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS. Les 17 souches obtenues à partir de *Psoralea obtusifolia* sont distribuées selon 5 classes différentes, de 1660 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS à presque 10000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS.

Il faut noter que l'analyse des cals est réalisée selon deux protocoles différents pour *Psoralea cinerea* d'une part et les autres espèces de *Psoralees* d'autre part. Par conséquent, les teneurs en daïdzéine pour ces deux catégories d'échantillons ne sont pas directement comparables. Cependant, 20% du souchier issu de *Psoralea cinerea* a été analysé à nouveau selon le protocole d'extraction comportant une hydrolyse acide, et aucune des lignées testées ne contient des concentrations en daïdzéine supérieures à 1660 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS.

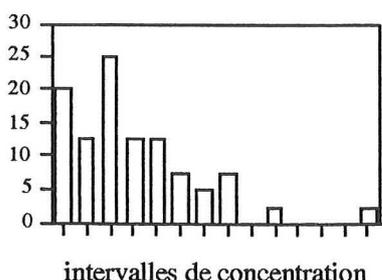
Les teneurs en daïdzéine récoltées dans la matière sèche des souches issues de *P. bituminosa*, *P. macrostachya*, *P. obtusifolia* et *P. tenax* sont supérieures pour certaines d'entre elles à 3000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS, valeur détectée dans les plantes entières de soja qui sont considérées comme une importante source de daïdzéine (Walz, 1931). Ces teneurs sont également très supérieures à celles mesurées dans les fruits mûrs de ces espèces (données non représentées). En effet, les graines de *Psoralea obtusifolia* ne contiennent pas de daïdzéine alors que les souches de cals issues de cette même espèce présentent des teneurs pouvant aller jusqu'à environ 10000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS, démontrant l'impossibilité d'établir une corrélation entre les concentrations en daïdzéine *in vitro* et *in planta*. Les teneurs détectées dans les cals de *P. bituminosa*, *P. macrostachya*, *P. obtusifolia* et *P. tenax* sont en revanche proches de celles récoltées dans les racines transformées de *Psoralees* et qui sont comprises entre 1000 et 8400 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS. Un phénomène intéressant peut être observé si l'on compare les teneurs en daïdzéine dans les cals et les racines transformées issus de *Psoralea obtusifolia*. En effet, si les cals de *Psoralea obtusifolia* synthétisent les quantités maximales de daïdzéine détectées dans les cultures de cals, les racines transformées obtenues à partir de cette même espèce sont parmi celles dont le rendement en daïdzéine est le plus faible (Figure 8). A l'inverse, les racines transformées de *Psoralea cinerea* synthétisent des quantités de daïdzéine proches de 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS alors que les cals issus de cette espèce présentent les teneurs en daïdzéine les plus faibles du souchier. Ces deux espèces étant les deux seules communes aux deux souchiers de cals et de racines transformées, il nous est impossible de vérifier ce phénomène pour les autres espèces de *Psoralees*.



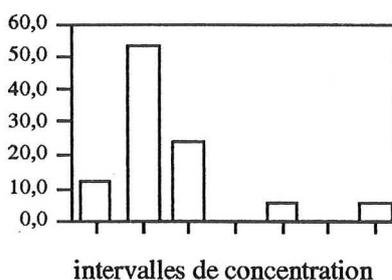
Psoralea cinerea (104 lignées)
 concentration moyenne 174 µg/g MS
 concentration minimale 0 µg/g MS
 concentration maximale 504 µg/g MS
 nombre d'intervalles 36



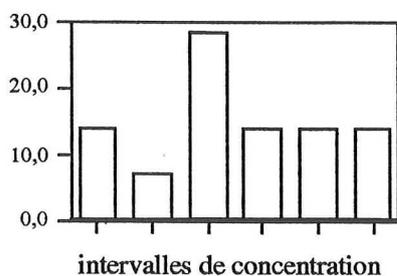
Psoralea macrostachya (42 lignées)
 concentration moyenne 2308 µg/g MS
 concentration minimale 79 µg/g MS
 concentration maximale 4809 µg/g MS
 nombre d'intervalles 15



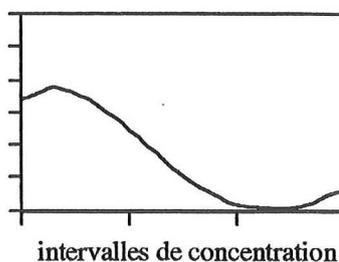
Psoralea bituminosa (40 lignées)
 concentration moyenne 805 µg/g MS
 concentration minimale 82 µg/g MS
 concentration maximale 3112 µg/g MS
 nombre d'intervalles 14



Psoralea obtusifolia (17 lignées)
 concentration moyenne 6072 µg/g MS
 concentration minimale 2050 µg/g MS
 concentration maximale 9680 µg/g MS
 nombre d'intervalles 7



Psoralea tenax (14 lignées)
 concentration moyenne 3170 µg/g MS
 concentration minimale 1727 µg/g MS
 concentration maximale 4702 µg/g MS
 nombre d'intervalles 6



Courbe modèle de la fréquence de distribution des lignées de cals par intervalle de concentration en daidzéine. Cette courbe est obtenue à partir de l'histogramme de *Psoralea bituminosa* avec un modèle polynomial de degré 4 ($R^2=0,839$)

Figure 22. Fréquence de distribution des lignées de cals issus de 5 espèces de Psoralées par classe de concentration en daidzéine. Le nombre d'intervalles est déterminé par la formule de Sturge : $1+(3,3\log n)$, où n est le nombre de cal par espèce de Psoralée.

Nous avons représenté les fréquences de distribution des échantillons de cals selon leur concentration en daidzéine, pour chaque espèce de *Psoralée* (Figure 22). Bien que les teneurs maximales soient spécifiques pour chaque espèce, les fréquences de distribution ont une allure commune, représentée dans la courbe modèle. Pour chaque espèce, la majorité des lignées est regroupée autour de concentrations faibles en daidzéine. Néanmoins, la déviation standard est importante (de 26% à 80% par rapport à la moyenne respectivement pour *Psoralea tenax* et *Psoralea bituminosa*). Cette forte déviation permet de mettre en évidence des lignées hyperproductrices, même lorsque l'espèce envisagée est représentée seulement par un faible nombre de lignées. C'est le cas pour l'espèce *Psoralea obtusifolia* à partir de laquelle seules 17 lignées sont établies, mais dont les teneurs moyennes en daidzéine sont de $6072 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS avec une concentration maximale de $9680 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS pour 7,2% d'entre elles.

2.1.3.2. Teneurs en daidzéine dans les milieux de culture

Les milieux de culture de 6 souches de *P. obtusifolia*, 12 souches de *P. macrostachya*, 7 souches de *P. tenax*, et 20 souches de *P. bituminosa* ont été extraits à l'eau bouillante et par hydrolyse à l'acide sulfurique concentré dans le but de déterminer la présence de daidzéine. Quel que soit le protocole d'extraction envisagé, nous n'avons pas pu détecter de daidzéine. Ce métabolite n'est donc pas excrété dans le milieu dans nos conditions de culture. Ce résultat est analogue à celui précédemment obtenu pour les souches de cals issus de *Psoralea cinerea*. De très nombreux métabolites secondaires synthétisés dans la matière sèche ne sont pas excrétés dans le milieu de culture, mais stockés dans les vacuoles, au niveau de la cellule. Moreno *et al.* (1995) ainsi que Cresswell *et al.* (1989) indiquent que l'augmentation des teneurs en métabolites secondaires dans les milieux de culture résulte souvent d'une diminution du pH du milieu de culture, qui conduit à une perméabilisation de la membrane cellulaire. Par conséquent, il est possible que le pH des milieux de culture des cals de *Psoralées* après 21 jours soit encore trop élevé pour observer ce phénomène.

2.1.3.3. Autres métabolites secondaires

Le coumestrol a pu être mis en évidence dans la matière sèche des lignées issues de plusieurs espèces de *Psoralées*. Les souches *P. obtusifolia*, *P. macrostachya*, *P. lupinellus* et *P. bituminosa* ne produisent ce métabolite secondaire qu'en très faible quantité, de l'ordre de quelques $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de MS. En revanche, les lignées issues de *Psoralea tenax* présentent des teneurs en coumestrol comprises entre 0 et $756 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS (Tableau 10). Les cals issus des espèces de *Psoralées* que nous avons mises en culture diffèrent donc des lignées issues de *Psoralea cinerea* qui ne produisent pas de coumestrol, quel que soit l'explant d'origine.

Tableau 10. Teneurs en coumestrol dans les souches de cals issus de *Psoralea tenax*.

Souche	Teneur en coumestrol ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS)
Ten1	452 \pm 57
Ten2	745 \pm 81
Ten4	756 \pm 87
Ten5	487 \pm 61
Ten7	398 \pm 48
Ten8	0
Ten9	479 \pm 63
Ten11	371 \pm 45
Ten14	258 \pm 39

Les cals issus de *Psoralea obtusifolia* produisent en outre de la génistéine, molécule déjà identifiée dans les cultures de cals de *Psoralea cinerea* cultivés en présence de *p*-coumarate. Les teneurs sont variables selon la souche, comprises entre 50 et 350 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS.

Dans les milieux de culture correspondant aux espèces de *Psoralea* que nous avons mises en culture, aucune trace de coumestrol n'a pu être décelée. Cette molécule ne semble donc pas être excrétée dans nos conditions de culture.

La mise en culture d'explants foliaires de P. bituminosa, P. macrostachya, P. lupinellus, P. obtusifolia et P. tenax sur milieu Z nous a permis d'obtenir de nouvelles souches de cals. Les concentrations de 9 μM de 2,4.D. et 9,3 μM de kinétine, déterminées pour la croissance des souches issues de Psoralea cinerea sont conservées pour le développement des lignées provenant de P. lupinellus, P. obtusifolia et P. tenax, alors qu'une balance constituée de 2 μM de 2,4.D. et 2 μM de kinétine semble la plus appropriée pour la croissance des souches issues de Psoralea bituminosa et Psoralea macrostachya. L'étude du soucier dans sa totalité montre qu'une période de 78 semaines est nécessaire à la stabilisation des paramètres de croissance : vitesse de croissance, longueurs de la phase de latence et de la phase exponentielle. Les temps de doublement de la biomasse varient de 5,4 à 12,6 jours, les valeurs mesurées pour P. tenax étant statistiquement inférieures à celles de P. macrostachya.

La production de daidzéine subit des variations à la fois inter- et intraspécifiques. Les fréquences de distribution de la daidzéine par classe de concentration révèlent cependant un profil commun, avec de nombreuses souches groupées autour de teneurs assez faibles et un certain nombre de souches hyperproductrices. Parmi toutes les lignées analysées, l'espèce P. obtusifolia est la plus riche en daidzéine (plus de 9600 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS pour une souche), suivie par ordre décroissant des concentrations par P. tenax et P. macrostachya. L'espèce P. bituminosa semble plus proche des teneurs détectées dans les cals de Psoralea cinerea avec des concentrations en daidzéine inférieures à 1600 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS pour 36 souches sur 40. Le coumestrol est détecté à des concentrations inférieures à 800 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS dans les lignées issues de Psoralea tenax. Des traces de ce métabolite sont également décelées dans les souches provenant des autres espèces étudiées. La génistéine est également identifiée dans les cals de Psoralea obtusifolia à des teneurs comprises entre 50 et 350 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS.

Ni daidzéine ni coumestrol ne sont détectés dans les milieux de culture des cals dans nos conditions de culture.

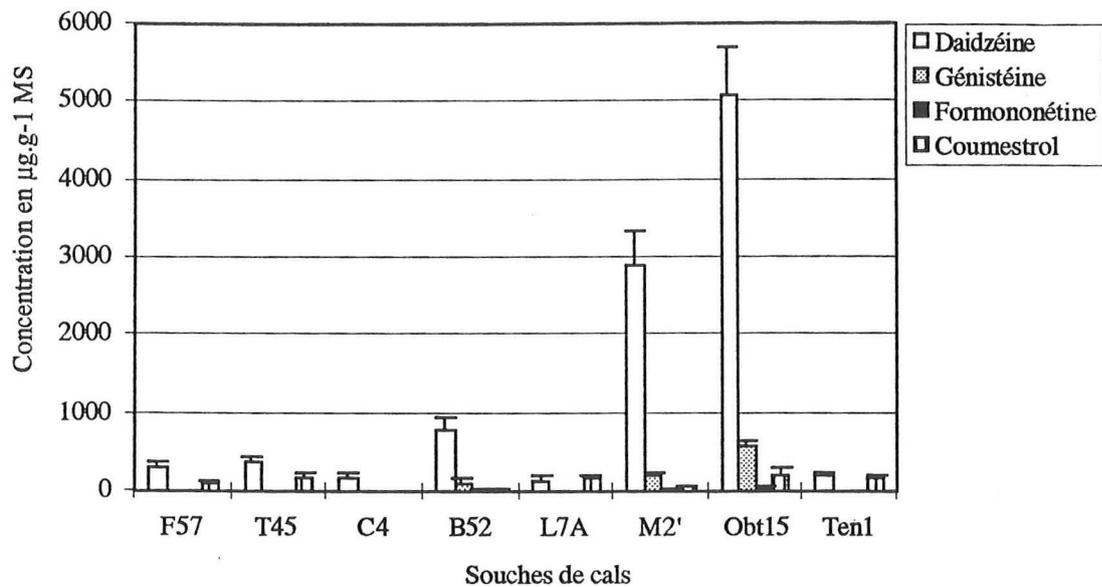


Figure 23. Influence de la durée du cycle de culture sur la production de métabolites secondaires par des cultures de cals de Psoralées. Souches F57, T45, C4 : *P. cinerea* ; B52 : *P. bituminosa* ; L7A : *P. lupinellus* ; M2' : *P. macrostachya* ; Obt 15 : *P. obtusifolia* ; Ten1 : *P. tenax*. Les barres verticales représentent des écarts types.

2.2. Influence des paramètres de culture sur la production de métabolites secondaires par les cals de *Psoralées*

2.2.1. Influence de la durée de culture

Dans le cadre de cette première expérimentation, les cals qui sont normalement repiqués tous les 21 jours ont été cultivés sur leurs milieux de cultures respectifs durant 60 jours. Les résultats du dosage des métabolites secondaires effectué sur la matière sèche récoltée à l'issue de cette période sont indiqués sur la figure 23.

L'analyse CLHP nous a permis de mettre en évidence plusieurs faits. D'une part, la formononétine, métabolite de la famille chimique des isoflavonoïdes est identifiée dans les souches issues de *Psoralea bituminosa*, *Psoralea macrostachya*, *Psoralea lupinellus* et *Psoralea obtusifolia*, à des concentrations faibles comprises entre 1 et 36 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS pour *P. lupinellus* et *P. obtusifolia*, respectivement. Aucune trace de ce métabolite n'a pu être détectée dans les cals issus de *Psoralea cinerea* et *Psoralea tenax*. D'autre part, la génistéine, identifiée dans le cadre de l'expérimentation sur les cals de *Psoralea cinerea* cultivés sur milieux enrichis en *p*-coumarate est également présente dans les cals de *P. bituminosa*, *P. macrostachya* et *P. obtusifolia* après 60 jours de culture. La concentration maximale est retrouvée dans la matière sèche de la souche Obt15 qui contient 570 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS de génistéine.

Par ailleurs, toutes les souches de cals analysées synthétisent de la daidzéine et du coumestrol, la daidzéine étant la molécule majoritairement récoltée. Les proportions dans lesquelles la daidzéine est quantifiée sont analogues à celles détectées dans la matière sèche de ces mêmes espèces à l'issue d'un cycle de culture de 21 jours. En effet, les lignées dérivant de *Psoralea cinerea* présentent des teneurs en daidzéine inférieures à 1660 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS ainsi que celles issues de *P. lupinellus*, *P. bituminosa* et *P. tenax*. La concentration détectée dans la souche M2' est de 2890 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS, ce qui correspond à la classe de concentration à laquelle appartiennent 35,7% des cals issus de *Psoralea macrostachya* (Tableau 9). La souche Obt15 présente une teneur en daidzéine de 5091 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS, valeur appartenant à la classe de concentration regroupant 38,6% des souches provenant de *Psoralea obtusifolia*, à l'issue d'un cycle de culture de 21 jours. Nous pouvons noter que le coumestrol est détecté dans les souches de cals issus de *Psoralea cinerea*, ce qui n'était pas mis en évidence dans les cultures de 21 jours seulement.

Par conséquent, il apparaît que si les teneurs en métabolites secondaires ne sont pas améliorées par un cycle de 60 jours de culture, des modifications qualitatives ont lieu, avec l'apparition dans la matière sèche de nouvelles molécules appartenant à la famille chimique des isoflavonoïdes. Le fait de détecter de nouvelles molécules à l'issue d'un cycle de culture dont la durée est triplée par rapport au cycle témoin dénote le caractère modulable du métabolisme secondaire selon les conditions de culture. Il est en effet probable que la synthèse de ces molécules non détectées lors d'un cycle de 21 jours traduise une régulation différente des voies

de biosynthèse en fonction des facteurs qui sont modifiés. Ainsi, l'appauvrissement du milieu de culture, la modification de la balance hormonale ou des rapports de concentration entre différents éléments pourraient conduire à l'accumulation de métabolites intermédiaires et à leur réorientation dans les voies de biosynthèse secondaires. Il faut en effet noter que la génistéine est issue du *p*-coumaroyl-CoA, tout comme la daïdzéine. La formononétine est quant à elle le métabolite qui suit immédiatement la daïdzéine dans la voie métabolique des isoflavonoïdes (Figure 5). Par ailleurs, nous observons que les teneurs en métabolites secondaires ne sont pas améliorées en augmentant la durée du cycle de culture. Pourtant, de nombreux auteurs indiquent que la production de métabolites secondaires a lieu pendant la phase stationnaire du cycle de croissance (Cresswell *et al.*, 1989 ; Kakegawa *et al.*, 1995). En prolongeant le cycle de culture, la durée de la phase stationnaire est allongée et nous pourrions par conséquent nous attendre à une amélioration des rendements en daïdzéine. Les résultats que nous obtenons ne s'accordent donc pas avec cette constatation.

L'analyse des milieux de culture ne révèle la présence d'aucune trace des métabolites dosés dans la matière sèche.

2.2.2. Influence de la composition du milieu de culture

Deux expérimentations ont été mises en place pour tester l'importance de la composition du milieu de culture sur la production de métabolites secondaires par les cals du souchier issus de diverses espèces de *Psoralées*. La première, réalisée sur les cals provenant de l'espèce *Psoralea cinerea* a pour objectif de déterminer l'influence de l'addition de composés éliciteurs et de l'hormone 2,4.D. La seconde expérience ne porte que sur les cals de l'espèce *Psoralea obtusifolia*, que nous avons déterminée comme étant la plus productrice pour la molécule de daïdzéine. Le but de cette seconde expérimentation est de tester l'influence de la nutrition azotée et phosphatée sur la production de daïdzéine.

2.2.2.1. Influence de l'addition d'éliciteurs et de la balance hormonale

Quatre souches issues de *Psoralea cinerea* ont été cultivées sur des milieux complémentés en sulfate de cuivre (2 concentrations), en chitosane (éliciteur biotique), ou modifiés au niveau de la balance hormonale. Cette expérience préliminaire est réalisée dans le but de déterminer l'influence de ces modifications sur la production de biomasse ainsi que sur la production en métabolites secondaires.

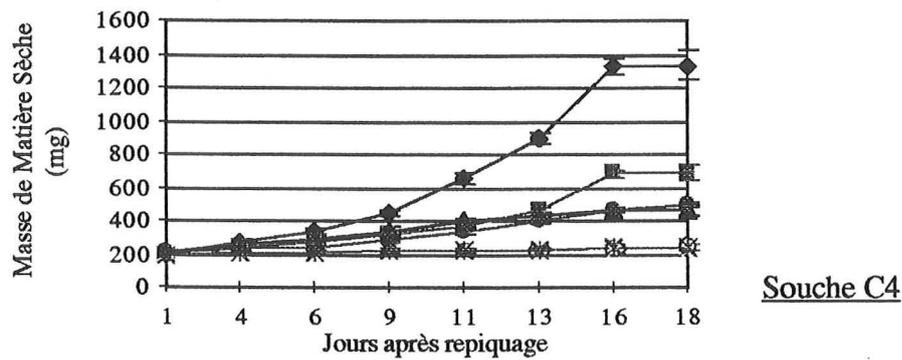
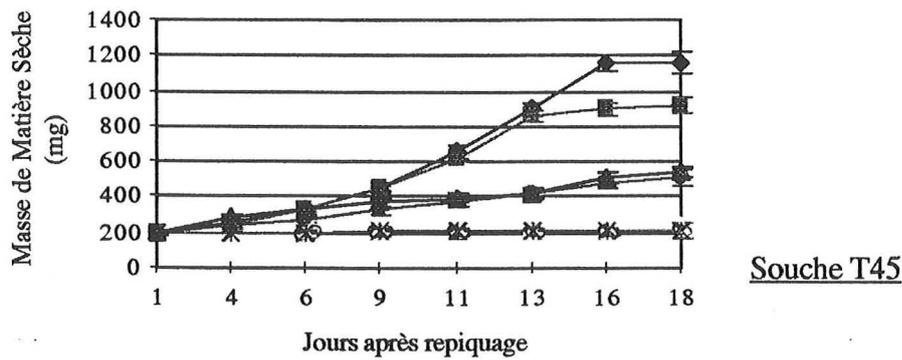
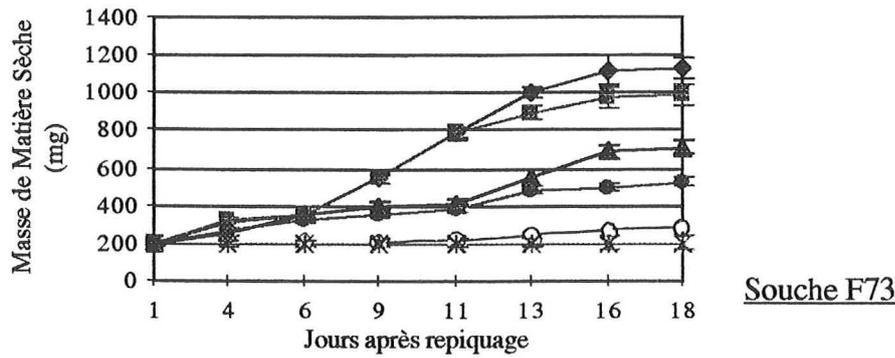
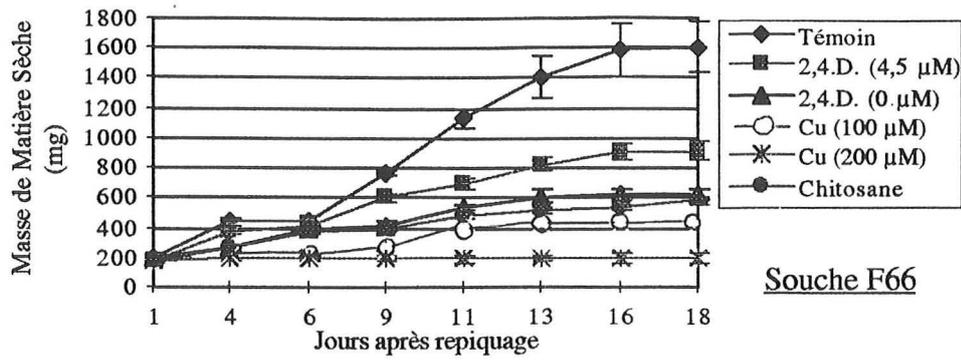


Figure 24. Cinétique de production de biomasse par 4 souches de cals issus de *Psoralea cinerea* cultivées sur 5 milieux Z modifiés. Les barres verticales représentent des écarts types.

2.2.2.1.1. Influence sur la production de biomasse

La figure 24 représente les cinétiques de croissance de F66, F73, T45 et C4 cultivées durant 21 jours sur les milieux modifiés. Nous constatons que, quelle que soit la souche envisagée, les traitements appliqués aux cals ont un effet négatif sur la production de biomasse. Ce phénomène est particulièrement visible à partir du 6^{ème} jour de culture, au début de la phase exponentielle. Par ailleurs, toutes les souches testées se comportent de façon analogue en réponse au traitement. Ainsi, le classement des traitements par ordre de toxicité est identique, quelle que soit la souche de cal.

La diminution de la quantité de 2,4.D. apportée par un facteur 2 est le traitement le moins inhibiteur pour la croissance, suivi par le traitement ne contenant pas de 2,4.D. Ceci témoigne encore une fois du caractère indispensable de cette hormone de croissance pour la culture de cals de *Psoralées*.

L'addition de chitosane dans le milieu de culture diminue la production de biomasse dans des proportions semblables à celles du traitement sans 2,4.D., excepté pour la souche F73 qui est plus sensible à la présence de chitosane qu'à l'absence de 2,4.D. La biomasse est multipliée par un facteur 2,5 à 3 au cours du cycle de culture dans le cas du traitement chitosane, soit 2 à 3 fois moins que dans le traitement témoin. Nous avons pu également remarquer que la présence de chitosane dans le milieu de culture a une incidence sur la qualité des cals. En effet, dès le 6^{ème} jour de culture, les cals qui subissent ce traitement prennent une couleur marron. Par conséquent, si les milieux de culture déficient en 2,4.D. sont moins adéquats pour la croissance des cals de *Psoralées*, il semble que le chitosane soit pour sa part toxique, puisqu'il altère non seulement la production de biomasse, mais également sa qualité.

L'application de sulfate de cuivre dans les milieux de culture provoque un très fort ralentissement voire une complète inhibition de la croissance des lignées de cals. A une dose de 100 μM , les cals noircissent et leur croissance est très limitée pour 3 souches sur les 4 testées. La souche F66 parvient cependant à doubler sa biomasse sur le milieu de culture enrichi en sulfate de cuivre à 100 μM . La dose de 200 μM de sulfate de cuivre inhibe totalement la croissance des cals qui noircissent dès le 4^{ème} jour de culture. Le cuivre est donc un élément particulièrement toxique pour les cals de *Psoralées*, phénomène souvent relaté dans la littérature pour d'autres espèces de plantes.

Les cals issus des traitements 2,4.D. à 4,5 et 0 μM ainsi que du traitement chitosane ont été repiqués et cultivés à nouveau pendant 21 jours dans les mêmes conditions. Toutes les souches se sont nécrosées dès le 11^{ème} jour de culture, exceptées les lignées cultivées sur milieu complétement par 4,5 μM de 2,4.D. qui croissent cependant très peu et brunissent. Par conséquent, les conditions de culture du traitement témoin ne semblent pas pouvoir être modifiées selon les modalités que nous avons appliquées aux souches de *Psoralea cinerea* testées. Par ailleurs, la culture sur milieu appauvri en 2,4.D. ne peut être envisagée sans

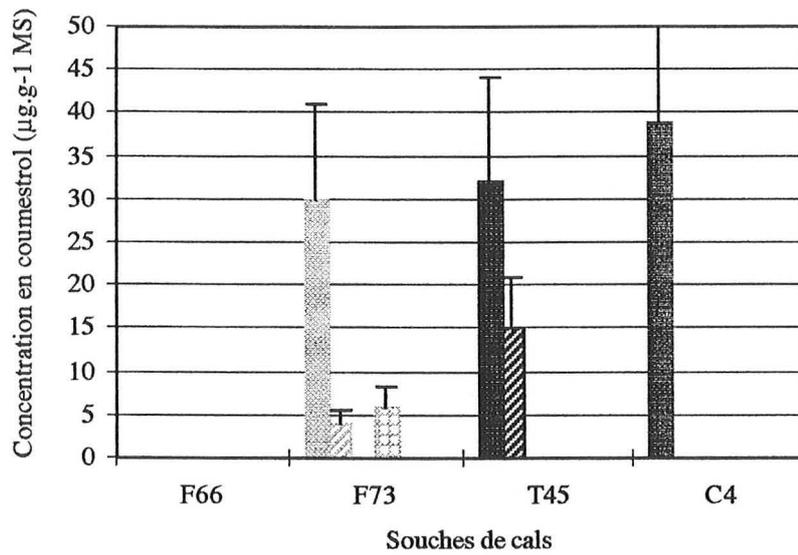
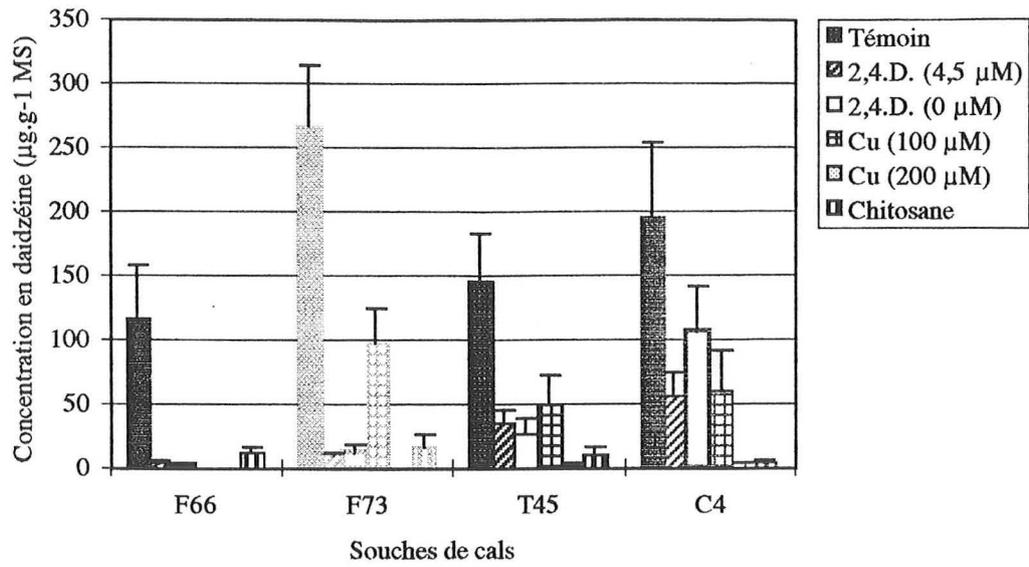


Figure 25. Production d'isoflavonoïdes par 4 souches de cals issues de *Psoralea cinerea* cultivées sur un milieu témoin et 5 milieux modifiés. Les barres verticales représentent des écarts types.

dommage que sur un cycle de culture, sans doute parce que les effets bénéfiques de cette hormone persistent du premier cycle de culture au suivant.

2.2.2.1.2. Influence sur la production de métabolites secondaires

Deux métabolites secondaires sont détectés dans les cultures de cals sur milieux modifiés : la daidzéine et le coumestrol (Figure 25). Les traitements témoins présentent les teneurs les plus élevées par rapport aux 5 autres traitements, et ce, quelle que soit la souche envisagée. Les modifications de la composition des milieux de culture que nous avons mises en place dans le but d'améliorer la production de métabolites secondaires sont donc inefficaces et même dommageables pour les rendements.

Les concentrations en daidzéine récoltées dans la matière sèche des témoins sont comparables à celles détectées dans le souchier, ce qui confirme un effet négatif des modifications apportées aux milieux et non des conditions de culture. Le traitement au sulfate de cuivre à une concentration de 200 μM est le plus inhibiteur, les 4 autres traitements ayant une action différente selon la souche et le métabolite secondaire envisagés.

En ce qui concerne le coumestrol, nous pouvons noter que ce métabolite est détecté dans les traitements témoins de 3 souches sur les 4 testées, alors qu'aucune trace de cette molécule n'a pu être détectée dans ces souches lors du dosage du souchier. Il faut toutefois noter que les teneurs récoltées sont faibles, comprises entre 30 et 38 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MS pour les cals qui en synthétisent. Les conditions de synthèse du coumestrol semblent liées à un ou plusieurs phénomènes que nos conditions de culture ne nous permettent pas de maîtriser.

L'addition de chitosane ou de sulfate de cuivre à des concentrations de 100 ou 200 μM a un effet négatif à la fois sur la croissance des cals et leur production en métabolites secondaires. Ce résultat semble surprenant par rapport à ceux rapportés dans la littérature. En effet, l'addition de chitosane est réalisée par de nombreux auteurs pour améliorer les rendements en métabolites secondaires. Ainsi, Hadwiger *et al.* (1994) l'utilisent pour produire la pisatine par des cultures de *Pisum sativum*, Dörnenburg et Knorr (1996b) rapportent son utilisation pour la synthèse de lignine par *Vanilla planifolia* et Hahlbrock et Scheel (1989) indiquent son effet éliciteur sur la production de bergaptène et de xanthotoxine par des suspensions cellulaires de *Petroselinum crispum*. L'action élicitrice de cette molécule est liée à l'activation de la Phénylalanine Ammonia-Lyase (Notsu *et al.*, 1994). Les cals de Psoralées ne semblent pas être sensibles à cette molécule dans nos conditions de culture.

En ce qui concerne l'addition de sulfate de cuivre, son utilisation est rapportée par Whitehead (1988) pour la production de rishitine par *Datura stramonium*. L'effet éliciteur de cette molécule n'est cependant pas détectable dans le cas des souches de Psoralées. Il est probable que la toxicité marquée de ce composé soit responsable de ce phénomène. Les cals se sont en effet

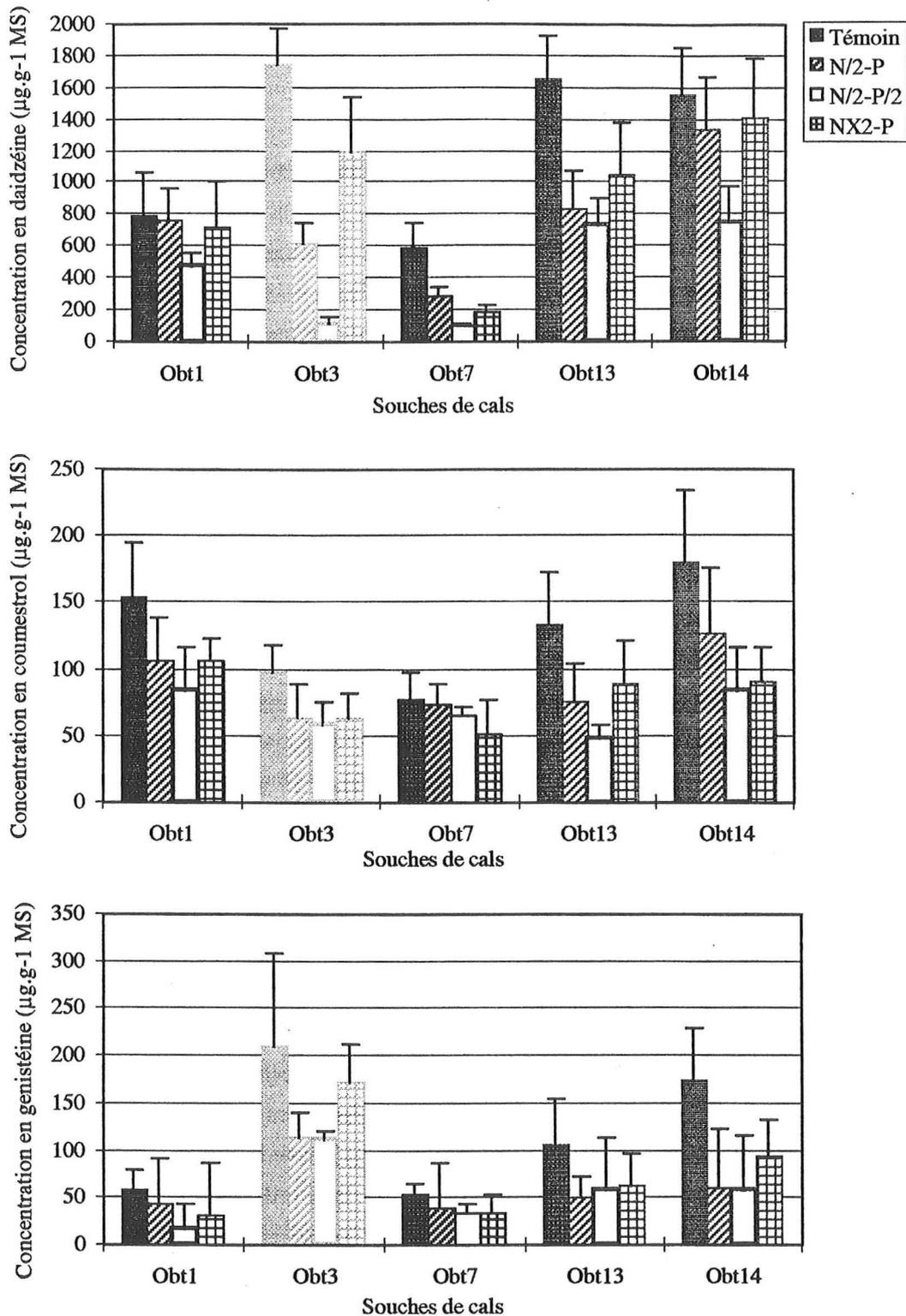


Figure 26. Production d'isoflavonoïdes par des souches de cals issues de *Psoralea obtusifolia* cultivées sur un milieu témoin et 3 milieux modifiés. N/2-P : concentration en azote divisée par 2-concentration en phosphate identique au témoin ; N/2-P/2 : concentration en azote et phosphate divisée par 2 par rapport au témoin ; NX2-P : concentration en azote multipliée par 2- concentration en phosphate identique au témoin. Les barres verticales représentent des écarts types.

nécrosés très rapidement, d'où un arrêt des voies métaboliques, qu'elles soient primaire ou secondaire.

Une diminution de la dose de 2,4.D. par un facteur 2 ou sa suppression du milieu de culture provoquent également des diminutions de rendement au niveau de la biomasse et inhibent en partie la synthèse de daidzéine et de coumestrol dans la matière sèche des cals issus de *Psoralea cinerea*. Pourtant, l'application de 2,4.D., recommandée pour la croissance des cals, a très souvent un rôle inhibiteur sur la production de métabolites secondaires (Meyer et Van Staden, 1995 ; Mori *et al.*, 1994b, Takihara-Matsuura *et al.*, 1994). En réduisant cet apport, nous nous attendions par conséquent à obtenir une amélioration des rendements en daidzéine, non constatée à l'issue de l'expérimentation.

Les modifications que nous avons apportées aux milieux de culture des cals de *Psoralea cinerea* n'ayant pas conduit aux résultats escomptés, nous avons décidé de ne pas étendre cette expérimentation aux souches de cals provenant d'autres espèces de *Psoralées*.

2.2.2.2. Influence de la nutrition azotée et phosphatée sur la production de métabolites secondaires par des cals de *Psoralea obtusifolia*

Cette dernière expérimentation est menée sur des souches de cals issus de *Psoralea obtusifolia*, les lignées provenant de cette espèce présentant les teneurs en daidzéine les plus élevées. Cinq souches choisies au hasard ont été cultivées sur 4 milieux différents, dont les teneurs en azote et phosphate sont modifiées. En ce qui concerne l'azote, les modifications apportées sont uniquement quantitatives, le rapport entre ions nitrate et ammonium ayant été conservé. A l'issue d'un cycle de culture de 21 jours, nous avons pu observer que la croissance des souches cultivées sur milieux modifiés n'était pas différente de celle des souches cultivées sur milieu témoin.

Les résultats des dosages CLHP sont indiqués sur la figure 26. Trois molécules sont identifiées dans la matière sèche des cals analysés : la daidzéine, la génistéine et le coumestrol. Ces 3 métabolites secondaires ont déjà été identifiés lors du dosage de l'ensemble des cals du souchier, dans des concentrations équivalentes à celles mesurées pour les traitements.

Si les différentes souches de *Psoralea obtusifolia* présentent des teneurs en métabolites variables, l'effet des traitements sur la production des métabolites secondaires est identique. En effet, les traitements ont tous soit un effet négatif, soit aucun effet sur la production de daidzéine, génistéine et coumestrol. Ainsi, les traitements pour lesquels la concentration en phosphate n'a pas été modifiée (N/2-P et Nx2-P) sont statiquement identiques et n'ont pas d'incidence ou une incidence négative sur la production des 3 métabolites recueillis dans la matière sèche des souches issues de *Psoralea obtusifolia*. En revanche, le traitement N/2-P/2 est

systématiquement différent du traitement témoin et conduit à des teneurs en daïdzéine, génistéine et coumestrol statistiquement inférieures à celles du témoin.

L'enrichissement du milieu de culture en azote conduit à une diminution des teneurs en métabolites secondaires. Ce phénomène est très souvent décrit pour les isoflavonoïdes chez les Légumineuses. Ainsi, sur le soja inoculé par *Bradyrhizobium japonicum*, la présence d'azote dans le milieu entraîne une diminution du contenu en isoflavonoïdes dans les racines (Cho et Harper 1991 ; Morandi et Le Quere, 1991). Coronado *et al.* (1995) ont montré que ce phénomène est lié à la régulation par les ions nitrates de la synthèse des flavonoïdes au niveau de l'expression génique. Les résultats que nous obtenons en divisant par deux la concentration en azote sont au contraire surprenants. Cependant, Zhong *et al.* (1996) indiquent que pour *Panax quinquefolium*, les teneurs en azote et la production de saponine sont positivement corrélées. Les cals de Psoralées auraient par conséquent un comportement plus proche d'autres familles que de celle des Légumineuses dont ils font pourtant partie.

Les résultats obtenus dans le traitement N/2-P/2 sont également surprenant. En effet, il est clairement établi par de nombreux auteurs, que l'accroissement des teneurs en ions phosphate provoque une stimulation du métabolisme primaire, et en conséquence, une diminution de l'activité métabolique secondaire (Dedaldechamp *et al.*, 1995 ; Moreno *et al.*, 1995). Par conséquent, une diminution des teneurs en phosphate dans le milieu de culture aurait pu nous conduire à une amélioration des rendements en daïdzéine. Or nous observons l'effet opposé. Ce principe n'est donc pas applicable dans le cas des cals de Psoralées dans nos conditions de culture. Par ailleurs, il arrive que croissance et biosynthèse de métabolites secondaires soient positivement corrélées (Sakuta *et al.*, 1986). Par conséquent, la chute de la production de daïdzéine pourrait également être liée à une croissance plus faible. La production de biomasse n'étant pas différente de celle du témoin dans le cas de ce traitement, cette explication est également inadéquate.

D'après l'étude de ces résultats, il apparaît que la diminution de la teneur en azote ou phosphate du milieu de culture des cals de *Psoralea obtusifolia* ne permette pas d'améliorer les rendements en métabolites secondaires, mais au contraire les diminue. Les ions phosphates semblent par ailleurs avoir une action plus marquée que l'azote.

CONCLUSION

L'établissement de lignées de cals issus de 5 espèces de Psoralées différentes de *Psoralea cinerea* nous a permis d'élargir la variabilité génétique au niveau du souchier. Après évaluation de la stabilité génétique des nouvelles souches, nous avons entrepris d'analyser la production en

métabolites secondaires. Deux nouveaux métabolites de la famille des isoflavonoïdes sont mis en évidence, la génistéine et la formononétine.

L'analyse du soucier a également permis de montrer la grande variabilité en terme de rendements en métabolites secondaires pour des cals pourtant issus d'une même espèce. Ainsi, les teneurs en daïdzéine sont comprises entre 2050 et 9680 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS dans les cals de *Psoralea obtusifolia*, ce qui fait de cette espèce une source potentielle pour la production de ce métabolite secondaire à plus grande échelle. Les tentatives d'amélioration de la production de daïdzéine que nous avons menées se sont soldées par des échecs. Les traitements, choisis d'après la bibliographie, s'avèrent inefficaces voire dommageables sur la production de biomasse et les rendements en métabolites secondaires. La régulation de la voie de biosynthèse qui conduit aux isoflavonoïdes semble donc très complexe et sensible à des facteurs apparemment plus spécifiques aux *Psoralées*. D'autres traitements seront cependant à tester (pour mémoire, consulter la bibliographie, tableau 5), l'intérêt étant justifié par les très fortes teneurs récoltées dans certaines souches hyperproductives de *Psoralea obtusifolia*. En cas de résultats prometteurs, le passage par une étape de production par des suspensions cellulaires sera indispensable et nécessitera sans doute de nouvelles mises au point pour améliorer les rendements en daïdzéine. Au contraire, si les traitements éliciteurs s'avèrent inefficaces, une étude de la voie de biosynthèse pourrait être particulièrement intéressante en vue de déterminer les particularités des *Psoralées* qui font que les cultures *in vitro* résultant de ces espèces présentent une régulation apparemment spécifique du métabolisme des phénylpropanoïdes.

CHAPITRE 3

*Etude de la production d'isoflavonoides par des racines
transformées de Psoralées*

INTRODUCTION

L'analyse du soucier de racines transformées établies par Nguyen en 1992 a révélé la présence de daïdzéine et de coumestrol dans la matière sèche. Les teneurs en daïdzéine sont variables selon l'espèce de Psoralée, et comprises entre 1000 et 8400 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MS. Ces concentrations élevées sont détectées dans le soucier cultivé à l'obscurité sans être soumis à des conditions particulières et sont, par conséquent, susceptibles d'être améliorées par modification des paramètres de culture. Dans cet objectif, nous avons entrepris d'étudier de façon plus approfondie la croissance et la production de métabolites secondaires de la souche RTLach5, issus de la transformation de *Psoralea lachnostachys* par *Agrobacterium rhizogenes* 9402.

Trois critères ont déterminé le choix de cette souche :

- Les souches issues de *Psoralea lachnostachys* sont celles qui, dans le soucier établi, synthétisent les plus fortes quantités de daïdzéine.
- La souche RTLach1, issue elle aussi de la transformation de *Psoralea lachnostachys*, a déjà fait l'objet d'une étude poussée par Nguyen *et al.* (1992), mettant ainsi à notre disposition des données utiles relatives à la production de biomasse par cette culture.
- La souche RTLach5 n'est pas la souche la plus productive parmi les souches issues de *Psoralea lachnostachys*, ce qui sous-entend l'existence d'un potentiel de production supérieur, que nous tenterons de mettre en évidence par des modifications des paramètres de culture.

1- MATERIEL ET METHODES

1.1. Matériel végétal

La souche RTLach5 (Photo 3) est issue de la transformation par *Agrobacterium rhizogenes* 9402 de plantules de *Psoralea lachnostachys* (cf 1.2.1.1.1., chapitre 1).

1.2. Entretien de la souche RTLach5

La souche RTLach5 est maintenue en boîte de Pétri sur du milieu B5 solide (Gamborg *et al.*, 1968) non supplémenté en hormones de croissance (cf 1.2.1.1.2., chapitre 1).

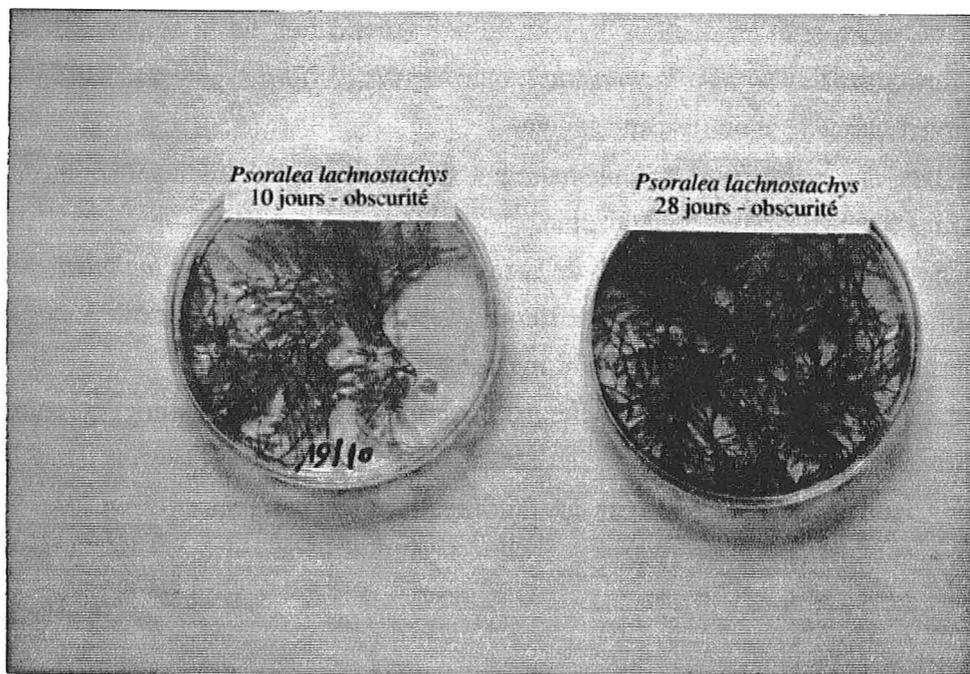


Photo 3. Aspect morphologique de la souche RTLach5 cultivée sur milieu B5 solide (Gamborg *et al.*, 1968), à l'obscurité.

1.3. Expérimentations

1.3.1. Culture en milieu liquide

Toutes les expérimentations sont menées en milieu liquide pour faciliter la récolte de la matière sèche et du milieu de culture.

Les cultures en milieu liquide sont conduites dans des fioles de type Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu de culture, sans régulateur de croissance. L'inoculum de départ est constitué de 3 apex d'environ 2 cm de longueur, prélevés à partir d'une préculture liquide de 14 jours, en phase exponentielle de croissance.

Les fioles Erlenmeyer sont ensuite enveloppées dans du papier aluminium dans le but d'obtenir l'obscurité complète avant d'être placées sur une table d'agitation orbitale (100 révolutions.min⁻¹), à 25°C.

1.3.2. Cinétique de production de la souche RTLach5

Trente-trois fioles Erlenmeyers sont mises en culture selon les conditions précisées ci-dessus (1.3.1.). Trois fois par semaine, un échantillon constitué de 3 fioles est prélevé à heure fixe. La matière fraîche est récoltée, rincée à l'eau distillée et séchée, puis congelée à l'azote liquide avant d'être lyophilisée puis pesée sur une balance de précision. Les milieux de culture sont prélevés, à raison d'un aliquote de 10 ml par fiole. Ces milieux sont filtrés sur un filtre de nitrocellulose de porosité 0,45 µm avant d'être analysés. En cas d'analyse différée dans le temps, les milieux sont récoltés et congelés à -30°C. L'étape de filtration est réalisée juste avant l'analyse par CLHP.

1.3.3. Etude de la production d'isoflavonoïdes par compartiment racinaire

Quarante-cinq Erlenmeyers sont utilisés dans le cadre de cette expérimentation. Mises en culture dans les conditions précisées dans le paragraphe 1.3.1., les racines sont récoltées à raison de 3 fioles par jour, durant 15 jours. Nous mesurons sur chaque explant des données de types morphologiques :

- la longueur de la racine principale
- la longueur des racines d'ordre 2
- le nombre d'ébauches des racines d'ordre 2
- le nombre de racines d'ordre 2

Ces mesures une fois réalisées, et lorsque la taille des différents explants le permet, les racines sont séparées en deux compartiments : racines principales et apex, puis traitées selon le protocole décrit dans le paragraphe 1.3.2. avant d'être analysées par CLHP. Les milieux de culture sont également analysés.

1.3.4. Etude de l'influence de la composition du milieu sur la production d'isoflavonoïdes par la souche RTLach5

Deux expérimentations sont mises en place avec pour objectif l'amélioration des teneurs en isoflavonoïdes dans les cultures de RTLach5.

1.3.4.1. Culture de RTLach5 sur milieu Murashige et Skoog (1962)

Nous avons pu constater à plusieurs reprises que le milieu B5 (Gamborg *et al.*, 1968) convient parfaitement au développement de la souche RTLach5 et qu'il est proche des conditions optimales de croissance. Si l'on admet que la production de métabolites secondaires est augmentée en réponse à une contrainte extérieure, la culture de RTLach5 sur un milieu potentiellement moins adéquat pourrait par conséquent conduire à une amélioration des rendements en isoflavonoïdes. C'est dans cet objectif que nous avons envisagé la culture de RTLach5 sur milieu Murashige et Skoog.

Soixante fioles Erlenmeyer sont utilisées pour la mise en culture d'explants de RTLach5, dont 30 contenant le milieu Murashige et Skoog, et 30 contenant le milieu B5 témoin. La mise en culture se déroule selon le protocole précédemment décrit. Tous les 3 jours durant 3 semaines, 3 fioles Erlenmeyer sont prélevées pour chaque traitement afin d'évaluer la croissance et la production de métabolites secondaires dans la matière sèche et les milieux de culture selon le protocole déjà établi.

1.3.4.2. Culture de RTLach5 sur milieu additionné de chitosane

Deux protocoles sont mis au point pour déterminer l'influence de l'ajout de chitosane dans le milieu de culture sur la croissance et la production de métabolites secondaires par la souche RTLach5. Nous avons appliqué lors des 2 traitements une dose identique de 30 mg.l⁻¹ de chitosane à haut poids moléculaire, dès le début de la culture pour le premier traitement, et après une période de 3 semaines dans le cas de la seconde expérience.

1.3.4.2.1. Addition de chitosane au premier jour de culture

Soixante fioles Erlenmeyer sont utilisées pour la mise en culture d'explants de RTLach5, dont 30 contenant le milieu B5 supplémenté avec 30 mg.l⁻¹ de chitosane, et 30 contenant le milieu B5 témoin. La mise en culture se déroule selon le protocole précédemment décrit. Tous les 3 jours, 3 fioles Erlenmeyer sont prélevées pour chaque traitement afin d'évaluer la croissance et la production de métabolites secondaires dans la matière sèche et les milieux de culture.

1.3.4.2.2. Addition du chitosane après 3 semaines de culture

Soixante-et-une fioles Erlenmeyer sont utilisées pour la mise en culture d'apex racinaires de RTLach5 et cultivées sur milieu B5 dans les conditions décrites au paragraphe 1.3.1. pendant une période de 3 semaines. Tous les 3 jours, 3 fioles sont prélevées et analysées pour leur production de biomasse et de métabolites secondaires dans la matière sèche et les milieux de culture (soit 24 fioles).

Le 21^{ème} jour, plusieurs traitements sont appliqués :

- 18 fioles sont complétées par 50 ml de milieu B5 témoin, et sont prélevées à raison de 3 tous les 3 jours pendant une semaine, pour déterminer l'incidence d'un ajout de milieu neuf sur la production de biomasse et de métabolites secondaires par RTLach5.

- 9 fioles sont complétées par 50 ml de milieu B5 enrichi de 60 mg.l⁻¹ de chitosane et sont prélevées à raison de 3 tous les 3 jours pendant une semaine, pour déterminer l'impact de la présence du chitosane sur les modifications induites par le renouvellement du milieu de culture.

- 5 fioles sont complétées par 50 ml de milieu B5 témoin. Pendant la semaine qui suit, nous prélevons 1 ml de milieu de culture 5 fois par 24 heures dans chaque fiole. Ceci nous permettra de déterminer la cinétique d'excrétion des métabolites secondaires dans le milieu de culture de façon précise.

- 5 fioles sont complétées par 50 ml de milieu B5 additionné de 60 mg.l⁻¹ de chitosane, de façon à obtenir 100 ml d'un milieu d'élicitation à 30 mg.l⁻¹ de chitosane. Nous prélevons pendant une semaine 1 ml de milieu de culture 5 fois par 24 heures dans chaque fiole. Cette expérimentation nous permettra d'établir l'influence du chitosane sur l'excrétion des métabolites synthétisés par la souche RTLach5 dans les milieux de culture.

1.3.4.2.3. Etablissement d'une cinétique d'excrétion des isoflavonoïdes par traçage radioactif

Douze fioles Erlenmeyer sont utilisées pour la mise en culture d'apex racinaires de RTLach5 et cultivées sur milieu B5 dans les conditions décrites au paragraphe 1.3.1. pendant une période de 3 semaines. A l'issue de cette période de préculture, le protocole suivant est adopté :

- 4 fioles sont complétées par 50 ml de milieu B5 témoin contenant 50 μ Ci de L-[2, 3, 4, 5, 6-³H]phénylalanine (Amersham).

- 4 fioles sont complétées par 50 ml de milieu B5 additionné de 60 mg.l⁻¹ de chitosane, de façon à obtenir 100 ml d'un milieu d'élicitation à 30 mg.l⁻¹ de chitosane. Le milieu neuf est enrichi par 50 μ Ci de L-[2, 3, 4, 5, 6-³H]phénylalanine.

- 2 fioles sont complétées par 50 ml de milieu B5 contenant 10 μ M de L-phénylalanine froide

- 2 fioles sont complétées par 50 ml de milieu B5 additionné de 60 mg.l⁻¹ de chitosane, de façon à obtenir 100 ml d'un milieu d'élicitation à 30 mg.l⁻¹ de chitosane et contenant 10 μ M de L-phénylalanine froide.

Pendant la semaine qui suit, nous prélevons 1 ml de milieu de culture 5 fois par 24 heures dans chaque fiole.

1.4. Analyse des échantillons

1.4.1. Analyse du matériel végétal

Les racines transformées sont extraites à partir des poudres résultant du broyage après l'étape de lyophilisation (paragraphe 1.3.2.). Environ 10 mg de cette poudre sont prélevés très précisément puis hydrolysés à 100 °C dans un Eppendorf avec 1,5 ml d'acide sulfurique 3M. Après une demi-heure d'agitation, les échantillons sont centrifugés (centrifugeuse Jouan M14.11) à 10300 g pendant 7 minutes. Un aliquote du surnageant est ensuite dilué à moitié dans l'éthanol 96°, puis filtré sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0,45 μ m avant d'être analysé par CLHP (Nguyen *et al.*, 1997).

1.4.2. Analyse des milieux de culture

Les milieux de culture sont analysés selon le protocole décrit dans le paragraphe 1.3.2. du chapitre 2. Des précautions particulières sont prises à toutes les étapes de l'analyse pour les échantillons marqués.

1.5. Technique d'analyse et identification des métabolites

Les analyses sont réalisées par CLHP selon le même protocole que celui développé dans le chapitre 1 (paragraphe 1.3.).

En ce qui concerne les métabolites secondaires mis en évidence au cours de ces expérimentations et non encore identifiés, la détermination est réalisée par comparaison des spectres UV et des temps d'élution avec des molécules étalons.

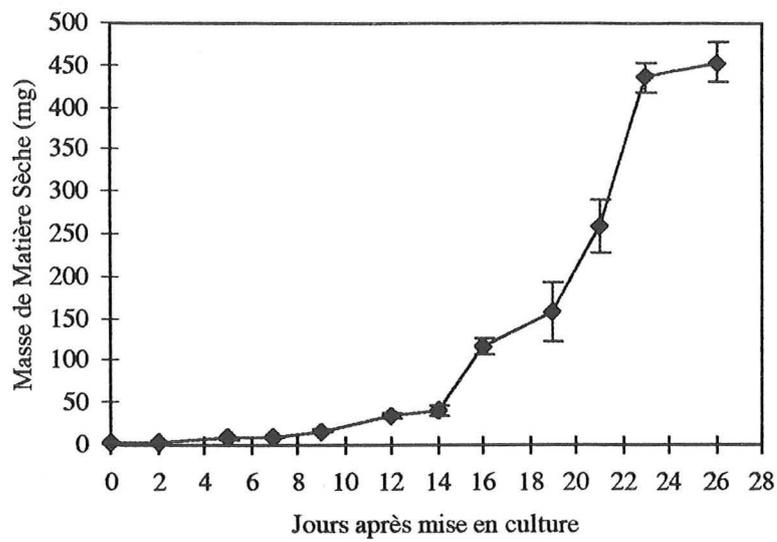


Figure 27. Cinétique de croissance de la souche RTLach5 cultivée sur milieu liquide B5. Chaque point est une moyenne réalisée sur 3 répétitions. Les barres verticales représentent les écarts types.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. Etude de la cinétique de croissance et de production d'isoflavonoïdes par la souche de racines transformées RTLach5

2.1.1. Etude de la croissance en milieu liquide B5

La figure 27 représente la courbe de croissance de la souche RTLach5 cultivée en milieu liquide B5. Après une période de culture de 26 jours, la biomasse est multipliée 284 fois. L'inoculum de 1,6 mg atteint 454 mg en fin de croissance, ce qui correspond à 9 g de matière sèche par litre de culture. Ce chiffre est inférieur à celui que nous avons mesuré pour cette même souche lors de l'étude du souchier. En effet, la souche RTLach5, à l'issue d'une période de 28 jours de culture avait produit plus d'1 gramme de matière sèche.

La courbe de croissance de la biomasse se décompose en 3 phases :

- ✓ une phase de latence lors des 10 premiers jours de la culture
- ✓ une phase de croissance exponentielle entre le 10ème et le 18ème jour
- ✓ une phase de ralentissement de croissance et l'amorce d'un plateau à partir du 21ème jour de la culture

La phase de latence, relativement longue, semble être due à la très faible taille de l'inoculum. La reprise de croissance des 3 apex durant les premiers jours de culture n'est pas perceptible par la mesure de la matière sèche produite. Ces conditions de culture sont cependant identiques à celles que nous avons appliquées pour l'étude du souchier.

La courbe de croissance des racines transformées s'apparente à celle d'une culture bactérienne. Il est donc possible de calculer la vitesse de croissance spécifique de la culture ainsi que le temps de génération pendant la phase croissance exponentielle. En effet durant cette dernière, nous avons la relation suivante :

$$\ln(Y) = \mu \times t + a$$

avec Y : masse de matière sèche

t : temps en heures

μ : pente de la droite (vitesse spécifique)

a : constante

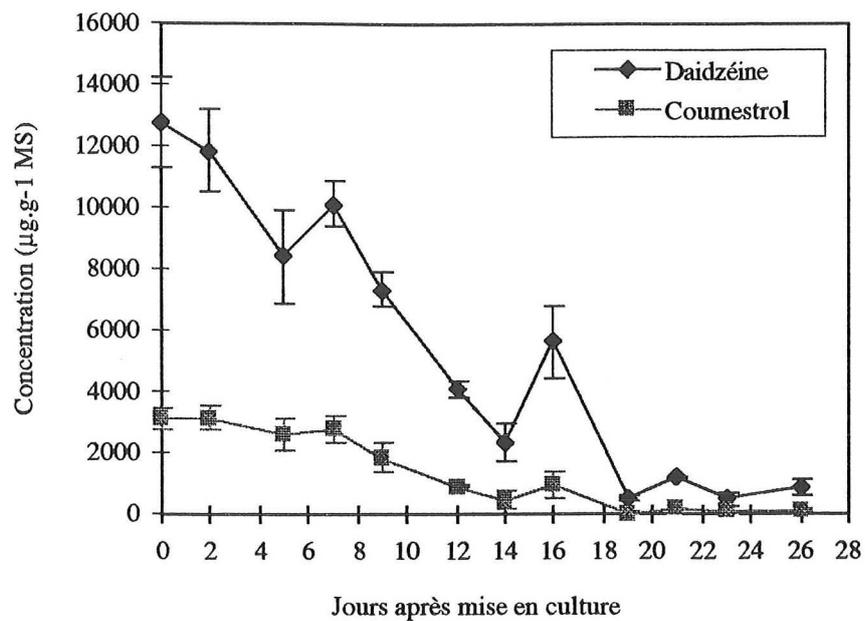


Figure 28. Cinétique de production d'isoflavonoïdes par la souche RTLach5 cultivée sur milieu B5 liquide. Chaque point est la moyenne établie pour 3 répétitions. Les barres verticales représentent les écarts types.

A partir des données du 10^{ème} au 18^{ème} jour, nous pouvons calculer la pente de la droite définie comme la vitesse de croissance spécifique, qui est ici de 0,37 jour⁻¹. Le temps de génération nécessaire pour que la biomasse soit multipliée par un facteur 2 est donc :

$$G = \text{Ln}(2) / 0,37$$

Nous observons que $G = 1,87$ jour, soient 45 heures. Ce temps de génération particulièrement faible est cependant supérieur à celui de 38 heures reporté par Nguyen *et al.*(1992) pour la souche de racines transformées RTLach1, issue elle aussi de la transformation de *Psoralea lachnostachys* par AR 9402. Maldonado-Mendoza *et al.* (1993) obtiennent pour leur part une biomasse doublée en moins d'une journée pour des racines transformées de *Datura stramonium*. Cette valeur de 45 heures se situe en dehors des valeurs de 48 à 168 heures déjà répertoriées pour les cultures de racines transformées de différentes espèces (Wilson *et al.*, 1987). La croissance très rapide peut être une caractéristique de l'espèce *Psoralea lachnostachys*. Des mesures effectuées dans des conditions identiques sur la souche de racines transformées issue de *Psoralea cinerea* indiquent en effet un temps de doublement de la biomasse de 62 heures, un temps 1,5 fois supérieur à celui mesuré pour RTLach5 (données non représentées).

La croissance des racines transformées suit une loi exponentielle. Pourtant dans les organes différenciés, la division cellulaire est réduite aux zones méristématiques et il semble par conséquent surprenant d'observer une telle allure de la cinétique de croissance. Cependant, lorsque les racines produisent des ramifications latérales, le nombre de méristèmes apicaux devient élevé. De plus, nous évaluons la croissance racinaire par des mesures de matière sèche. Par conséquent, l'effet de l'élongation et des divisions cellulaires est pris en compte dans la mesure. Ces facteurs contribuent à expliquer le modèle exponentiel selon lequel se fait la croissance racinaire de la souche RTLach5 (Sharp et Doran, 1990).

Le ralentissement de croissance que nous observons à l'issue de la phase exponentielle semble lié à un épuisement du milieu pour un ou plusieurs éléments nutritifs. Cependant, la coloration brune du milieu et des racines âgées nous laissent penser qu'il pourrait y avoir également un phénomène d'intoxication par des composés tels que des polyphénols oxydés issus de la lyse des tissus sénescents. Ceux-ci sont oxydés par les polyphénoloxydases et sont alors hautement toxiques pour les racines en culture (Zrýd, 1988).

2.1.2. Etude de la production d'isoflavonoïdes

La daidzéine et le coumestrol sont identifiés dans la matière sèche de la souche RTLach5. L'évolution de la production de ces 2 composés est représentée sur la figure 28. Le profil des teneurs en daidzéine et en coumestrol présente une décroissance irrégulière de ces deux composés entre le premier et le 26^{ème} jour de culture. Les concentrations en daidzéine et

coumestrol évoluent en effet de 12800 à 490 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS et de 3120 à 50 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS respectivement. Les fluctuations subies par les deux molécules sont identiques. Ainsi à chaque augmentation de la teneur en daidzéine correspond une augmentation de la concentration en coumestrol. Par ailleurs, nous pouvons observer que les teneurs en daidzéine sont toujours nettement supérieures à celles du coumestrol, d'un facteur 4 au minimum jusqu'au 19^{ème} jour. Ce facteur diminue en fin de culture.

Ces résultats sont différents de ceux que nous avons obtenu lors du dosage du souchier. Le dosage des métabolites secondaires réalisé à l'issue d'une période de culture de 28 jours révélait la présence de teneurs beaucoup plus élevées en daidzéine et en coumestrol que celles que nous déterminons dans le cadre de cette expérimentation après 26 jours de culture. En effet, la souche RTLach5 contient 6900 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS de daidzéine et environ 600 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS de coumestrol après 28 jours de culture lors du dosage du souchier et les teneurs ne sont que de 490 et 50 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS pour cette expérimentation.

La chute des teneurs en métabolites secondaires dans RTLach5 durant une période de 24 jours ne peut pas être expliquée par leur excrétion. En effet, le dosage des milieux de culture ne révèle la présence d'aucune molécule de la famille des isoflavonoïdes. La comparaison de l'évolution de la biomasse et des concentrations en métabolites secondaires laisse apparaître qu'à la chute de production en daidzéine et coumestrol correspond une augmentation de la production de biomasse. Il est donc probable que la synthèse des métabolites secondaires par les racines transformées de *Psoralea lachnostachys* n'ait plus lieu. Dans ce cas, la chute observée pour les concentrations de daidzéine et de coumestrol résulterait de la dilution de la quantité constante de ces deux métabolites par une biomasse croissant selon un modèle exponentiel. Il est également possible que la daidzéine synthétisée soit catabolisée en sous-produits. Dans ce cas cependant, nous pourrions nous attendre à une augmentation des concentrations en coumestrol, étant donné que ce dernier métabolite est situé immédiatement après la daidzéine dans la chaîne de biosynthèse des isoflavonoïdes. Or les concentrations en coumestrol suivent les mêmes tendances que les concentrations en daidzéine. Cette hypothèse est donc peu probable, à moins de montrer que le coumestrol est lui aussi catabolisé, ce qui limiterait l'accumulation de ce métabolite dans les racines de la souche RTLach5. L'étude des profils obtenus par CLHP ne révèle pas de pics supplémentaires pour les analyses réalisées lors de cette expérimentation. Par conséquent, il nous semble qu'un arrêt de la synthèse de la daidzéine et du coumestrol peut effectivement être invoqué pour expliquer les chutes de concentration mesurées pour ces 2 métabolites.

Le fait que les teneurs en daidzéine et coumestrol évoluent de façon identique nous a interrogé sur la fiabilité de l'analyse CLHP. En effet, si la quantité d'extrait prélevée n'était pas strictement identique entre une analyse et la suivante, les teneurs en ces 2 métabolites seraient toutes deux augmentées ou diminuées de façon proportionnelle. Une vérification réalisée sur plusieurs échantillons dosés 10 fois nous a indiqué que la méthode de dosage n'était pas à mettre en cause, une analyse statistique n'indiquant aucune différence significative au seuil de

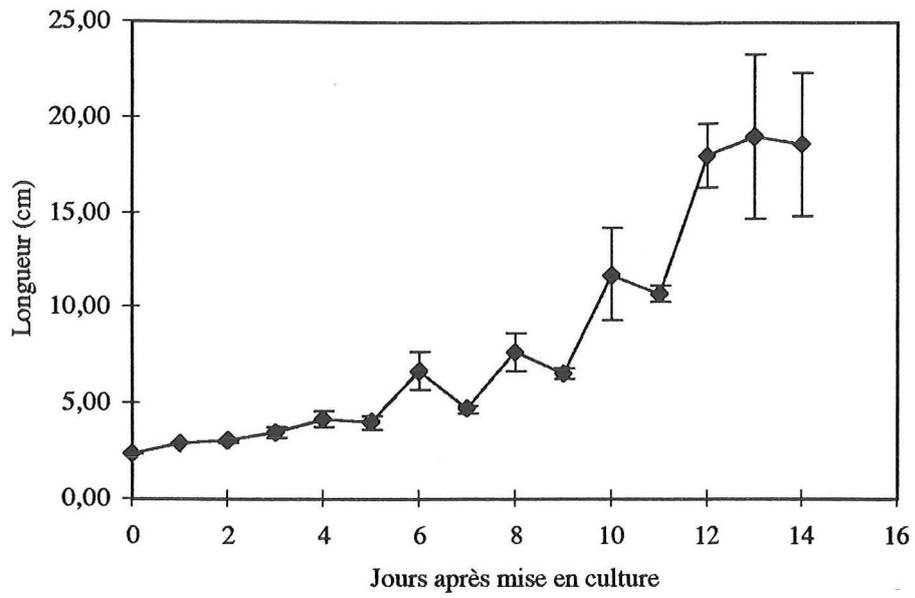


Figure 29. Elongation totale d'une racine de la souche RTLach5 cultivée sur milieu B5 liquide. Chaque point est une moyenne établie sur 3 répétitions. Les barres verticales représentent les écarts types.

1%. Par conséquent l'évolution analogue des teneurs en daïdzéine et du coumestrol est probablement à mettre en rapport avec le lien biosynthétique existant entre ces 2 molécules.

2.2. Relation entre morphologie racinaire et production d'isoflavonoïdes par la souche RTLach5

Cette étude est menée sur une période de 15 jours durant laquelle sont mesurés et pesés divers compartiments racinaires. La durée de l'expérimentation est limitée à deux semaines pour des raisons de disponibilité de matériel, mais surtout en raison du développement racinaire important qui réduit la faisabilité de l'étude sur une période plus longue.

2.2.1. Etude de la morphologie racinaire de la souche de racines transformées RTLach5

Plusieurs paramètres ont été mesurés. Nous nous attacherons plus particulièrement à ceux qui traduisent l'élongation et la production de biomasse par la souche RTLach5.

2.2.1.1. Etude de l'élongation de la souche RTLach5 sur une période de 15 jours

L'élongation totale d'un apex (longueur de toutes les racines d'un même explant mises bout à bout) à l'issue d'une période de culture de 2 semaines est représentée sur la figure 29. Nous constatons d'après ce graphe que 3 phases se succèdent pour que l'explant de 2 cm mis en culture atteigne une longueur moyenne de 18,57 cm après 15 jours, soit la multiplication par un facteur 9 de la longueur de l'explant de départ. Ces trois phases sont :

- une phase de latence, du jour de mise en culture jusqu'au 6^{ème} jour
- une phase d'élongation rapide qui se prolonge jusqu'au jour 13
- une phase de ralentissement de croissance qui intervient à partir du 13^{ème} jour de culture.

Ce profil de la courbe d'élongation d'une racine de la souche RTLach5 s'apparente à celui que nous avons obtenu pour la production de biomasse sur une période de 3 semaines (Figure 27). Ce fait nous conduit donc à penser que l'élongation racinaire est un paramètre important dans la production de biomasse par la souche RTLach5.

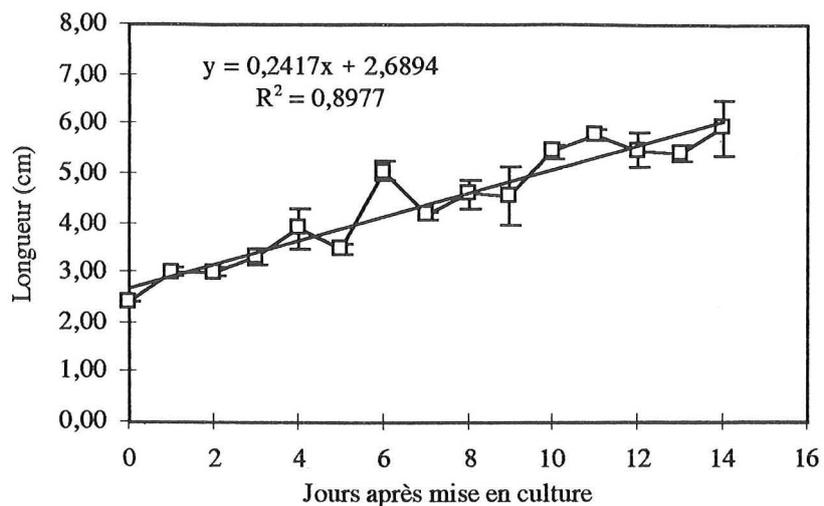


Figure 30. Elongation d'une racine principale de la souche RTLach5 cultivée sur milieu B5 liquide. Chaque point est la moyenne établie pour 3 répétitions. Les barres verticales représentent les écarts types.

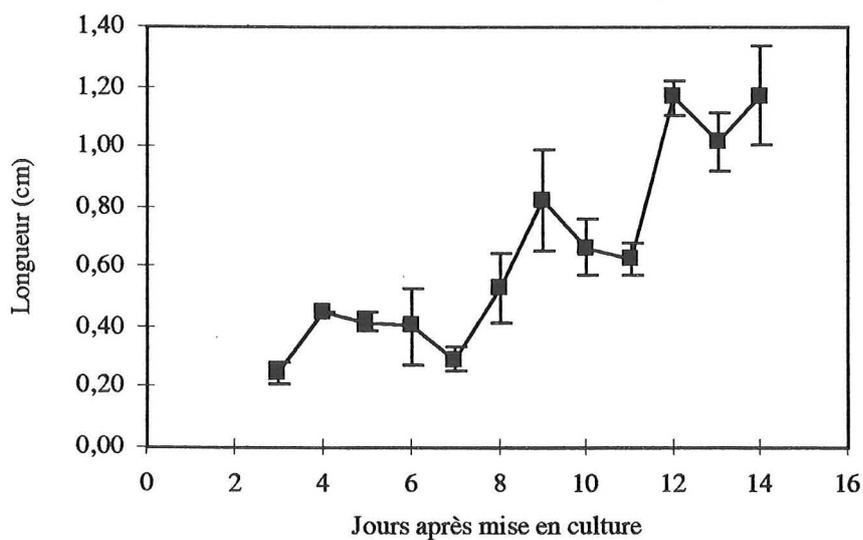


Figure 31. Elongation moyenne d'une racine secondaire de la souche RTLach5 cultivée sur milieu B5 liquide. Chaque point est la moyenne établie pour l'ensemble des racines secondaires présentes au jour du prélèvement. Les barres verticales représentent les écarts types.

La mesure de la longueur totale atteinte par un explant en 2 semaines est obtenue par le cumul des longueurs de la racine principale et des racines d'ordre 2 qui se différencient de cette racine principale. Les figures 30 et 31 représentent l'élongation racinaire pour ces 2 compartiments séparés. Nous constatons que l'élongation des 2 types de racines ne semblent pas suivre les mêmes règles. En effet, la racine principale suit une croissance linéaire, alors que l'élongation des racines d'ordre 2 semblent se faire par paliers successifs.

En ce qui concerne la racine principale, la croissance débute dès le premier jour de mise en culture, et se poursuit de façon régulière mais relativement lente. En effet, la pente de la droite nous permet de déterminer une vitesse de croissance de $0,24 \text{ cm.jour}^{-1}$. Les écarts types calculés pour chaque point sont faibles, ce qui indique un profil de croissance homogène et reproductible de la racine principale pour divers explants.

L'élongation moyenne d'une racine d'ordre 2 en fonction du temps se fait en revanche par paliers. La mesure de la longueur de la racine d'ordre 2 ne peut être effectuée qu'après une période de culture d'au moins 3 jours. Auparavant, les racines d'ordre 2 n'existent pas ou sont encore à l'état d'ébauches racinaires. Une fois apparue, la racine d'ordre 2 s'allonge puis sa taille semble se stabiliser pendant une durée d'environ 2 jours avant de s'allonger à nouveau. Ce phénomène est cependant difficile à mettre en évidence en raison de la variabilité importante entre les différentes mesures effectuées pour des racines d'ordre 2 de même âge. Cette variabilité rend compte de plusieurs phénomènes. D'une part, l'élongation de la racine d'ordre 2 est beaucoup plus aléatoire et nettement moins reproductible que celle de la racine principale. Ainsi, des racines de même taille croissent rapidement et d'autres se développent moins rapidement. D'autre part, nous avons pu observer que les racines d'ordre 2 apparues les premières s'allongent de façon beaucoup plus rapide que les racines d'ordre 2 plus récentes. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les racines d'ordre 2 apparues les premières ont déjà atteint une taille suffisante pour se développer correctement, alors que les dernières ont encore une taille inférieure à cette 'taille-seuil' pour croître rapidement. La longueur que nous représentons est une valeur moyenne pour toutes les racines d'ordre 2 d'un même explant, et par conséquent établie sur des racines d'ordre 2 d'âge différent. Il n'est donc pas surprenant que les écarts types représentés pour les racines d'ordre 2 soient nettement supérieurs à ceux que nous avons obtenus pour la racine principale. Sur une durée de culture plus longue, il serait indispensable de compartimenter les racines d'ordre 2 selon leur âge avant de déterminer une longueur moyenne de la racine d'ordre 2 en fonction du temps. En fait, à l'issue des 15 jours de culture, l'aspect de l'explant mis en culture peut se comparer à celui d'un petit sapin, le tronc étant la racine principale, la pointe représentant l'apex et les branches latérales figurant les racines d'ordre 2.

L'élongation totale d'un explant est dépendante de l'élongation de chacun des types de racine qui le constitue, mais également du nombre de ces racines. Nous avons représenté dans la figure 32 l'évolution du nombre de ramifications d'ordre 2 en fonction du temps. Nous

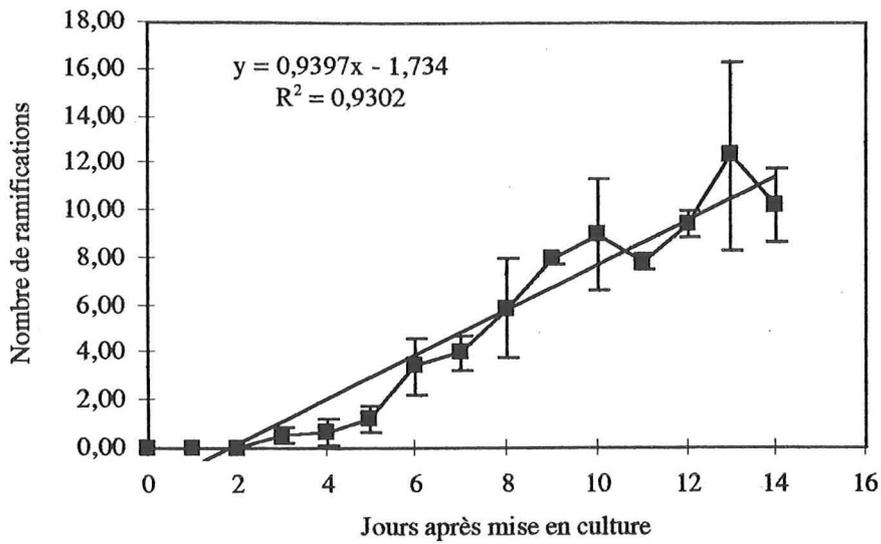


Figure 32. Evolution du nombre de ramifications secondaires sur les racines de la souche RTLach5 cultivées en milieu B5 liquide. Chaque point est la moyenne établie pour 3 répétitions. Les barres verticales représentent les écarts types.

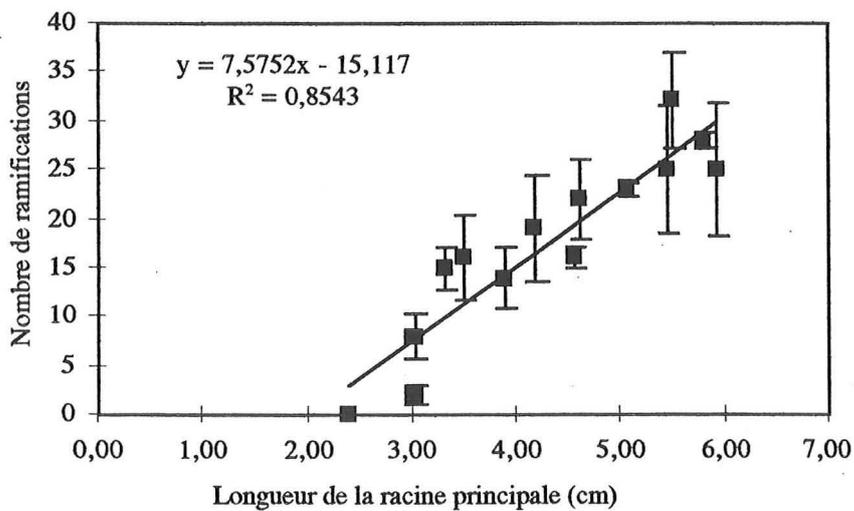


Figure 33. Evolution du nombre de ramifications secondaires sur les racines de la souche RTLach5 représentée en fonction de la longueur de la racine principale. Chaque point est une moyenne établie pour 3 répétitions. Les barres verticales représentent les écarts types.

pouvons observer sur ce graphe que le nombre de ramification augmente linéairement avec le temps pour atteindre une valeur moyenne finale de plus de 40 ramifications après 2 semaines de culture. Cette augmentation linéaire confirme l'importance de la ramification de l'explant pour assurer son développement. En effet, la croissance continue de la racine transformée aurait pu se poursuivre uniquement par élongation des ramifications établies dans une première phase de développement. La linéarité de la courbe représentée sur la figure 32 nous montre que tel n'est pas le cas. Nous pouvons observer que les écarts types deviennent importants pour les 3 dernières dates de récolte. Ce phénomène est dû à l'apparition pour ces 3 derniers prélèvements de ramifications d'ordre 3 sur les racines d'ordre 2. Les nouvelles ébauches apparaissent lorsque la racine d'ordre 2 a atteint une taille d'au moins 5 cm, mais ne sont pas systématiquement présentes sur les racines d'ordre 2 de cette taille. Par conséquent, la prise en considération de ces nouvelles ébauches introduit un nouveau facteur de variabilité qui se traduit par des écarts types importants.

Nous avons tenté de déterminer si l'apparition d'une ramification n'était liée qu'au temps et donc à l'âge de la racine principale, ou si d'autres facteurs étaient impliqués. La figure 33 représente le nombre de ramifications en fonction de la longueur de la racine principale. Nous avons établi sur ce graphe qu'il existe une relation linéaire entre ces 2 paramètres. Ainsi, nous pouvons calculer qu'une racine d'ordre 2 se développe en moyenne tous les 1,7 cm, la première ramification étant observée lorsque la racine principale atteint une longueur minimale de 3,03 cm.

A l'issue de cette étude sur la morphologie du système racinaire de RTLach5, nous pouvons établir un schéma théorique du développement de cette souche.

Tout d'abord, l'explant mis en culture s'allonge lentement de 2 à 3 cm environ avant que n'apparaisse la première ébauche de ramification d'ordre 2 (Figures 30 et 32). La racine principale continue de s'allonger pendant 4 à 5 jours jusqu'à atteindre une taille de plus de 5 cm (Figure 30). A ce stade, le nombre d'ébauches racinaires continue d'augmenter régulièrement (Figure 32) pendant que les premières ramifications ont atteint une taille suffisante pour se développer rapidement. Ceci correspond à la première phase d'élongation de la racine d'ordre 2 (Figure 31). Cette vitesse d'élongation se ralentit ensuite (selon le schéma de croissance de toutes les racines transformées) et devient inférieure à celle de l'apparition des nouvelles ébauches au long de la racine principale. Nous atteignons ainsi le premier palier représenté sur la figure 31 pour l'élongation moyenne d'une racine d'ordre 2. Durant cette période qui s'étend sur environ 2 jours, les nouvelles ébauches ont atteint une taille suffisante pour s'allonger plus rapidement que n'apparaissent les ébauches des ramifications suivantes. Nous observons alors la deuxième phase d'élongation. Ce même schéma se reproduit ainsi sur les 15 jours qu'a duré notre étude.

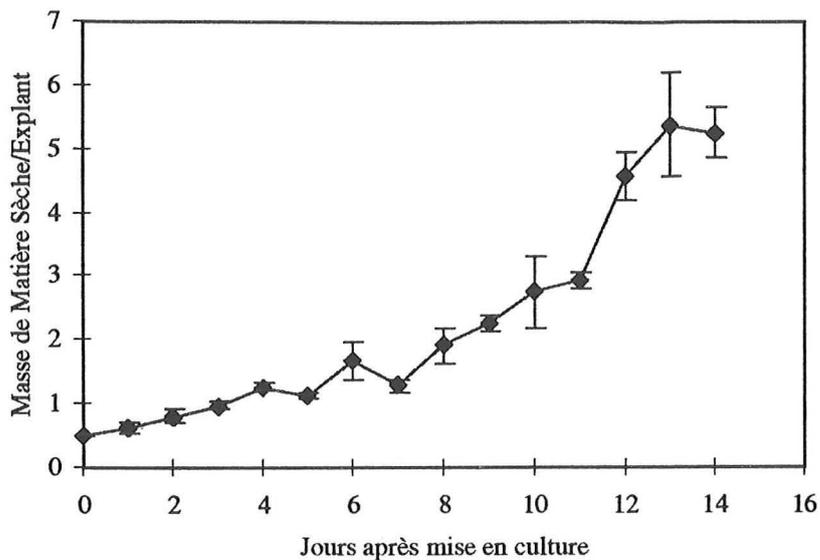


Figure 34. Cinétique de croissance d'une racine de la souche RTLach5 cultivée sur milieu B5 liquide (Biomasse exprimée en mg MS). Chaque point est une moyenne établie pour 3 répétitions. Les barres verticales représentent les écarts types.

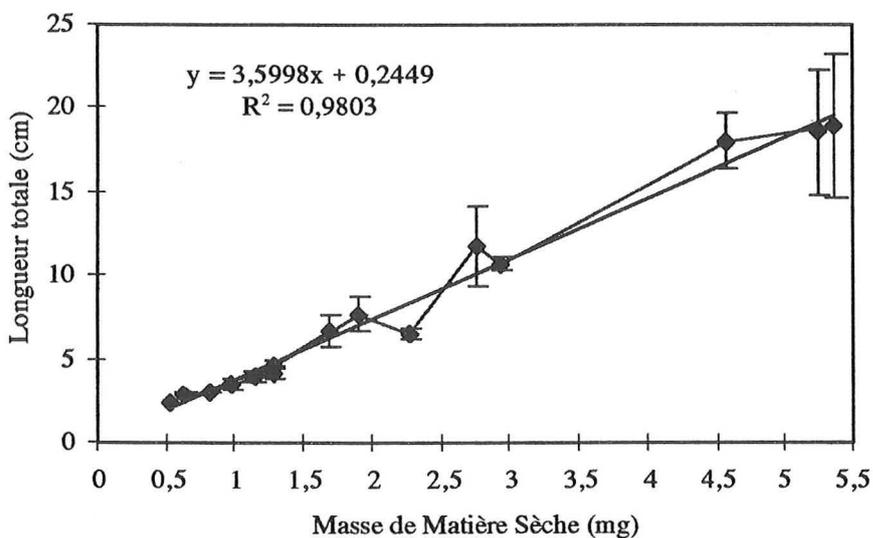


Figure 35. Evolution de la longueur totale d'une racine de la souche RTLach5 en fonction de sa biomasse sèche. Chaque point est une moyenne établie pour 3 répétitions. Les barres verticales représentent les écarts types.

Ce schéma montre l'importance prépondérante de la ramification du système racinaire pour le développement de la souche RTLach5, et donne une idée très approchante de sa morphologie (photo 3).

2.2.1.2. Etude de la production de biomasse de la souche RTLach5 sur une période de 15 jours

L'évolution de la masse de matière sèche pour un explant est représentée en fonction du temps sur la figure 34. La biomasse moyenne de départ est d'environ 0,6 mg. Cette valeur est plus faible que la valeur moyenne de 1,6 mg que nous avons établie pour l'ensemble du souchier, en raison de la morphologie particulière des souches de racines transformées issues de *Psoralea lachnostachys*. En effet, ces racines sont fines, ce qui explique que pour une taille identique à celles des explants provenant d'autres espèces de Psoralées, la masse sèche soit inférieure.

Après une période de culture de 15 jours, la biomasse est multipliée par un facteur 10,5 pour atteindre en moyenne 5,3 mg de matière sèche par explant. La courbe de production de biomasse présente un profil analogue à celui que nous avons observé pour l'expérience précédente. En effet, la production de biomasse semble se faire également en trois phases successives avec une phase de début de croissance lente jusqu'au 6ème jour, puis une phase de production active qui se prolonge jusqu'au jour 13 avant de se stabiliser lors d'une troisième phase jusqu'à la fin de l'expérimentation. Pourtant la durée de l'expérimentation est inférieure d'une semaine à celle de l'expérience précédente. En fait, il semble que la longueur de la phase exponentielle ne soit pas modifiée (7 jours dans les 2 cas), mais qu'elle ait été retardée en raison de la durée de la phase de latence exceptionnellement longue dans le cadre de l'expérimentation précédente.

Le fait que les courbes de production de biomasse et d'élongation moyenne de l'explant soient superposables montre l'importance de ce dernier paramètre pour la production de biomasse par RTLach5. L'examen des facteurs de multiplication de la biomasse et de l'élongation racinaire confirme ce phénomène. En effet, en 2 semaines de culture, la longueur moyenne de RTLach5 est multipliée par un facteur 9, alors que sa biomasse est multipliée par 10,5, ce qui, si l'on tient compte de la variabilité des résultats en fin de culture, est identique.

Pour vérifier cette observation, nous avons représenté l'évolution de la longueur moyenne de RTLach5 en fonction de sa biomasse (Figure 35). Il est aisé de constater sur ce graphe qu'il existe une relation linéaire entre la production de biomasse et l'élongation moyenne de la souche de racine transformée RTLach5.

La biomasse produite par RTLach5 semble par conséquent résulter de l'élongation et de la forte ramification du réseau racinaire d'ordre 2, et non de leur croissance en épaisseur.

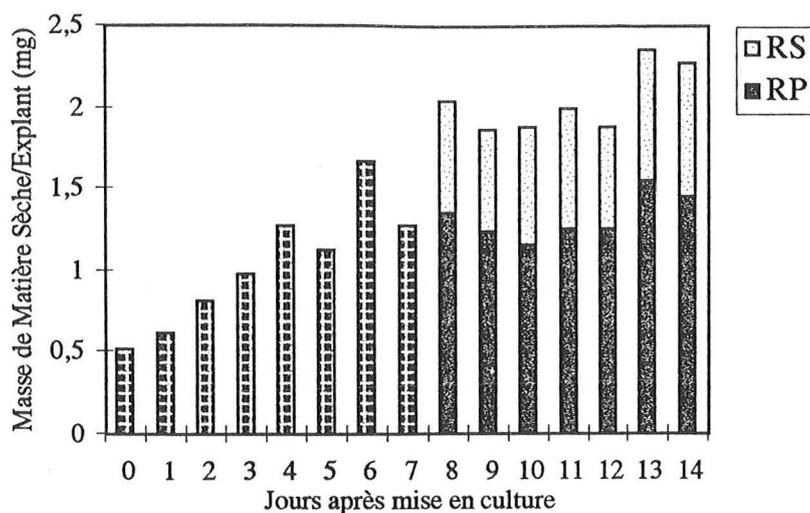


Figure 36. Répartition de la biomasse entre la racine principale (RP) et la racine secondaire (RS) pour une racine de la souche RTLach5 cultivée sur milieu B5 liquide.

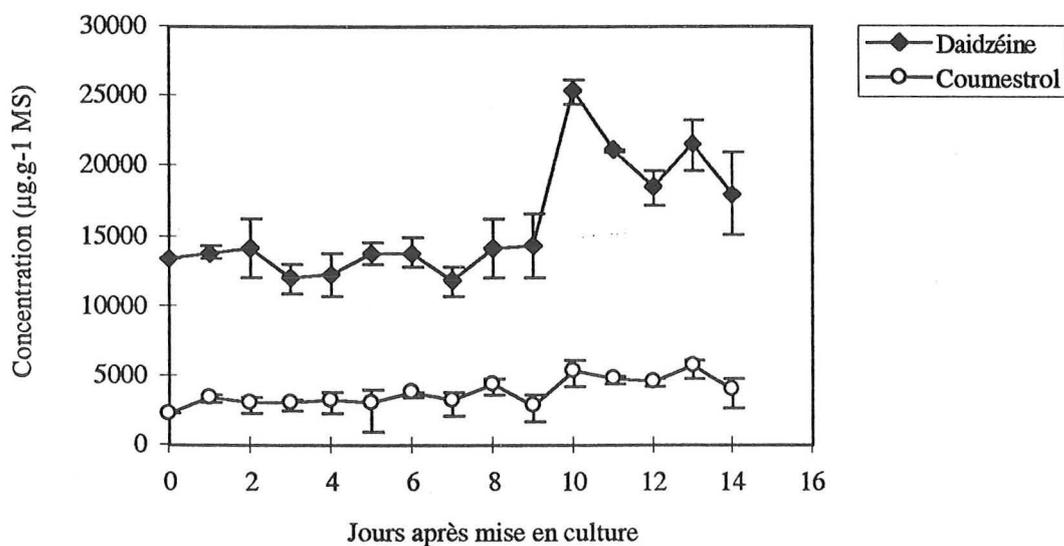


Figure 37. Evolution de la concentration en isoflavonoïdes dans la matière sèche de la racine de la souche RTLach5 cultivée sur milieu B5 liquide. Chaque point est une moyenne établie pour 3 répétitions. Les barres verticales représentent les écarts types.

De la même façon que nous avons cherché à déterminer la part de chacun des types de racine dans l'élongation moyenne de RTLach5 (racine principale et racines d'ordre 2), nous avons établi la répartition des biomasses de chacun de ces compartiments en fonction du temps (Figure 36). Jusqu'au jour 7, la biomasse représentée par les racines d'ordre 2 est trop faible pour la séparer de celle de la racine principale sans introduire d'erreur de mesure importante. En conséquence, les histogrammes figurés de j0 à j7 sont les biomasses moyennes établies sur les deux types de racines. A partir du 8ème jour, chacun des 2 compartiments est représenté seul. Ce graphe nous montre que la production de biomasse à partir du 8ème jour de culture est essentiellement due à la croissance des racines d'ordre 2, alors que la production de biomasse par la racine principale est très faible voire imperceptible. Cette adéquation très étroite entre élongation et biomasse du système racinaire d'ordre 2 confirme une fois encore l'hypothèse selon laquelle la croissance de la souche RTLach5 est due à l'intense développement des ramifications d'ordre 2.

2.2.2. Etude de la production des isoflavonoïdes par la souche RTLach5 pendant une période de 15 jours

Nous avons réalisé des dosages dans les milieux de culture et la matière sèche récoltée au cours de cette expérimentation. Deux molécules sont identifiées : la daïdzéine et le coumestrol.

2.2.2.1. Dosage des milieux de culture

Aucune des deux molécules n'est détectée dans les milieux de culture de la souche RTLach5 à l'issue de la période de 15 jours de culture. Ce résultat est analogue à celui que nous avons obtenu lors du dosage du souchier ainsi qu'au cours de l'étude de la cinétique de croissance et de production de la souche RTLach5. En conditions de culture 'normales', les métabolites secondaires synthétisés par la souche RTLach5 ne sont pas excrétés dans le milieu.

2.2.2.2. Dosage de la matière sèche

La daïdzéine et le coumestrol sont identifiés dès le début de la mise en culture, et pendant toute la durée de l'expérimentation. L'évolution des concentrations moyennes est indiquée pour ces 2 métabolites sur la figure 37. Nous constatons que les concentrations retrouvées dans la matière sèche racinaire, tous compartiments confondus, varient de 13500 à plus de 25000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS pour la daïdzéine et de 2500 à un peu plus de 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS en ce qui concerne le coumestrol. Les teneurs de départ correspondent à celles que

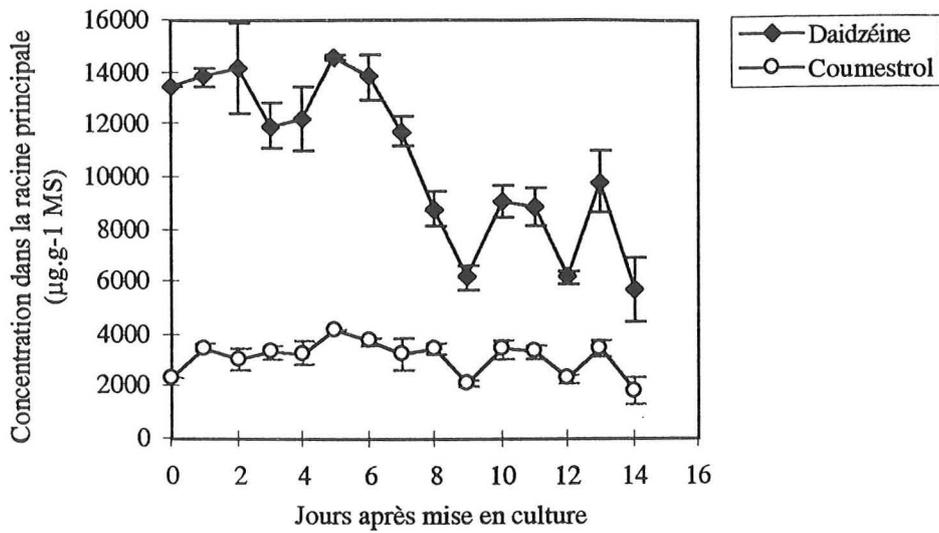


Figure 38a. Cinétique de production des isoflavonoïdes par la racine principale de la souche RTLach5 cultivée sur milieu B5 liquide. Chaque point est une moyenne établie pour 3 répétitions. Les barres verticales représentent les écarts types.

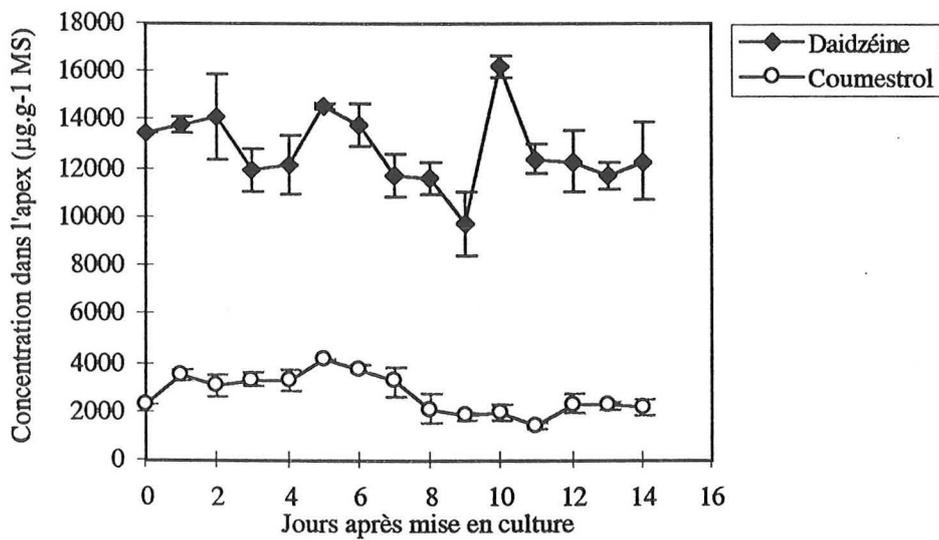


Figure 38b. Cinétique de production des isoflavonoïdes par un apex de la souche RTLach5 cultivée sur milieu B5 liquide. Chaque point est une moyenne établie pour 3 répétitions. Les barres verticales représentent les écarts types.

nous retrouvons dans le cadre de l'expérience de cinétique de croissance et de production, traduisant ainsi la reproductibilité des conditions de mise en culture, quelles que soient les expérimentations menées. L'évolution de la production des 2 métabolites est cependant très différente entre ces deux expériences. En effet, alors que les concentrations en daidzéine et coumestrol diminuaient irrégulièrement dans l'expérience de cinétique, elles augmentent significativement dans la matière sèche pour notre dernière expérimentation. En revanche, ces deux expériences montrent toutes deux l'évolution identique des concentrations en daidzéine et en coumestrol. Ces 2 molécules présentent un profil analogue, et à chaque fluctuation de la concentration en daidzéine correspond une fluctuation identique pour la teneur en coumestrol. Le lien biosynthétique existant entre ces 2 molécules a déjà été invoqué. Toutefois, si l'on admet que la daidzéine dont nous mesurons les concentrations est le précurseur du coumestrol détecté, la transformation est alors très rapide et indécélable pour le pas de temps que nous avons choisi, c'est-à-dire 24 heures, puisque nous la percevons comme simultanée.

Si l'évolution de la concentration en coumestrol semble être stable, il n'en est pas de même pour la daidzéine. En effet, la concentration en daidzéine est stable entre le premier et le 7ème jour de mise en culture, puis augmente à partir du 8ème jour. Ce phénomène est à rapprocher de l'accroissement de la biomasse et du développement des racines secondaires à la même période. Ainsi, l'étude de ce graphe nous a conduit à émettre l'hypothèse d'une production en isoflavonoïdes avec un ratio différent selon le compartiment racinaire auquel nous nous référons. Pour vérifier si un tel phénomène se produit effectivement pour la souche RTLach5, nous avons analysé la matière sèche selon deux compartiments séparés, constitués respectivement de la racine principale d'une part et des apex et racines d'ordre 2 d'autre part, prélevés sur les 3 explants d'une même fiole Erlenmeyer. Les résultats sont illustrés par les figures 38a et 38b. Les valeurs reportées pour les 7 premiers jours sont des valeurs moyennes calculées sur les concentrations en isoflavonoïdes des deux compartiments réunis. En effet, nous rappelons qu'avant cette date, la taille des ramifications d'ordre 2 est trop faible pour que l'erreur expérimentale qui découlerait de leur prélèvement ne soit pas inconsidérée. Nous observons sur ces deux figures que les concentrations en coumestrol sont toujours inférieures à celles détectées pour la daidzéine ; cependant, si le ratio est de 1/5 dans les racines d'ordre 2 et les apex, il n'est que de 1/3 dans les racines principales dès le jour 8. Par ailleurs, les concentrations en daidzéine dans la racine principale à partir du jour 8 sont voisines de 7500 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS, valeurs bien inférieures, à la fois à celles détectées dans les racines d'ordre 2 et les apex, et également aux valeurs moyennes établies sur l'ensemble de la matière sèche durant les 7 premiers jours de culture. En revanche, les concentrations en coumestrol s'avèrent très proches dans les deux compartiments durant toute la période de culture, avec des valeurs qui diminuent toutefois dans le compartiment racines secondaires et apex, et qui augmentent dans le compartiment constitué par les racines principales. Les deux types de matériel ne présentent donc pas le même comportement biosynthétique pour les isoflavonoïdes.

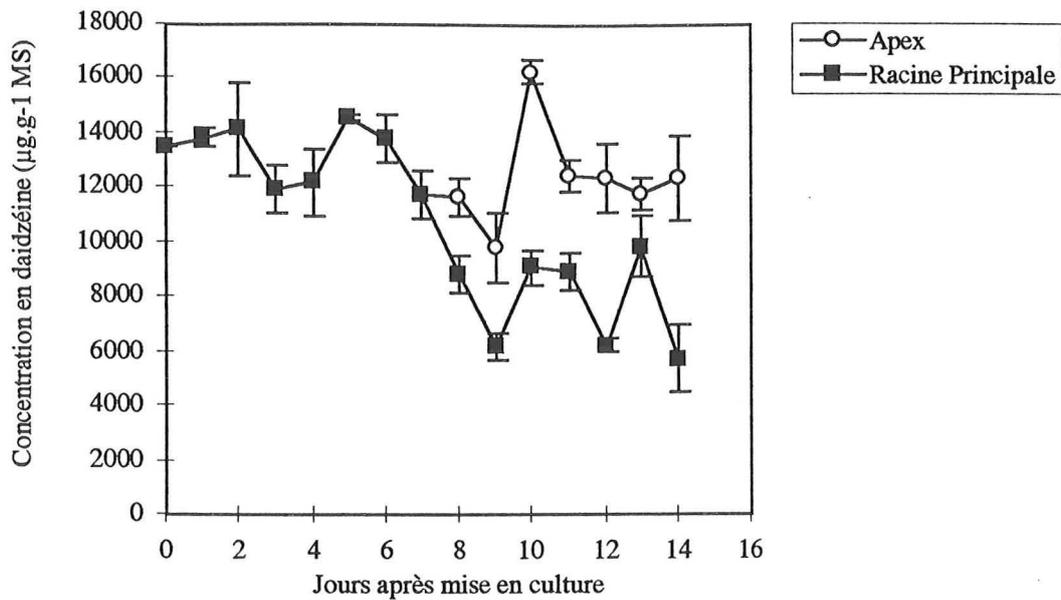


Figure 39a. Cinétique de production de la daidzéine par la racine principale et l'apex d'une racine de la souche RTLach5 cultivée sur milieu B5 liquide. Chaque point est une moyenne établie pour 3 répétitions. Les barres verticales représentent les écarts types.

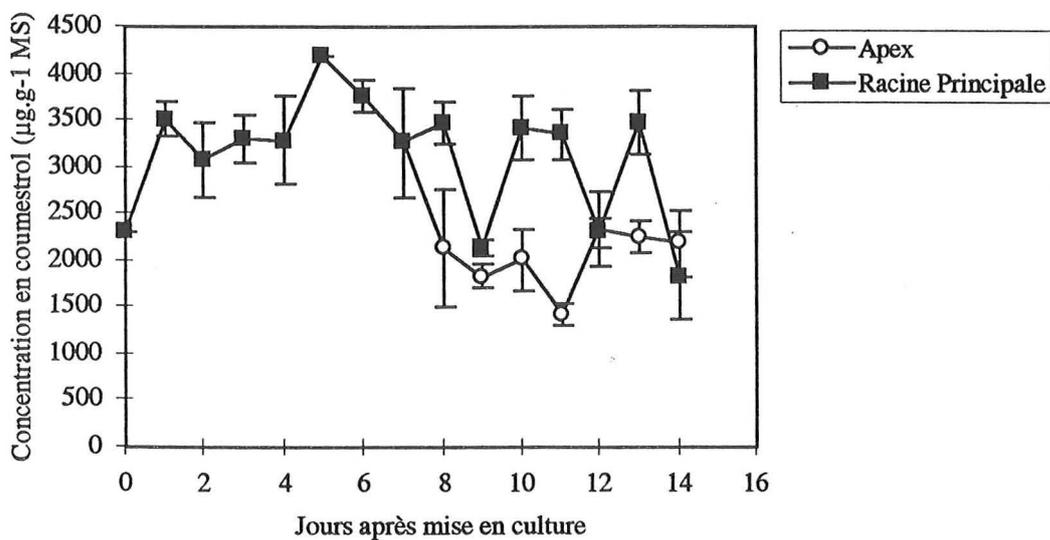


Figure 39b. Cinétique de production du coumestrol par la racine principale et l'apex d'une racine de la souche RTLach5 cultivée sur milieu B5 liquide. Chaque point est une moyenne établie pour 3 répétitions. Les barres verticales représentent les écarts types.

✓ dans les racines d'ordre 2 et les apex

La concentration en daidzéine est importante, relativement constante et s'élève jusqu'à $16000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS. Les teneurs en coumestrol varient peu et diminuent légèrement de $3150 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS à $2500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS.

Ces chiffres semblent indiquer que la synthèse de daidzéine a lieu de façon très active dans ce compartiment racinaire, et qu'elle est proportionnelle à l'augmentation de biomasse que nous avons pu noter sur la figure 34. En ce qui concerne le coumestrol en revanche les concentrations s'amenuisent. La biomasse s'accroissant durant cette période, cette chute des concentrations en coumestrol pourrait traduire une capacité de biosynthèse limitée ou une métabolisation du coumestrol produit en molécules non dosées.

✓ dans les racines principales

La concentration en daidzéine est nettement plus faible que dans les racines d'ordre 2 et diminue encore en fonction du temps. Les hypothèses émises précédemment pour le coumestrol sont envisageables pour la daidzéine dans la racine principale : capacité de biosynthèse réduite avec le temps ou métabolisation de la daidzéine. En revanche, les teneurs en coumestrol sont constantes dans ce compartiment, indiquant d'une part, une évolution proportionnelle des capacités biosynthétiques et de la production de biomasse et, d'autre part, que la diminution de la concentration en daidzéine ne résulte probablement pas de la métabolisation de cette molécule en coumestrol.

L'opposition que l'on peut noter, après cette analyse, entre l'évolution des profils métaboliques pour les deux compartiments abordés est encore plus évidente avec la représentation envisagée dans les figures 39a et 39b. Nous montrons sur ces graphes que pour un métabolite donné, l'évolution des teneurs dans le temps est inverse selon le compartiment racinaire considéré. Ainsi, la daidzéine reste présente en concentration constante dans les racines d'ordre 2 et les apex, mais diminue dans les racines principales. A l'inverse, les concentrations en coumestrol sont stables dans les racines principales et chutent dans le compartiment comprenant racines d'ordre 2 et apex.

Cette représentation des résultats permet également d'expliquer la différence de niveau de biosynthèse observée à partir du 8ème jour sur la figure 37. En fait, la première partie de la courbe constitue une moyenne pour l'ensemble des deux compartiments, racines d'ordre 2 et racine principale. Ce niveau de biosynthèse est très analogue à celui que l'on peut observer dans les racines d'ordre 2 et les apex. Or, à ce stade de l'expérience, les racines d'ordre 2 sont encore très peu développées et ne sont sans doute pas à l'origine des concentrations élevées en daidzéine que nous mesurons. Par conséquent, c'est le compartiment 'racine principale' qui synthétise ces teneurs en daidzéine élevées aux premiers stades de la culture, même si par la suite nous observons un niveau de biosynthèse très inférieur pour ce compartiment. Ces

constatations peuvent sembler contradictoires, cependant, il faut rappeler que les explants mis en culture ont une taille de 2 cm et sont eux-mêmes des racines d'ordre 2 en croissance que nous prélevons sur une préculture de 14 jours. En conséquence, les racines principales sont en fait elles-mêmes des racines d'ordre 2 du jour 0 aux jours 5 et 6 environ. A ce titre, la courbe indiquant les teneurs en daidzéine sur la figure 39a peut être considérée comme effectivement représentative de l'évolution des concentrations au cours du vieillissement d'une racine de la souche RTLach5. Ce résultat est également valable pour les teneurs en coumestrol.

Nous avons choisi de représenter les concentrations en daidzéine et en coumestrol pour appréhender d'une façon relativement simple les sites de biosynthèse et les éventuels mouvements de métabolites entre les différents compartiments établis. Cette représentation nous a permis de montrer que la daidzéine est synthétisée dans les parties jeunes de la racine (apex et racines d'ordre 2) puisque la concentration évolue de façon proportionnelle à la production de biomasse pour ce compartiment alors qu'elle diminue pour dans les racines principales plus vieilles. A l'inverse, les concentrations en coumestrol diminuent dans les racines jeunes mais restent constantes dans les racines principales traduisant une synthèse continue de ce métabolite secondaire dans le matériel plus âgé.

Dans un objectif de production de la daidzéine, une représentation des quantités serait plus judicieuse. Les résultats après 15 jours de culture sont les suivants (Tableau 11) :

Tableau 11: Quantités de daidzéine et de coumestrol récoltées dans la matière sèche après culture de la souche RTLach5 durant 15 jours. Les chiffres représentent des μg de produit par fiole Erlenmeyer. Les écarts types sont calculés pour 3 fioles

	Quantité en $\mu\text{g}/\text{erlen}$	
	Racine principale	Racines d'ordre 2
Daidzéine	25 ± 7	1397 ± 257
Coumestrol	8 ± 3	248 ± 49

De ce tableau nous pouvons déduire que la production de la daidzéine en grandes quantités nécessite une biomasse toujours en croissance de manière à optimiser le nombre de racines d'ordre 2 et d'apex. Dans cet objectif, l'ajout d'hormones de type gibbérelline pourrait améliorer le taux de ramification déjà important (Ben-Hayyim *et al.*, 1996). La taille de l'inoculum de départ (nombre et taille des explants) ainsi que le volume de milieu devraient également être optimisés de façon à limiter la phase de latence avant l'apparition des racines d'ordre 2 (Bhadra et Shanks, 1995). Dans un second temps, il convient bien sûr de déterminer les traitements qui permettront d'augmenter les concentrations en métabolites secondaires de chacun des compartiments que nous avons identifiés. C'est dans ce but que nous avons déterminé les protocoles des expérimentations suivantes.

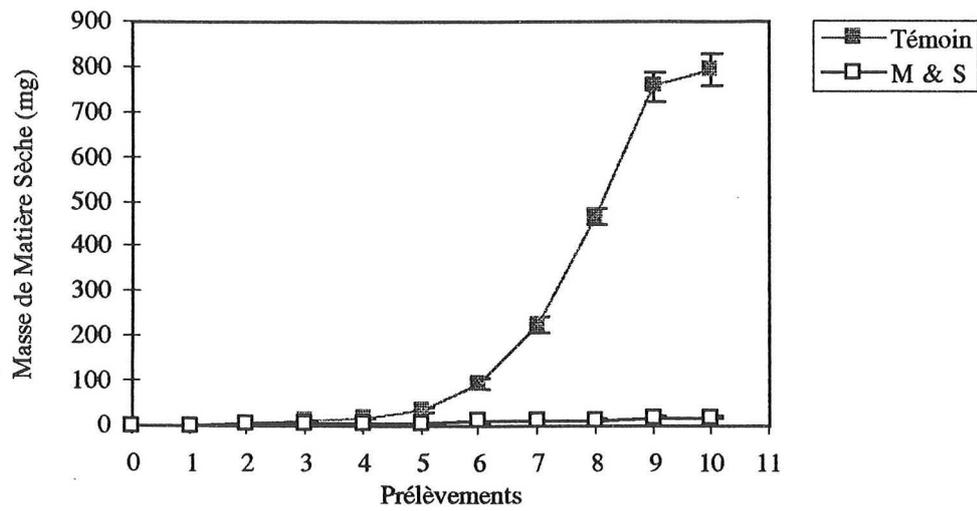


Figure 40. Cinétique de croissance de la souche RTLach5 cultivée sur milieu B5 (Témoin) ou Murashige et Skoog (M & S). Chaque point est une moyenne établie pour 3 répétitions. Les barres verticales représentent les écarts types.

2.3. Influence de la composition des milieux de culture sur la croissance et la production d'isoflavonoïdes par la souche RTLach5

Deux types d'expérimentations ont été conduites dans l'objectif d'améliorer la production d'isoflavonoïdes par la souche RTLach5. Nous avons, dans un premier temps, cultivé les racines de la souche RTLach5 sur un milieu de culture différent, le milieu de Murashige et Skoog (1962). Ce milieu de culture est plus riche que le milieu B5 Témoin (Gamborg *et al.*, 1968) et présente notamment des concentrations en azote (sous forme ammonium), et en phosphate, supérieures. Dans un deuxième temps, nous avons entrepris d'ajouter divers éliciteurs dans le milieu de culture, à des périodes précises du cycle de culture. Les résultats sont présentés pour le chitosane.

2.3.1. Croissance et production d'isoflavonoïdes par RTLach5 cultivée en milieu M & S

2.3.1.1. Influence du milieu M & S sur la croissance de la souche RTLach5

La figure 40 représente la production de biomasse sèche par la souche RTLach5 cultivée sur milieu témoin B5 et sur milieu de Murashige et Skoog. Il est aisé de constater que la composition du milieu de culture a une grande incidence sur la production de matière sèche par la souche RTLach5. En effet, alors que les racines cultivées sur milieu B5 produisent jusqu'à 790 mg de matière sèche, la biomasse récoltée après culture sur milieu M & S est inférieure à 20 mg.

La croissance sur milieu témoin est identique à celle que nous avons pu obtenir auparavant au cours des expériences de cinétique sur RTLach5 et lors du dosage du souchier. Elle se fait selon 3 phases également : une phase de latence d'une durée de 11 jours, la phase exponentielle qui débute le 14ème jour et se prolonge jusqu'au jour 18, puis une phase de ralentissement de croissance qui apparaît à partir du jour 21 et se traduit par l'amorce d'un plateau. La phase de latence est une fois encore relativement longue comparée à celle que nous avons mesurée dans le cadre de l'étude morphologique de la souche RTLach5, mais présente une durée analogue à celle établie lors de l'étude cinétique de la production d'isoflavonoïdes. En outre, nous pouvons observer que la durée de la phase exponentielle de croissance est remarquablement constante d'une expérience à la suivante, d'une durée de 8 jours. Les écarts types mesurés sur 3 fioles Erlenmeyer pour chaque traitement sont faibles et indiquent une reproductibilité de la croissance de la souche RTLach5.

En ce qui concerne le traitement M & S, il semble le milieu Murashige et Skoog soit inadapté à

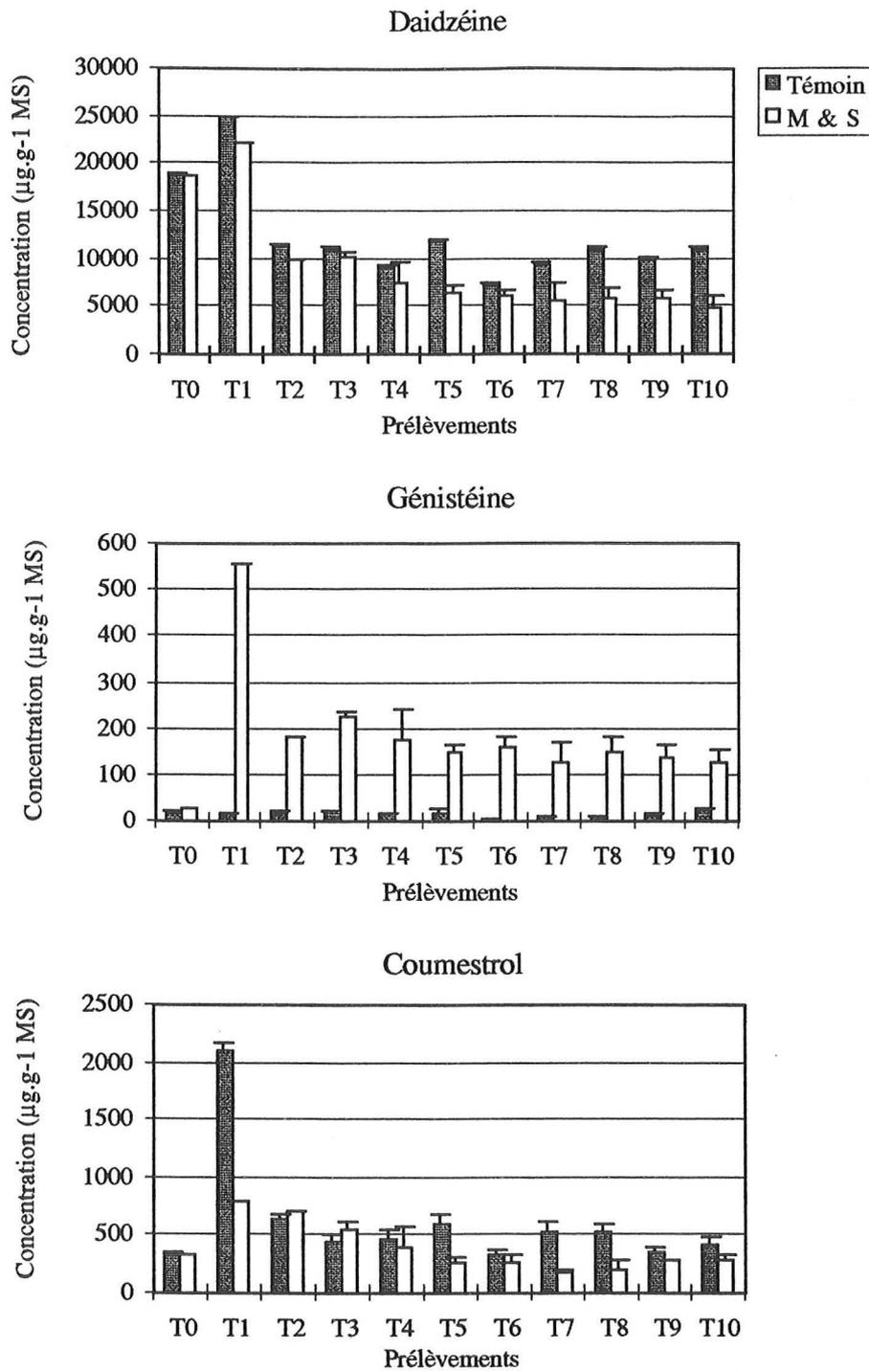


Figure 41. Production d'isoflavonoïdes par les racines de la souche RTLach5 cultivées sur milieu B5 (Témoin) et Murashige et Skoog (M & S). Chaque histogramme est une moyenne établie pour 3 répétitions. Les barres verticales représentent les écarts types.

la croissance de la souche RTLach5. Ce milieu est plus riche en ions nitrate et phosphate que le milieu témoin B5. Nguyen *et al.* (1992) ont montré que des concentrations doublées en nitrate diminuaient d'un facteur 4 la production de matière sèche par la souche RTLach1. Payne *et al.* (1987) précisent également que l'addition de nitrate dans les milieux de culture des racines transformées de *Datura stramonium* provoque une diminution de leur croissance mais une amélioration des rendements en métabolites secondaires. La chute de production de biomasse par la souche RTLach5 cultivée sur milieu M & S pourrait par conséquent résulter de la forte concentration en ions nitrate.

Il est également possible que nous soyons confronté un phénomène 'd'adaptation' de la souche RTLach5 au milieu de culture B5. En effet, cette souche de racines transformées est cultivée sur le milieu de Gamborg *et al.* (1968) depuis plus de 4 ans. Par conséquent, nous avons pu sélectionner, de façon involontaire, les apex dont la production de biomasse est la meilleure sur le milieu B5. La croissance de cette souche totalement adaptée à la composition du milieu B5 serait ainsi fortement perturbée lors de la mise en culture sur un milieu de composition différente.

Nous avons montré lors de l'étude de la morphologie de la souche RTLach5 que la production d'apex et de racines d'ordre 2 était l'élément prépondérant pour la production des isoflavonoïdes recherchés. La croissance étant fortement ralentie sur milieu M & S, il faudrait que le rendement en métabolite soit nettement amélioré pour parvenir à augmenter la production de daidzéine et de coumestrol par culture des racines transformées RTLach5 sur ce milieu.

2.3.1.2. Influence du milieu M & S sur la production d'isoflavonoïdes par la souche RTLach5

Les concentrations déterminées dans la matière sèche de la souche RTLach5 pour les 3 molécules identifiées sont représentées sur la figure 41. Il apparaît que la daidzéine, la génistéine et le coumestrol sont synthétisés sur milieu témoin et également sur milieu M & S. La daidzéine et le coumestrol ont déjà été identifiés dans les racines issues de *Psoralea lachnostachys* lors du dosage du souhier. La génistéine en revanche n'avait pu être mise en évidence que dans les cultures de cals cultivés dans des conditions de culture particulières (addition de *p*-coumarate, culture pendant une durée de 60 jours). Dans le cadre de cette expérience, ce métabolite est identifié dès la mise en culture liquide dans le traitement témoin. Cependant, il faut constater que les concentrations mesurées sont très faibles, de l'ordre de quelques $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS, et qu'il est possible, en conséquence, qu'elles n'aient pas été détectées lors des expérimentations précédentes.

Les 3 métabolites ne sont pas produits dans les mêmes proportions. Les concentrations en daidzéine sont en effet très supérieures à celles de la génistéine et du coumestrol. Ainsi, pour les traitements témoins, les concentrations en daidzéine, coumestrol et génistéine sont voisines

de 10000, 470 et 8 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS, respectivement. Cependant, le profil de l'évolution en fonction du temps est identique pour ces 3 molécules : les concentrations sont élevées lors du premier prélèvement (T1) puis diminuent et restent constantes jusqu'à la fin de la période de culture. Cette augmentation des concentrations détectée pour le prélèvement T1 pourrait résulter de la contrainte appliquée aux racines lors de la mise en culture. Dans ce cas, les molécules synthétisées seraient ensuite catabolisées en métabolites non analysés dans les trois jours suivants, étant donné que les concentrations dans la matière sèche diminuent et que ces molécules ne sont pas retrouvées dans le milieu de culture.

La mise en culture sur milieu M & S induit des réponses métaboliques différentes en ce qui concerne la production d'isoflavonoïdes. En effet, les concentrations en daïdzéine et en coumestrol sont les plus fortes pour les traitements témoins, alors que la génistéine est synthétisée de façon très majoritaire sur le milieu M & S. Ce dernier résultat traduit une incidence de la composition du milieu de culture sur la production à la fois qualitative et quantitative de métabolites secondaires par la souche RTLach5. Par ailleurs, nous constatons que la génistéine est synthétisée par les racines transformées uniquement dans des conditions qui diffèrent des conditions témoins. Ce phénomène a déjà été observé pour les cultures de cals. Il est par conséquent possible que cette molécule ne soit produite par les cultures *in vitro* de Psoralées qu'en conditions de contrainte. Ce résultat est à prendre en considération si l'on envisage sa production. En effet, la génistéine est un métabolite secondaire qui présente un grand intérêt en tant que molécule biologiquement active contre de multiples désordres affectant les mécanismes de la croissance cellulaire (Wei *et al.*, 1995). Sa synthèse non détectable dans les conditions témoin, pourrait être envisagée à partir des cultures *in vitro* de Psoralées sur milieux modifiés ou élicités.

La culture des racines de la souche RTLach5 sur le milieu M & S limite très fortement la production de biomasse, et entraîne en outre une diminution des teneurs en daïdzéine et coumestrol dans des proportions variant de 15 à 50% selon le temps de prélèvement et la molécule envisagés. Par conséquent, ce traitement conduit à une chute des rendements pour ces deux métabolites et s'avère inadapté pour la production de daïdzéine en grandes quantités. En revanche, la culture sur milieu M & S permet de mettre en évidence la synthèse de génistéine, molécule appartenant également à la famille chimique des isoflavonoïdes, à des concentrations voisines de 150 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS. Ces concentrations sont inférieures à celles mesurées dans la matière de la souche de cals Obt15 (570 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS), mais sont susceptibles d'être améliorées rapidement par des cultures de ces 2 types d'explants sur des milieux modifiés. L'utilisation des racines transformées de la souche RTLach5 présenterait dans ce cas tous les avantages de la production de métabolites secondaires par des cultures de tissus stables que nous avons précisés dans les éléments bibliographiques.

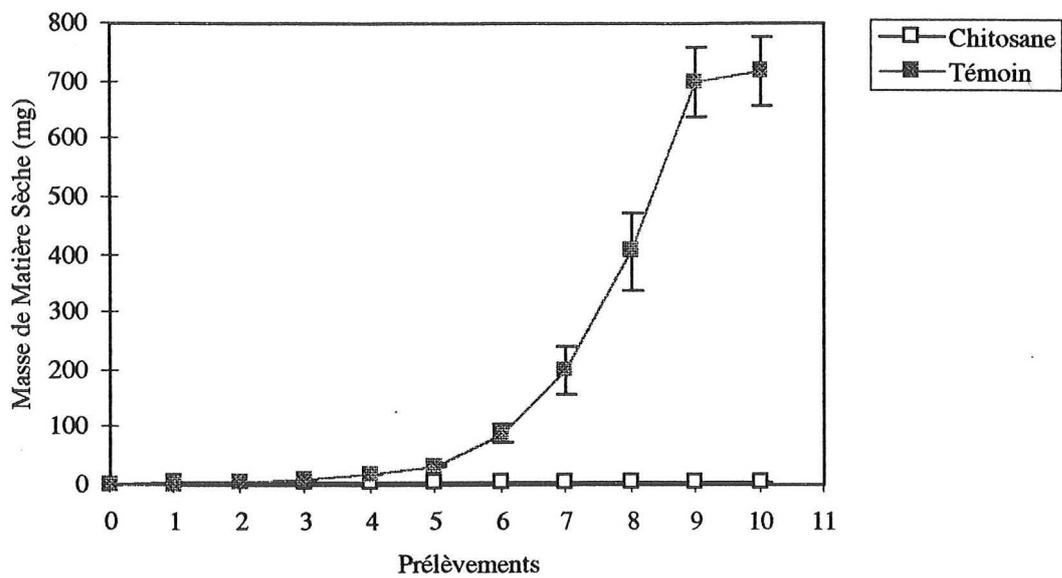


Figure 42. Cinétique de croissance de la souche RTLach5 cultivée sur milieu B5 (Témoin) ou B5 additionné de chitosane à une concentration de 30 mg.l^{-1} (Chitosane). Chaque point est une moyenne établie pour 3 répétitions. Les barres verticales représentent des écarts types.

2.3.2. Croissance et production d'isoflavonoïdes par RTLach5 cultivé en présence de chitosane

Le chitosane s'obtient industriellement par hydrolyse alcaline de la chitine. De nombreux auteurs ont souligné son aptitude à stimuler la synthèse des métabolites secondaires (Funk et Brodelius, 1990 ; Sauerwein *et al.*, 1991). Nous avons précédemment testé l'efficacité de cette molécule pour améliorer la production d'isoflavonoïdes par les cals de Psoralées.

Dans le cadre de l'expérimentation conduite avec la souche RTLach5, nous l'avons additionné au milieu de culture B5 à une concentration de 30 mg.l⁻¹. Deux expériences sont conduites sur la souche RTLach5. En effet, Nguyen *et al.* (1992) rapportent que cet éliciteur réduit la croissance de RTLach1 par un facteur 6. Par ailleurs, nous avons pu constater sur les cals de Psoralées que le chitosane s'avère toxique et limite très fortement la croissance de ce matériel végétal. Par conséquent, nous avons dans un premier temps vérifié ce phénomène sur la souche RTLach5 en additionnant le chitosane au milieu de culture dès le premier jour de culture. Dans une seconde expérience, l'éliciteur n'est ajouté au milieu de culture qu'à l'issue d'une période de culture de 21 jours, de façon à pouvoir observer les effets de cette molécule sur la production d'isoflavonoïdes sans altérer l'évolution de la biomasse qui permet cette synthèse.

2.3.2.1. Effet de l'addition de chitosane au temps T0 sur la production de biomasse et d'isoflavonoïdes par la souche RTLach5

2.3.2.1.1. Influence de l'addition de chitosane au temps T0 sur la croissance de la souche RTLach5

La courbe de croissance de la souche RTLach5 est représentée sur la figure 42. Si la production de biomasse par le traitement témoin correspond aux résultats escomptés, nous constatons sur ce graphe que le chitosane limite très fortement la croissance de la souche RTLach5. En effet, la biomasse sèche récoltée à l'issue des 21 jours de culture représente plus de 700 mg dans le cas du traitement témoin alors que la valeur maximale atteinte pour le traitement chitosane sur cette même période de culture n'est que de 4,8 mg, soit à peine deux fois la biomasse de l'inoculum.

La croissance de la souche RTLach5 en condition témoin est identique à celle des expérimentations précédentes, se découplant en trois phases successives. Les écarts types établis sur 3 fioles Erlenmeyer sont supérieurs à ceux que nous avons obtenus pour le traitement témoin lors de l'expérimentation conduite sur milieu M & S. Nous constatons par ailleurs que ces écarts types deviennent importants à partir de la moitié de la période de culture, au moment où la croissance des racines d'ordre 2 est la plus intense. Ce phénomène avait été signalé lors de

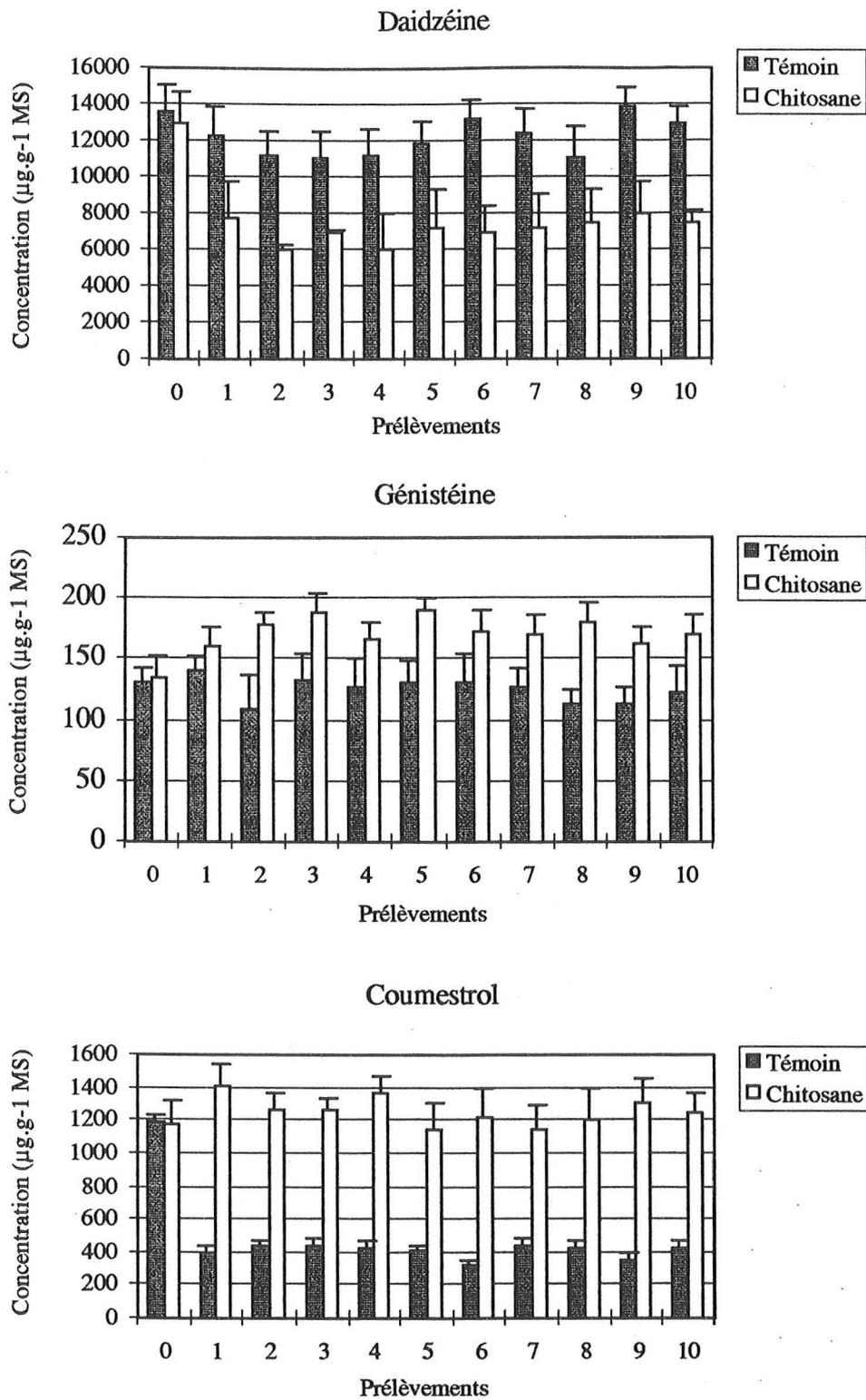


Figure 43. Production d'isoflavonoides par les racines de la souche RTLach5 cultivées sur milieu B5 (Témoin) et B5 additionné de $30 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de chitosane (Chitosane). Chaque histogramme est une moyenne établie pour 3 répétitions. Les barres verticales représentent les écarts types.

l'expérimentation menée sur la morphologie de la souche RTLach5, et semble confirmer le caractère plus aléatoire de la production de biomasse en raison de la ramification du réseau racinaire intense de cette souche.

L'ajout de chitosane dans le milieu dès le premier jour de culture de la souche RTLach5 provoque une inhibition de croissance. Les racines cultivées dans ces conditions brunissent très rapidement et les apex se nécrosent. Ce résultat confirme donc celui que nous avons obtenu pour les cultures de cals issus de *Psoralea cinerea*. L'effet inhibiteur de croissance est encore plus drastique pour la souche RTLach5 que pour la souche RTLach1. En effet, Nguyen *et al.* (1992) observent la réduction par un facteur 6 de la croissance de RTLach1. Dans notre cas, ce facteur est de 175, valeur voisine de celle calculée pour la souche RTLach5 cultivée sur milieu de Murashige et Skoog. Nguyen *et al.* (1992) expliquent l'inhibition de la croissance de la souche RTLach1 par la présence d'acide acétique dans le milieu de culture, acide acétique utilisé lors de la préparation du chitosane, et capable de chélater certains cations essentiels à la croissance des racines transformées. Dans le cas de la souche RTLach5, ce fait ne peut pas être impliqué. En effet, le chitosane additionné au milieu de culture est solubilisé dans de l'eau ultrapure pendant 24 heures, sans adjonction d'acide acétique. L'inhibition de croissance constatée pour la souche RTLach5 ne peut donc résulter que d'une toxicité liée au chitosane.

2.3.2.1.2. Influence de l'addition de chitosane au temps T0 sur la production d'isoflavonoïdes par la souche RTLach5

L'analyse de la matière sèche récoltée à l'issue de 3 semaines de culture révèle la présence de 3 molécules de la famille des isoflavonoïdes : la daidzéine, la génistéine et le coumestrol. Les concentrations sont représentées pour les 3 molécules sur la figure 43. Ainsi que nous avons pu l'observer pour les traitements témoins de l'expérience de culture sur milieu Murashige et Skoog, les 3 métabolites sont synthétisés quel que soit le traitement.

La daidzéine est détectée de façon majoritaire dans le traitement témoin, à des concentrations avoisinant $12000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS. Cette valeur est supérieure à celle que nous avons mesurée pour le traitement témoin de l'expérience précédente, et reste constante durant toute la durée du cycle de culture. En revanche, les concentrations en daidzéine mises en évidence pour le traitement chitosane diminuent entre le moment de la mise en culture (T0) et le prélèvement (T1), puis se stabilisent à une valeur de $7000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS, inférieure à celle du traitement témoin, pour le reste de la durée du cycle de culture. Ce résultat indique que le potentiel de synthèse de la daidzéine est tout d'abord réduit par le traitement chitosane, dans un délai relativement court puisque 3 jours séparent les 2 prélèvements T0 et T1. Il est également possible que la daidzéine synthétisée soit en partie métabolisée ou excrétée. Le fait que cette concentration se stabilise ensuite pourrait indiquer un arrêt de la synthèse de daidzéine. En effet, la biomasse étant quasi

constante sur la durée du cycle de culture, l'évolution de la concentration représente celle de la quantité de daidzéine dans la matière sèche. Une seconde hypothèse impliquerait une synthèse très faible de daidzéine, dans des proportions équivalentes à celle de la production, également très faible, de biomasse. Cette explication nous semble la plus vraisemblable. Il serait en effet assez peu probable que la daidzéine contenue dans la matière sèche avant la mise en culture sur milieu élicité ne soit pas dégradée sur une période de 3 semaines de culture, ce que nous devrions admettre dans le cas d'un arrêt complet de la synthèse de ce métabolite.

En ce qui concerne la génistéine, les concentrations détectées pour le traitement chitosane sont du même ordre de grandeur que celles que nous avons mesurées sur milieu Murashige et Skoog. Il faut cependant noter que les concentrations à T0 sont plus élevées que lors de l'expérience précédente. En effet, alors que les concentrations dans la matière sèche des traitements témoins était de $8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS, des valeurs supérieures à $100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS sont détectées pour les témoins dans cette expérimentation. Par ailleurs, les concentrations détectées pour les traitements chitosane augmentent entre T0 et T1, et sont supérieures à celles des traitements témoins pour lesquels les valeurs diminuent puis se stabilisent de T2 à T10. La génistéine semble donc être produite en quantité supérieure lorsque les racines sont placées en conditions de contrainte, phénomène observé également lorsque les racines de la souche RTLach5 sont mises en culture sur milieu Murashige et Skoog. Les concentrations recueillies peuvent résulter d'une synthèse accrue de la génistéine, mais pourraient également provenir de la métabolisation de la daidzéine dont nous avons vu précédemment que la concentration était réduite en présence de chitosane. En effet, ces 2 métabolites ne diffèrent entre eux que par la présence en position 4' d'un groupement OH sur la molécule de génistéine.

Il est surprenant que des concentrations aussi fortes soient mises en évidence pour les traitements témoins. En effet, la génistéine n'a pas pu être détectée lors du dosage du souchier ou de l'expérience de cinétique détaillée au début de ce chapitre. Pourtant, elle est mise en évidence dans les traitements témoins des deux dernières expérimentations relatées. Si la génistéine est synthétisée de façon constitutive, il semble très peu probable que nous ne l'ayons pas détectée lors du dosage du souchier et *a fortiori* au cours de l'expérience de cinétique, alors que des prélèvements sont effectués tous les 3 jours. En cas de synthèse de ce métabolite dans des conditions de contrainte, il semble difficile d'expliquer la présence de génistéine dans la matière sèche des traitement témoins. Une hypothèse peut toutefois être émise : bien que tous les paramètres soient apparemment contrôlés (température, humidité, âge de la préculture, choix des explants, taille de l'inoculum...), il est possible que d'autres facteurs nous échappent et soient source de contrainte pour les traitements témoins des diverses expérimentations relatées. En effet, des éléments comme la quantité et la qualité de l'air, le pH ou l'obtention d'une obscurité parfaite dans la fiole Erlenmeyer ne sont pas vérifiés et homogénéisés d'une culture à la suivante. Or ces facteurs peuvent constituer des contraintes pour la culture des racines transformées (Sharp et Doran, 1990). Nous pensons par conséquent que la génistéine, qui est une phytoalexine, peut effectivement être synthétisée en conditions de contrainte, et que divers

paramètres de culture échappent à notre contrôle et sont responsables de la présence de ce métabolite dans les traitements témoins des expérimentations sur milieu Murashige et Skoog et sur milieu élicité avec du chitosane.

L'évolution des concentrations en coumestrol est analogue à celle de la génistéine, mais pour des teneurs supérieures. Les traitements témoin présentent des concentrations inférieures aux traitements chitosane, concentrations qui diminuent entre T0 et T1 puis se stabilisent par la suite autour d'une valeur de $400 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS. En revanche, la concentration augmente légèrement dans le cas du traitement chitosane mais se stabilise également jusqu'à la fin du cycle de culture. Les écarts types sont plus grands pour les concentrations du traitement chitosane que pour les traitements témoins, traduisant une variabilité de la production de coumestrol accentuée en cas de contrainte. De la même façon que pour la génistéine, l'augmentation de la concentration en coumestrol dans la matière sèche du traitement chitosane pourrait provenir de la métabolisation d'une partie de la daidzéine synthétisée. Rappelons en effet que le coumestrol est le métabolite situé immédiatement après la daidzéine dans la chaîne de biosynthèse des isoflavonoïdes.

Les concentrations en coumestrol à T0 sont supérieures d'un facteur 3 à celles que nous avons détectées pour cette même molécule à T0 dans le cas d'une culture sur milieu M & S. Les niveaux de synthèse de la molécule de coumestrol semblent donc, tout comme la génistéine, subir des variations que nous ne contrôlons pas dans nos conditions de culture. Toutefois, à l'inverse de la génistéine, le coumestrol est systématiquement identifié dans la matière sèche de la racine RTLach5, et la concentration la plus faible que nous ayons pu noter est supérieure à $400 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS.

L'analyse des milieux de culture révèle la présence de daidzéine à des concentrations inférieures à $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS dans le cas du traitement chitosane pour les prélèvements T6 à T10. Cette daidzéine provient de l'excrétion dans le milieu de culture du métabolite synthétisé dans la matière sèche. Cependant, étant données la variabilité des concentrations dans la matière sèche et les faibles concentrations mesurées dans les milieux de culture, il nous est impossible déterminer si l'excrétion résulte d'un mécanisme actif ou du relargage de cette molécule dans le milieu de culture en raison de la nécrose des tissus provoquée par le traitement chitosane. La daidzéine est le métabolite le plus concentré dans la matière sèche. Par conséquent, il est logique qu'il soit le premier détecté dans les milieux de culture si le mécanisme d'excrétion est passif. Ceci ne signifie pas que les deux autres molécules ne le soient pas également. Si le mécanisme d'excrétion est passif, le relargage de la génistéine et du coumestrol sera proportionnel aux teneurs présentes dans la matière sèche. Or, les teneurs en génistéine et en coumestrol sont très inférieures à celles de la daidzéine dans la matière sèche. Par conséquent, ces deux métabolites sont peut être effectivement excrétés mais dans des concentrations que nous ne pouvons pas détecter avec notre méthode d'analyse.

La culture des racines RTLach5 sur le milieu enrichi en chitosane améliore la production de génistéine et de coumestrol, mais réduit la concentration en daidzéine. L'action élicitrice de cette molécule n'avait également pas pu être mise en évidence dans le cas des cultures de cals de *Psoralea cinerea* pour lesquelles les concentrations en daidzéine étaient supérieures d'un facteur 10 pour les traitements témoin. En outre, le chitosane provoque la nécrose des tissus mis en culture et inhibe très fortement la croissance de la souche RTLach5 dont la biomasse finale à l'issue d'un cycle de 3 semaines de culture se limite à deux fois celle de l'inoculum. Par conséquent, ce traitement conduit à une chute des rendements et semble inapproprié à la production de daidzéine et de coumestrol.

En revanche, l'addition de chitosane permet de provoquer une excrétion de la daidzéine dans le milieu de culture. Même si la concentration reste très faible ($10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS), il est important de noter que c'est la première fois qu'un tel phénomène est mis en évidence dans le cadre de cette étude. Nous avons cependant déjà pu constater la présence de daidzéine et de coumestrol dans les milieux de culture de 3 souches de racines transformées cultivées en milieu liquide (Bourgaud et al., 1995). Il s'agissait alors de dosages uniques réalisés après quatre semaines de culture, la dernière étant réalisée sur milieu additionné de chitosane.

Il semble que ce phénomène résulte d'une excrétion passive de la daidzéine et non pas de la nécrose des tissus. Cela signifie que la molécule, produite en grandes quantités, pourrait être récoltée facilement sans intervenir sur la biomasse. Ainsi, une souche pourrait être cultivée en renouvelant le milieu de culture qui serait ensuite extrait pour récolter la molécule produite.

Par ailleurs, l'ajout de chitosane permet d'améliorer la synthèse de génistéine, métabolite dont nous avons précisé les intérêts antérieurement. Ce métabolite est synthétisé également dans les conditions témoins, ce qui nous interroge sur notre maîtrise des conditions de culture. En effet, la génistéine semble être synthétisée dans des conditions de contraintes appliquées au milieu dans les autres expérimentations que nous avons conduites. Sa présence dans la matière sèche des traitements témoin signifierait que nos paramètres de culture ne sont pas strictement identiques d'une expérience à la suivante, et par conséquent constitueraient des facteurs de contrainte 'parasites'.

Devant la réduction drastique de la production de biomasse dans le cas des traitements chitosane, nous avons envisagé de renouveler l'expérience en modifiant les conditions de culture. Les racines de la souche RTLach5 sont ainsi cultivées sur milieu témoin durant 3 semaines afin d'obtenir une biomasse suffisante avant l'addition du chitosane. De plus, la daidzéine étant excrétée dans les conditions du traitement chitosane, nous avons envisagé un suivi de cette molécule dans le milieu de culture à des intervalles de temps très rapprochés de 3 heures durant une période d'une semaine.

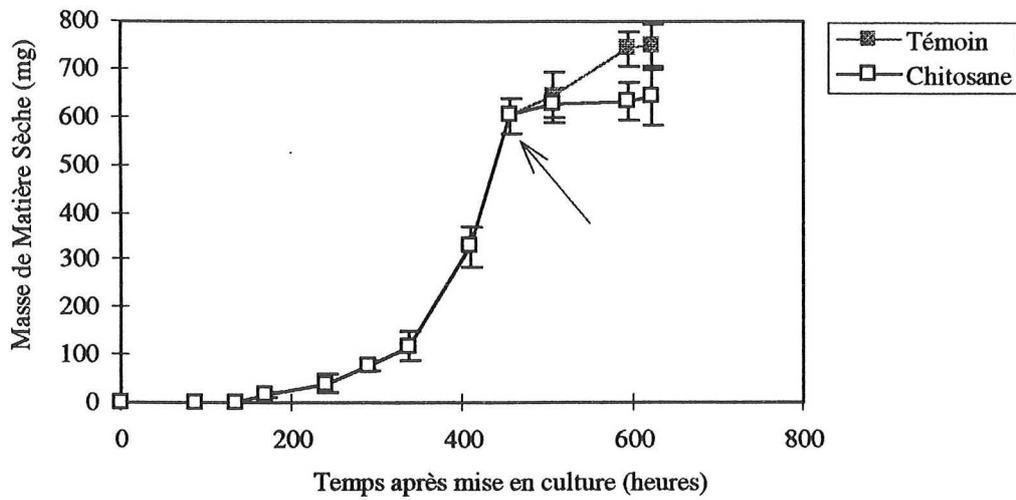


Figure 44. Cinétique de croissance de la souche RTLach5 cultivée durant 21 jours sur milieu B5, puis sur milieu B5 (Témoin) ou B5 additionné de 30 mg.l⁻¹ de chitosane (Chitosane). La flèche indique le moment les milieux neufs sont ajoutés. Chaque point est une moyenne établie pour 3 répétitions. Les barres verticales représentent les écarts types.

2.3.2.2. Effet de l'addition de chitosane sur la production de biomasse et d'isoflavonoïdes par une culture de RTLach5 âgée de 21 jours

Trois fioles Erlenmeyers sont prélevées tous les 3 jours durant 21 jours pour déterminer la croissance de la souche RTLach5 ainsi que la production d'isoflavonoïdes. A l'issue de cette période, 50 ml de milieu neuf, enrichi ou non de chitosane à 30 mg.l⁻¹, sont ajoutés aux milieux de culture des traitements témoin et chitosane respectivement. La semaine qui suit cette manipulation, 3 fioles sont à nouveau prélevées tous les 3 jours, pour chaque traitement. En outre, une cinétique d'excrétion des métabolites secondaires dans le milieu de culture est réalisée sur une période d'une semaine pour ces 2 traitements.

2.3.2.2.1. Influence sur la croissance de la souche RTLach5

L'évolution de la production de biomasse par la souche RTLach5 dans les conditions de culture des traitements témoin et chitosane est indiquée sur la figure 44. L'allure de la courbe que nous obtenons pour les 21 premiers jours de culture, ainsi que la biomasse récoltée sont analogues à celles que nous avons obtenues par ailleurs pour cette même souche. La phase de latence s'étend sur 9 jours, suivie par la phase exponentielle d'une durée de 11 jours. L'addition des milieux neufs est effectuée juste avant l'amorce d'un ralentissement de croissance.

Les courbes de croissance obtenues pour les racines de la souche RTLach5 sont différentes selon le traitement. En effet, l'addition de 50 ml de milieu neuf provoque une reprise de la croissance pour les traitements témoin. Ce phénomène semble pourtant être limité dans le temps puisqu'il est possible de constater un fléchissement de la courbe entre l'avant-dernier et le dernier prélèvement. Nous aurions pu nous attendre à une reprise de croissance selon 3 phases également. Cependant, l'étude n'est réalisée que sur 4 prélèvements, ce qui est insuffisant pour appréhender le phénomène. De plus, lorsque nous ajoutons les 50 ml de milieu neuf, la biomasse racinaire est déjà de 600 mg, alors qu'au début de la culture, ce même volume de milieu était disponible pour 3 apex en croissance d'une biomasse voisine de 2 mg. Par conséquent, si l'apport de milieu neuf permet de régénérer le milieu de culture, il est sans doute insuffisant pour permettre une reprise de croissance exponentielle.

En ce qui concerne le traitement chitosane, nous constatons que la croissance est inférieure à celle du traitement témoin. La reprise de croissance qui se produit dans le traitement témoin est inhibée par la présence du chitosane. L'inflexion de la courbe observée pour ce traitement résulte de l'effet combiné de l'apport de milieu neuf, qui améliore la croissance, et du chitosane qui la limite.

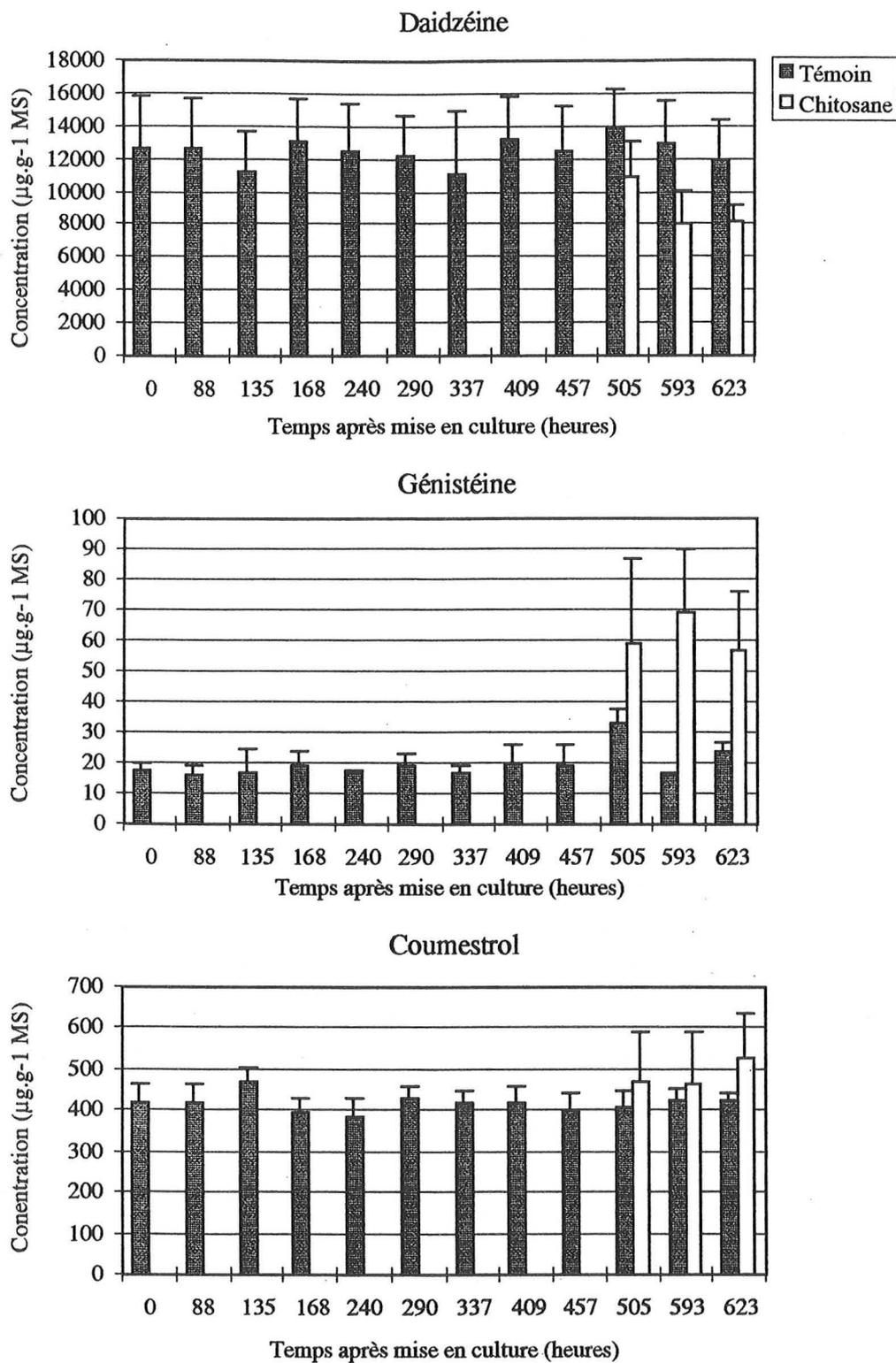


Figure 45. Production d'isoflavonoides par les racines de la souche RTLach5 cultivée durant 21 jours sur milieu B5, puis sur milieu B5 (Témoin) ou additionné de 30 mg.l⁻¹ de chitosane (Chitosane) durant une semaine. Chaque histogramme est une moyenne établie pour 3 répétitions. Les barres verticales représentent les écarts types.

2.3.2.2.2. Influence sur la production d'isoflavonoïdes par la souche RTLach5

La figure 45 représente la production de daidzéine, génistéine et coumestrol dans la matière sèche de la souche RTLach cultivée en présence ou non de chitosane pendant la dernière semaine du cycle de culture.

Pendant la première période de 21 jours, les résultats sont identiques à ceux escomptés. En effet, les 3 molécules synthétisées par les racines RTLach5 sont identifiées dans des concentrations analogues à celles des cultures précédentes. Par ailleurs, les concentrations restent constantes durant les 21 premiers jours de culture, présentant des valeurs voisines de 12000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS pour la daidzéine, 20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS pour la génistéine et 400 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS en ce qui concerne le coumestrol. Les concentrations en génistéine et coumestrol récoltées sont intermédiaires entre celles obtenues lors des expérimentations de culture sur milieu Murashige et Skoog et d'élicitation par adjonction de chitosane dès le premier jour de la culture. En revanche, la concentration en daidzéine reste remarquablement constante pour ces 3 expériences, ce qui semble confirmer le caractère aléatoire de la synthèse de génistéine et de coumestrol, molécules probablement plus sensibles que la daidzéine à des facteurs de contrainte non encore identifiés. L'ajout de milieu neuf ne semble pas avoir d'incidence sur la production des 3 métabolites, sauf pour la génistéine, 3 jours après l'ajout. Au contraire, l'addition de milieu neuf enrichi en chitosane provoque une chute de la production de daidzéine et une amélioration des concentrations en génistéine et coumestrol. Les différences entre traitements témoin et chitosane sont statistiquement mises en évidence au seuil de 5 %. Ce phénomène avait pu être vérifié sur les expériences précédentes, et résulte effectivement de l'ajout du chitosane puisque l'addition de milieu neuf au milieu de culture ne provoque pas de modification en terme de production d'isoflavonoïdes. Par ailleurs, nous constatons une fois encore que les écarts types représentés pour les traitements chitosane sont supérieurs à ceux des traitements témoins correspondants, ce qui indique un niveau de synthèse plus variable dans les conditions de contraintes pour la génistéine et le coumestrol.

L'analyse des milieux de culture correspondants aux divers traitements a été réalisée et ne révèle la présence d'aucun métabolite secondaire, et ce, quel que soit le temps de prélèvement envisagé. Ce résultat est différent de celui que nous avons obtenu dans le cas d'une culture inoculée sur un milieu contenant du chitosane. Il faut cependant préciser que seule la daidzéine avait été détectée, à des concentrations très faibles, et pour les prélèvements effectués après 2 semaines de culture sur ce milieu de culture. Dans le cas présent, le chitosane ne se trouve dans le milieu que durant une semaine. Il paraît donc possible que l'excrétion dans le milieu n'est pas pu avoir lieu dans le temps imparti.

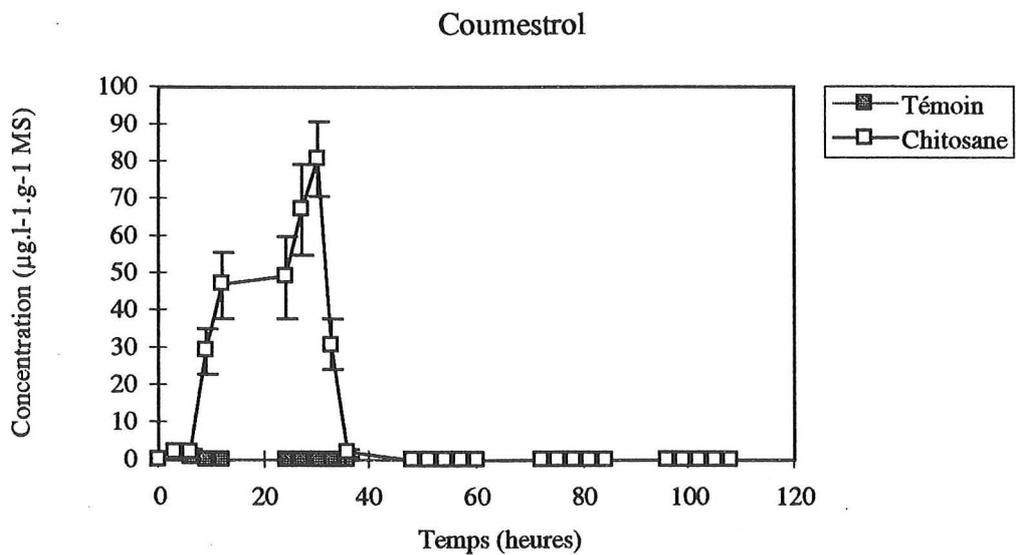
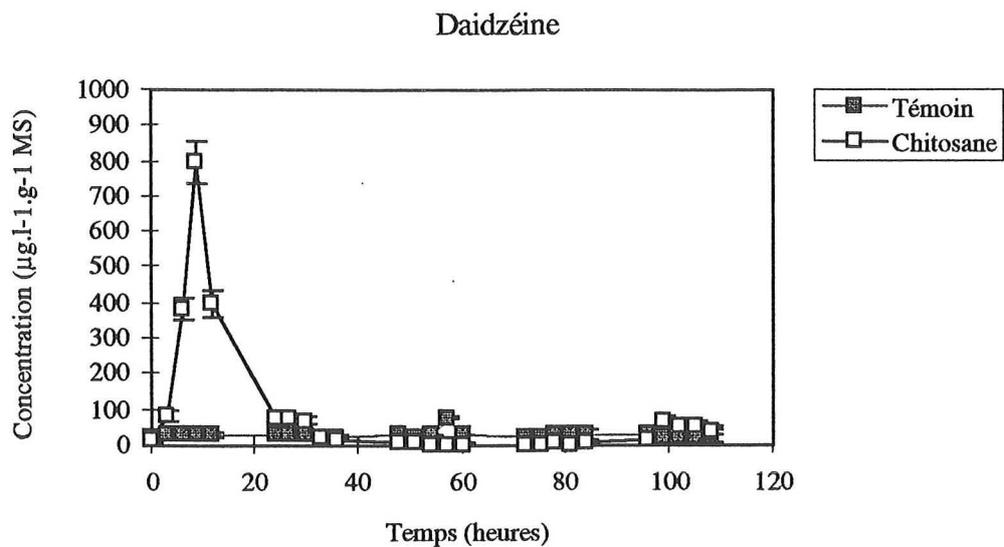


Figure 46. Cinétique d'excrétion des isoflavonoïdes dans le milieu de culture par les racines de la souche RTLach5 cultivées sur milieu B5 (Témoin) ou sur milieu B5 additionné de 30 mg.l⁻¹ de chitosane (Chitosane). Chaque point est une moyenne établie pour 3 répétitions. Les barres verticales représentent les écarts types.

L'excrétion de daïdzéine n'ayant lieu que pour les traitements chitosane et dans des conditions mal définies, nous avons entrepris de suivre l'excrétion éventuelle des isoflavonoïdes dans le milieu de culture à des intervalles de temps très rapprochés, dans le but d'expliquer ce phénomène ainsi que la chute des concentrations en daïdzéine dans la matière sèche des traitements chitosane.

2.3.2.3. Cinétique d'excrétion des isoflavonoïdes dans le milieu de culture après traitement au chitosane

Les résultats de l'expérimentation sont représentés sur la figure 46. Nous pouvons constater que la daïdzéine n'est pas le seul métabolite excrété dans ces conditions de prélèvement. En effet, le coumestrol est également détecté dans les milieux de culture analysés. Nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de génistéine.

La daïdzéine est mise en évidence dans les traitements témoin et chitosane. Cependant, les proportions sont très différentes. Les concentrations mesurées dans le cas du traitement témoin sont voisines de $25 \mu\text{g.l}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MS}$ et restent constantes durant toute la période d'analyse. Les valeurs mesurées pour les mêmes temps de prélèvements dans le cas du traitement chitosane évoluent très différemment. En effet, une très forte augmentation de la concentration en daïdzéine se produit dans les 9 heures qui suivent l'ajout de chitosane dans le milieu de culture. Ce pic est très bref puisque les concentrations rejoignent les valeurs des témoins en moins de 24 heures. Ce résultat est apparemment en contradiction avec ceux que nous avons obtenu dans le cas des expérimentations précédentes. En effet, l'ajout de chitosane au milieu de culture provoquait une diminution des concentrations en daïdzéine dans la matière sèche et aucune trace de ce métabolite n'avait pu être détectée dans les milieux de culture correspondants. Cette étude nous montre que le pic de daïdzéine détecté dans le milieu de culture est observé immédiatement après addition de chitosane, et qu'en outre il n'est plus observable dans les 24 heures qui suivent l'ajout de cette molécule. Par conséquent, les prélèvements que nous effectuions tous les 3 jours étaient trop espacés dans le temps pour permettre l'observation de ce phénomène. Par ailleurs, ce pic de daïdzéine dans le milieu de culture permettrait d'expliquer en partie la chute de concentration détectée pour ce métabolite dans la matière sèche. Il faut toutefois noter que la diminution des concentrations en daïdzéine est plus importante que l'augmentation observée dans le milieu de culture, ce qui implique l'existence d'autres phénomènes que celui de l'excrétion de ce métabolite dans le milieu de culture. Il est ainsi possible que la chute des concentrations en daïdzéine traduise une métabolisation de ce composé en génistéine et coumestrol, molécules dont les concentrations augmentent dans la matière sèche et qui présentent des liens biosynthétiques avec la daïdzéine.

En ce qui concerne le coumestrol, nous observons que ce métabolite n'est excrété dans le milieu de culture qu'en présence de chitosane. En effet, aucune trace de coumestrol n'a pu être

détectée dans les milieux correspondants au traitement témoin, quel que soit le prélèvement effectué. En revanche, nous observons de même que pour la daidzéine, un pic d'excrétion dans le cas du traitement chitosane. L'augmentation des concentrations en coumestrol dans le milieu de culture débute plus tard que pour la daidzéine, après 6 heures de culture, et se prolonge pendant 18 heures. Les concentrations de coumestrol sont indétectables dès la 33^{ème} heure de culture. Deux étapes sont mises en évidence, avec un palier pour une concentration de $47 \mu\text{g.l}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ MS entre la 12^{ème} et la 24^{ème} heure de culture. L'analyse de cette cinétique d'excrétion permet d'expliquer que le coumestrol n'est pas pu être détecté lors des expérimentations précédentes. De la même façon que pour la daidzéine, l'intervalle de temps fixé à 3 jours, qui sépare 2 prélèvements successifs était trop long pour permettre d'observer le pic d'excrétion du coumestrol. La présence de ce pic d'excrétion ne s'explique pas par une chute des concentrations détectées pour ce métabolite dans la matière sèche. En effet, les concentrations en coumestrol augmentent dans le cas du traitement chitosane. La présence de coumestrol dans le milieu de culture pourrait en revanche résulter d'un mécanisme de régulation des concentrations dans la matière sèche pour ce métabolite. En effet, une synthèse importante de coumestrol a lieu lors de l'ajout de chitosane au milieu de culture. Il est possible qu'une concentration trop forte devienne toxique et soit limitée par un mécanisme d'excrétion. Le décalage dans le temps des pics correspondants à la daidzéine et au coumestrol autorise une troisième hypothèse à l'existence du pic d'excrétion du coumestrol. En effet, 3 heures séparent l'apparition du pic de daidzéine de celle du pic correspondant à la molécule de coumestrol. Or nous avons relaté à plusieurs reprises le lien biosynthétique existant entre ces deux métabolites : la daidzéine est le précurseur du coumestrol. Il est donc possible que le coumestrol détecté dans le milieu de culture résulte de la transformation de la daidzéine excrétée 3 heures auparavant. Pour cela, il faut cependant admettre que les enzymes nécessaires à cette étape soient également présentes dans le milieu, et que leur action soit très rapide. Nous avons indiqué que la présence de chitosane induit une nécrose très rapide des apex. En conséquence, l'altération des structures tissulaires pourrait permettre une libération des enzymes impliquées de la matière fraîche vers le milieu de culture. En outre, le palier observé pour la concentration de coumestrol entre 12 et 24 heures pourrait traduire le temps nécessaire aux diverses étapes de transformation de la daidzéine en coumestrol. Quelle que soit l'hypothèse envisagée pour les justifier, ces résultats permettent d'expliquer l'excrétion apparemment aléatoire de la daidzéine dans le milieu de culture dans le cas du traitement chitosane. La daidzéine et le coumestrol n'étant pas présents dans le milieu de culture au moment de l'addition de chitosane, il est déjà trop tard pour les détecter après 33 heures de culture. Notre étude ayant été conduite sur une période d'une semaine, il nous est impossible d'expliquer la présence de daidzéine dans les milieux de culture du traitement chitosane après deux semaines de culture. Il est cependant probable que l'excrétion de ces métabolites soit cyclique, et que le prélèvement ait été effectué au moment où le pic se soit produit.

La génistéine, en revanche, n'est jamais détectée dans les milieux de culture quels que soient le traitement ou l'heure de prélèvement. Ce phénomène ne signifie pas obligatoirement que ce métabolite n'est pas été excrété, mais peut-être que notre méthode d'analyse ne nous permet pas de le quantifier. En effet, les concentrations de daidzéine et de coumestrol mesurées dans le milieu de culture sont inférieures d'un facteur 10 à celui que nous détectons dans la matière sèche correspondante. Les concentrations en génistéine étant voisines de $50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS dans la matière sèche, elles seraient de l'ordre de $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ MS, soit $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS dans les volumes de milieu introduit dans chaque fiole Erlenmeyer. Des concentrations de cet ordre de grandeur sont sans doute à la limite du seuil de détection.

L'addition dans le milieu de culture de chitosane à une concentration de 30 mg.l⁻¹ à l'issue de 21 jours de préculture permet d'améliorer les rendements en génistéine et coumestrol produites par les racines de la souche RTLach5. En revanche, les concentrations en daïdzéine sont toujours inférieures dans le cas du traitement chitosane, ce qui rend ce traitement inadéquat pour la production de ce métabolite en grande quantité. L'effet du chitosane n'étant suivi que sur une période d'une semaine, ces résultats sont cependant à relativiser et nécessiteraient d'être vérifiés sur une culture d'une durée supérieure.

L'étude de cinétique d'excrétion réalisée sur des racines de la souche RTLach5 cultivées dans les mêmes conditions (21 jours de préculture, puis addition de chitosane et suivi sur une semaine), nous permet de mettre en évidence un relargage très rapide et fugace de daïdzéine et de coumestrol dans le milieu de culture pour les traitements chitosane. Les concentrations maximales détectées sont de 798 µg.l⁻¹.g⁻¹ MS pour la daïdzéine et de 81 µg.l⁻¹.g⁻¹ MS dans le cas du coumestrol. Ce phénomène a lieu dans un laps de temps très court, inférieur à 24 heures pour la daïdzéine et d'une durée de 33 heures en ce qui concerne le coumestrol. La génistéine en revanche n'est jamais mise en évidence dans les milieux de culture.

La rapidité avec laquelle s'effectue l'excrétion de la daïdzéine et du coumestrol dans les milieux de culture élicites est un phénomène surprenant. Si l'on ajoute à cette constatation le fait que les concentrations pour ces deux métabolites sont remarquablement stables dans la matière sèche des traitements témoins et qu'elles se stabilisent très rapidement après modifications des compositions du milieu de culture, il semble que nous observions un phénomène de régulation systématique des concentrations de daïdzéine et de coumestrol dans la biomasse racinaire. Un contrôle aussi 'pointu' des teneurs contenues dans la matière sèche pourrait traduire la toxicité de ces métabolites pour les racines de la souche RTLach5 elle-même. Rappelons en effet que le coumestrol est une phytoalexine, synthétisée en quantité importante par de nombreux végétaux dans le cas d'une agression par un facteur externe. La daïdzéine est également une phytoalexine, cependant son action est beaucoup moins puissante (Weidenborner et al., 1992). En conséquence, ces métabolites seraient synthétisés rapidement en réponse aux modifications de la composition du milieu de culture, puis éliminés dans le milieu de culture ou métabolisés de façon à limiter leur toxicité vis-à-vis du matériel végétal qui les produit.

2.4. Réflexions sur la notion de stabilité des cultures de racines transformées

Les racines transformées ont la caractéristique d'être des tissus stables tant du point de vue de la croissance que de la production de métabolites secondaires (Maldonado-Mendoza et al., 1993 ; Lipp-Joao et Brown, 1994). Pourtant, dans les cas des cultures de racines transformées de la souche RTLach5, nous avons pu constater que la synthèse des

isoflavonoïdes est sujette à variation selon l'expérimentation envisagée. En effet, lors de l'expérience de cinétique établie sur 3 semaines et relatée au début de ce chapitre, nous observons une chute des concentrations en daïdzéine et coumestrol entre le premier et le dernier jour de culture. En revanche, les concentrations restent stables pour ces deux mêmes métabolites dans les traitements témoins des expériences menées sur l'influence de la composition des milieux de culture (Figures 41 et 43). Ainsi, les racines transformées de la souche RTLach5 semblent ne pas être stables. En fait, il convient dans notre cas, de discerner la stabilité de croissance et la stabilité de production de métabolites secondaires.

✓ stabilité de la croissance

L'étude des productions de biomasse par la souche RTLach5, établies à diverses reprises en conditions témoin montre que la croissance de cette souche est reproductible d'une expérience à la suivante. En effet, nous pouvons observer de façon systématique 3 phases : une phase de latence, une phase exponentielle, puis un plateau qui s'amorce avec le ralentissement de croissance. La durée de la phase de latence peut être variable, mais nous pouvons noter que la durée de la phase exponentielle ainsi que la vitesse de croissance établie pendant cette période sont constantes d'une expérience à la suivante. En outre, la biomasse finale obtenue à l'issue d'un cycle de culture de 3 semaines est également analogue entre les différentes expérimentations relatées dans ce chapitre. Par conséquent, la stabilité de la croissance pour la souche RTLach5 pourrait paraître établie en conditions témoin. Cependant, force nous est de constater que des biomasses de 1,1 g (MS) ont été récoltées dans le cadre du dosage du souchier de racines transformées décrit dans le chapitre 1. Même si cette quantité est récoltée à l'issue d'une culture d'une durée de 4, et non de 3 semaines, la cinétique de production de biomasse par la souche RTLach5 indique que cette biomasse n'aurait pas pu être atteinte en prolongeant d'une semaine la durée des cycles de culture appliquée lors de l'étude de la souche RTLach5. En effet, cette dernière semaine correspond à la phase de plateau due au ralentissement de croissance. En outre, lors de l'étude de la cinétique de croissance de la souche RTLach5 rapportée au début de ce chapitre, nous n'avons pu récolter qu'une biomasse d'environ 450 mg (MS) après 3 semaines de culture. Cette valeur très faible, est inférieure de moitié à celles que nous mesurons par la suite dans les différentes expérimentations conduites sur la souche RTLach5. Il est probable que l'attention particulière que nous avons apportée à la réalisation des dernières expériences a permis de limiter fortement les facteurs externes qui pourraient être à l'origine de variations de biomasse. Toutefois, la stabilité de croissance exprimée par la souche RTLach5 en condition témoin reste toute relative.

Lorsque des modifications sont apportées aux milieux de culture, la croissance de la souche RTLach5 est immédiatement affectée, traduisant à la fois l'adéquation du milieu B5 (Gamborg *et al.*, 1968), et la sensibilité extrême de la souche RTLach5 à la composition du milieu de culture. Des cultures établies avec cette même souche dans des conditions témoin mais placées à la lumière sur un cycle de culture, ont montré une production de biomasse très

variable. Par conséquent, toute modification des conditions de culture, qu'elle soit liée à la nature du milieu ou aux facteurs environnementaux provoque une déstabilisation de la croissance de la souche RTLach5. Il n'est pas certain cependant qu'une stabilisation ultérieure n'ait pas lieu si les conditions de culture modifiées étaient maintenues sur plusieurs de cycles de culture.

Les racines transformées RTLach5 sont donc relativement constantes du point de vue de la production de biomasse à condition que l'ensemble des facteurs qui permettent cette culture soient maîtrisés dans toute la mesure du possible.

✓ stabilité de la production d'isoflavonoïdes

Il est encore plus aléatoire de parler de stabilité de la production en métabolites secondaires pour la souche RTLach5. En effet, les concentrations en daïdzéine, génistéine et coumestrol ne sont pas identiques d'une expérimentation à la suivante, même si les traitements et les conditions de culture sont maintenues. Il arrive que la daïdzéine ne soit pas détectée dans la matière sèche de la souche RTLach5, pourtant cultivée en conditions témoins. Ainsi, lors d'une expérimentation ayant pour but de déterminer l'origine des métabolites détectés dans les milieux de culture, nous avons renouvelé l'expérience de cinétique d'excrétion en additionnant de la ³H-L-phénylalanine aux milieux neufs contenant ou non du chitosane. Un traitement témoin, supplémenté en phénylalanine non marquée a également été envisagé. Aucun des traitements contenant de la phénylalanine marquée n'a permis de mettre en évidence la présence de daïdzéine 'froide' ou 'chaude', qu'il s'agisse de la matière sèche ou des milieux de culture. En revanche, le témoin contenant de la phénylalanine présente des concentrations en daïdzéine du même ordre de grandeur que celles établies dans les conditions témoins des diverses expérimentations mises en place. En conséquence, la présence de phénylalanine ne peut être la cause de cette absence de production de daïdzéine, non expliquée. Des paramètres tels que des variations de luminosité, de pH, d'oxygénation qui ne sont pas contrôlés pourraient cependant être capables de modifier la production des isoflavonoïdes.

Lorsque les milieux de culture sont modifiés, la production d'isoflavonoïdes par la souche RTLach5 est déstabilisée. Ainsi, la concentration en daïdzéine chute alors que celles de génistéine et de coumestrol s'élèvent dans un délai de 3 jours. Etant donné le lien biosynthétique qui existe entre ces molécules, nous pouvons penser qu'une partie de la daïdzéine est métabolisée en génistéine et coumestrol. Cette hypothèse permettrait d'expliquer les écarts de concentration plus importants constatés entre plusieurs fioles d'un même traitement pour ces deux derniers métabolites. Trois jours pourraient paraître courts pour constater la métabolisation de la daïdzéine en génistéine et coumestrol. Cependant, lors de l'expérience de marquage, nous avons pu remarquer qu'un délai de 3 heures était suffisant pour que la phénylalanine tritiée introduite dans le milieu de culture soit décelée dans la matière fraîche des traitements chitosane. En outre, après 9 heures de culture, 9% de la radioactivité est retrouvée dans la molécule de cinnamate, puis se trouve distribuée dans des métabolites non identifiés pendant les

prélèvements suivants. Par conséquent, les premières étapes de la biosynthèse des isoflavonoïdes semblent rapides et il paraît concevable que celles qui conduisent de la daïdzéine à la génistéine et au coumestrol le soient également.

Les variations de concentrations observées dans le cas des traitements différents des témoins sont détectables dans un délai très bref, mais semblent se stabiliser rapidement. Nous avons évoqué la possibilité d'une régulation des concentrations intrinsèques de ces métabolites dans la matière sèche racinaire, justifiée par une éventuelle toxicité de ces composés à des concentrations trop élevées. Ce phénomène pourrait traduire une capacité des racines transformées de la souche RTLach5 à conserver une certaine stabilité dans la teneur en métabolites secondaires, et ce, malgré les modifications des paramètres de culture que nous introduisons. Des cultures pendant des périodes plus longues sur des milieux de culture modifiés devraient permettre de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Nous avons pu déterminer au cours de l'étude de la souche RTLach5 plusieurs paramètres nous permettant de mieux appréhender à la fois la croissance et la production d'isoflavonoïdes par les racines transformées de cette souche.

En ce qui concerne la croissance, nous constatons que la production de biomasse est effectuée selon 3 périodes : une phase de latence de longueur variable suivie d'une phase exponentielle d'une durée proche de 8 jours qui se prolonge par une phase de plateau traduisant un ralentissement de croissance. Si l'allure de la cinétique de croissance est identique d'une expérimentation à la suivante, les valeurs de biomasse sont en revanche très variables. Par ailleurs, nous constatons que la production de biomasse est très sensible aux modifications apportées au milieu de culture. Ainsi, la croissance est inhibée sur les milieux M & S ou B5 additionnés de chitosane. Cette absence de croissance dans des conditions différentes du témoin pourrait résulter d'une sélection non recherchée des racines se développant le mieux sur milieu B5, et par conséquent devenues très susceptibles aux changements effectués dans la composition du milieu de culture. Les racines transformées de la souche RTLach5 sont en effet cultivées depuis 4 ans sur le même milieu B5 et une adaptation de cette souche au milieu de culture est envisageable. En outre, l'expérience menée durant un cycle de 2 semaines, sur la morphologie racinaire de RTLach5 nous renseigne sur le mode de croissance de cette souche. Cette expérimentation met en évidence le rôle prépondérant de l'élongation et de la ramification dans la production de biomasse par la souche RTLach5.

En ce qui concerne la production d'isoflavonoïdes, la daïdzéine et le coumestrol sont les 2 métabolites systématiquement détectés dans la matière sèche, quels que soient les traitements appliqués. La génistéine est également identifiée. Les concentrations dans lesquelles les métabolites sont retrouvés sont très variables d'une expérience à la suivante. Ainsi, lors du dosage du souchier entier de racines transformées, nous avons établi des concentrations en daïdzéine et coumestrol d'environ 6800 et 600 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS, respectivement. Cependant, les concentrations pour ces deux métabolites secondaires sont proches de zéro dans l'expérience de cinétique, alors qu'elles atteignent les valeurs de 12000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS (daïdzéine) et 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS (coumestrol) dans les traitements témoins des expériences conduites sur les milieux de culture modifiés. Cette variabilité dans les concentrations détectées pourrait s'expliquer par une instabilité génétique des racines transformées de la souche RTLach5, hypothèse déjà invoquée pour les variations de production de biomasse. Il est également possible que les différences de concentrations observées soient liées à l'âge moyen de la culture. En effet, l'expérience menée sur la morphologie racinaire de la souche RTLach5 révèle que les concentrations en daïdzéine et coumestrol sont variables selon qu'il s'agisse de la racine principale ou des ramifications d'ordre 2. Ainsi, les concentrations en daïdzéine sont plus fortes dans les apex que dans la racine principale, le phénomène opposé étant mis en évidence pour le coumestrol. Par conséquent, un ratio variable entre racines principales et racines d'ordre 2, lié à la croissance de la culture, aurait une incidence directe sur la production d'isoflavonoïdes.

Dans le cas des expériences conduites sur des milieux de culture modifiés, nous constatons que les divers traitements testés diminuent les concentrations en daïdzéine, concentrations qui se stabilisent cependant très rapidement à un niveau inférieur à celui du traitement témoin. En revanche, les concentrations en génistéine sont systématiquement supérieures dans le cas d'une culture conduite sur milieu modifié. En ce qui concerne le coumestrol, la mise en culture sur milieu M & S provoque une diminution des concentrations, alors que l'addition de chitosane au milieu B5 permet de récolter trois fois plus de coumestrol que dans le cas du traitement témoin. En outre, la daïdzéine est détectée dans des concentrations faibles, de l'ordre de la dizaine de $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, dans les milieux de culture.

Ces divers résultats ont plusieurs conséquences sur la production d'isoflavonoïdes par les racines transformées de la souche RTLach5 :

- les concentrations restant stables pour toute la durée d'un cycle de culture, l'augmentation de la production en isoflavonoïdes passe obligatoirement par une amélioration de la production de biomasse. De plus, selon le métabolite recherché, la proportion de ramifications d'ordre 2 pourra être modulée, chacun de ces deux types de racine synthétisant en effet des quantités différentes de daïdzéine et de coumestrol.

- les divers traitements testés dans le but d'améliorer les concentrations en isoflavonoïdes n'ont pas donné les résultats escomptés en ce qui concerne la daïdzéine. En revanche, la synthèse de génistéine semble supérieure dans le cas d'une culture sur milieu M & S ou B5 additionné de chitosane. Par conséquent, d'autres traitements éliciteurs seront à tester pour améliorer la production d'isoflavonoïdes sans, par ailleurs, inhiber la croissance de la souche RTLach5, ce qui est le cas des traitements M & S et chitosane.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Les travaux que nous avons réalisés s'inscrivent dans un programme de recherche plus général qui vise à étudier la possibilité d'utiliser les Psoralées (Légumineuses) comme ressource naturelle pour le psoralène, un métabolite secondaire appartenant à la famille des furocoumarines.

Ces molécules présentent de nombreuses propriétés biologiques, étroitement liées à leur capacité de liaison avec la double hélice de la molécule d'ADN sous l'action des rayonnements ultraviolets. Elles sont impliquées dans de nombreuses thérapies relevant de la dermatologie, de la cosmétologie et de la médecine plus générale. Le laboratoire Agronomie et Environnement, sollicité il y a quelques années par la société Bergaderm, a envisagé la production de ces molécules par les plantes du genre *Psoralea*. Cette voie de production devait permettre de s'affranchir de la synthèse chimique extrêmement coûteuse. Le laboratoire a développé deux approches possibles. La première s'est intéressée à la biologie des espèces de Psoralées australiennes. Parmi celles-ci, *Psoralea cinerea* a fait l'objet d'études détaillées qui ont conduit à définir, sur des surfaces pilotes, en serre, les conditions de culture permettant d'obtenir des biomasses et des teneurs en psoralène élevées (Bourgand, 1990). La production de psoralène pourrait alors se faire par une culture intensive de *Psoralea cinerea*.

La deuxième approche développée ne s'intéresse, non plus à la culture de la plante entière, mais à la culture *in vitro* des tissus de Psoralées. Cette étude a fait l'objet des travaux de Nguyen (1992). Deux types de cultures ont été envisagées : les suspensions cellulaires et les cultures de racines génétiquement transformées. La production de psoralène par des cellules de *Psoralea cinerea* cultivées en milieu liquide a été réalisée, le système de production devant être, à terme, le fermenteur. Pour y parvenir, Nguyen a déterminé un milieu de culture dont l'équilibre en régulateurs de croissance a permis d'initier des cultures de cellules de *Psoralea cinerea* en milieu solide, les cals. Cent trente et une souches issues de feuilles, tiges et cotylédons de *Psoralea cinerea* ont ainsi été initiées puis stabilisées par repiquages successifs. Les premiers dosages de furocoumarine effectués sur quelques souches de cals et de suspensions cellulaires ont montré que le psoralène et l'angélicine semblaient bien être synthétisés. La culture de racines transformées de Psoralées est la seconde approche *in vitro* envisagée par Nguyen. Ce matériel a la propriété de croître rapidement et indéfiniment sans qu'il soit nécessaire d'apporter des régulateurs de croissance. Par ailleurs, la production du métabolite est assurée par un tissu génétiquement stable et la longue phase de stabilisation indispensable dans le cas d'une culture de cellules isolées, n'est pas nécessaire. Huit espèces différentes de Psoralées ont été transformées, constituant ainsi un soucier. Aucune trace de psoralène ou d'angélicine n'a

cependant pu être détectée. Une étude plus complète sur la souche RTLach1, provenant de *Psoralea lachnotachys*, a été réalisée, avec la culture de cette souche sur des milieux modifiés pour leur teneur en saccharose, ions nitrate et phosphate ainsi que dans le cas d'une élévation par le chitosane. Il est apparu que les modifications de ces paramètres avaient une incidence directe sur la production de biomasse, mais ne permettaient pas de mettre en évidence la production de psoralène ou d'angélicine.

L'étude de la production de métabolites secondaires par les cals et les racines transformées issus de Psoralées a par conséquent constitué l'objectif de nos travaux. Les conclusions relatives aux expériences conduites tant sur les cals que sur les racines transformées ont été développées dans les chapitres correspondants. Elles ne seront pas détaillées davantage dans cette conclusion. Nous réfléchissons en revanche sur les perspectives plus larges qui pourront découler de nos travaux.

Nous avons tout d'abord entrepris de doser de façon systématique les souchiers de cals et de racines transformées obtenus par Nguyen (1992), après nous être assurés de la stabilité de ces cultures par un suivi de croissance, dans le cas des cultures de cals. Il s'avère que, quel que soit le matériel analysé et les modifications apportées au niveau des paramètres de culture, aucune trace de furocoumarine ne peut être mise en évidence. En effet, l'addition de *p*-coumarate dans les milieux de culture des cals provenant de *Psoralea cinerea* ou la mise en culture à la lumière dans le cas des racines transformées ne conduisent pas au rétablissement escompté de la production de furocoumarines.

La mise en culture *in vitro* de cellules végétales entraîne des modifications du génôme et/ou de son expression, qui conduisent à une variabilité phénotypique. Cette variabilité affecte également les capacités de biosynthèse des furocoumarines par les cals. Pour l'augmenter et l'exploiter, nous avons établi un second souchier de cals initiés à partir de fragments de feuilles de cinq espèces de Psoralées différentes de *Psoralea cinerea*. Nous avons ensuite procédé à plusieurs cycles de repiquage en maintenant les conditions de culture les plus constantes possibles afin de stabiliser l'expression génétique des souches. Les dosages effectués sur l'ensemble de ce nouveau souchier n'ont pas permis de mettre en évidence la synthèse des furocoumarines par les cals de Psoralées.

Le profil métabolique obtenu pour les cultures *in vitro* est très différent de celui qui nous avons pu mettre en évidence pour la plante entière dans le cadre d'une expérimentation réalisée sur *Psoralea cinerea*. En effet, l'analyse de la matière fraîche des six compartiments définis montre des concentrations importantes en psoralène, dont la répartition varie selon le stade de récolte. Les teneurs maximales sont détectées dans les parties aériennes, avec une accumulation vers les organes les plus jeunes au long du cycle de croissance. En revanche, les racines ne

contiennent que 20% des concentrations en psoralène, pourcentage qui ne cesse de s'amenuiser tout au long du cycle végétatif.

Il n'est pas rare que les cultures de cellules ne reproduisent pas le profil métabolique des plantes mères dont elles sont issues (Delle Monache *et al.*, 1995 ; Schröder et Böhm, 1995 ; Van der Plas *et al.*, 1995). Plusieurs hypothèses ont été mentionnées : âge de la culture, densité cellulaire de l'explant de départ, sélection de cellules à croissance rapide mais non productives... (Morris *et al.*, 1989). L'influence des régulateurs de croissance, ainsi que la variabilité du nombre de chromosomes sont également mises en cause (Deus-Neumann et Zenk, 1984).

L'ensemble de ces résultats nous a permis de dégager quelques conclusions et des perspectives plus larges en ce qui concerne la production de psoralène.

La production de psoralène par des cultures *in vitro* de Psoralées reste envisageable à plusieurs titres.

✓ l'expérimentation conduite sur les cultures de cals de *Psoralea cinerea* en vue de rétablir la synthèse de furocoumarine impliquait une action au niveau de la 4-coumarate-CoA-Ligase. Il est possible que cette étape ne soit pas en cause, mais que le blocage de la voie de biosynthèse soit situé plus loin sur la chaîne de formation des furocoumarines. Un moyen de vérifier cette hypothèse consiste à introduire des précurseurs beaucoup plus directs du psoralène dans les milieux de culture. Ainsi, des dosages CLHP mettraient en évidence toute métabolisation du précurseur, et par conséquent permettraient de vérifier l'intégrité de la chaîne biosynthétique. En outre, cette expérience pourrait montrer d'éventuelles capacités de biotransformation d'un métabolite précurseur en une molécule de furocoumarine d'intérêt pharmaceutique supérieur. En effet, si la chaîne de biosynthèse se trouve bloquée en amont de l'umbelliférone, fournir le précurseur pourrait permettre de récolter d'importantes quantités de furocoumarines à haute valeur ajoutée, et ainsi, faire des cals de *Psoralea cinerea*, des cultures rentables en terme de production.

✓ la production de furocoumarines par les racines transformées de Psoralées reste elle aussi envisageable à condition de déterminer de façon rigoureuse la localisation de la machinerie enzymatique impliquée dans la biosynthèse de ces molécules. En effet, nous avons pu déterminer par ailleurs que la synthèse des furocoumarines n'a vraisemblablement pas lieu dans les racines de la plante entière. Cependant, l'identification des enzymes puis la localisation des gènes qui les codent pourraient permettre d'envisager leur transfert et leur expression dans les cellules des racines transformées. Le plasmide Ri d'*Agrobacterium rhizogenes* servirait alors de vecteur d'insertion de gènes pour obtenir des racines, voire des plantes transgéniques. Il serait ainsi possible d'obtenir la production de furocoumarines par des racines transformées de Psoralées ou encore une surproduction de ces métabolites par des plantes cultivées en terre de manière intensive. Ce dernier axe de recherche nécessiterait la maîtrise de nombreuses

techniques dont nous ne disposons pas actuellement au laboratoire. En revanche deux autres approches peuvent être développées pour obtenir des furocoumarines par des cultures *in vitro*.

✓ la synthèse de métabolites secondaires est généralement liée à un état de différenciation. En outre, chez les Psoralées, la biosynthèse des furocoumarines semble avoir lieu dans les parties chlorophylliennes de la plante entière. Par conséquent, l'obtention de tératomes pourrait être une alternative particulièrement intéressante pour produire des furocoumarines à partir de cultures *in vitro* de Psoralées. En effet, les tératomes, issus de la transformation de cellules végétales par *Agrobacterium tumefaciens* constituent un tissu à la fois différencié et chlorophyllien. Des essais ont été réalisés sur des plantules de Psoralées stériles avec trois souches d'*Agrobacterium tumefaciens* différentes. Aucun résultat probant n'a pu être obtenu. Néanmoins, une multiplication cellulaire anarchique a été constatée au point d'infection sur des plantes entières de *Psoralea cinerea* blessées à l'aide d'une seringue préalablement enduite de bactéries. Par conséquent, des études plus complètes mériteraient d'être conduites dans cette direction.

✓ La multiplication végétative, par le biais des cultures *in vitro* apporterait également une solution pour la production de furocoumarines par les Psoralées. Plusieurs cycles de culture sur des milieux adéquats permettent la multiplication à l'infini d'une plante particulière. Un rameau cultivé sur un milieu appauvri et comportant cette fois une auxine va développer des racines pour reconstituer une plantule qui, moyennant une phase d'acclimatation, pourra être repiquée en pleine terre. Ce type de travail débuté par Nguyen (1990) a été développé en parallèle aux études que nous avons présentées. Nous n'avons cependant pas réussi à obtenir un taux de multiplication suffisant pour envisager la production de psoralène par micropropagation. Ce phénomène n'est pas isolé : les Légumineuses sont en effet réputées pour être récalcitrantes à la multiplication végétative. Cependant, il serait judicieux de tester d'autres facteurs que ceux déjà utilisés, ou encore de les combiner pour produire des rameaux présentant à la fois des ramifications nombreuses et des entrenœuds allongés. Ces rameaux seraient ensuite cultivés sur un milieu favorable à la rhizogenèse, puis repiqués en terre.

A travers ces divers exemples, nous avons voulu montrer qu'en dehors de la production de psoralène par des cals ou des racines transformées, la culture *in vitro* de Psoralées pouvait également être envisagée comme un ensemble de techniques présentant un réel intérêt pour la production de furocoumarines par des plantes entières. Ainsi, des essais sont actuellement conduits sur *Ruta graveolens* qui présente des teneurs en furocoumarines importantes (bergaptène, psoralène, xanthotoxine, isopimpinelline, umbelliférone). Cette plante appartenant à la famille des Rutacées, et très utilisée à l'époque romaine, au Moyen Age et à la Renaissance pour son action abortive, fait l'objet de nombreuses études en culture *in vitro* (Austin et Brown,

1973 ; Bohlman et Eilert, 1994 ; Zobel et Brown, 1988 ; 1993). Cependant, peu de choses sont connues quant aux teneurs et aux répartitions des furocoumarines dans la plante entière. Les chercheurs du laboratoire tentent actuellement de déterminer les conditions optimales de croissance et de production en furocoumarines de la Rue en vue de la domestiquer et de la cultiver de façon intensive. Les techniques de culture *in vitro* pourront alors être appliquées à plusieurs fins . Par exemple :

- culture d'organes excisés riches en furocoumarines
- régénération de plantes entières à partir de ces organes excisés
- sélection puis multiplication végétative de plantes hyperproductives...

La production de furocoumarines par les cals et les racines transformées de Psoralées n'a pas pu être obtenue à l'issue de nos travaux, mais nous avons démontré que de nombreuses alternatives étaient cependant envisageables à moyen et long termes.

Les dosages que nous avons eu l'occasion d'effectuer tout au long de notre étude nous ont permis de mettre en évidence la présence d'une seconde famille de métabolites secondaires, les isoflavonoïdes, dans les cultures *in vitro* de Psoralées ainsi que dans la plante entière de *Psoralea cinerea*. La daïdzéine, ainsi que la génistéine sont deux molécules très étudiées pour les actions antioxydantes qui leur confèrent des propriétés biologiques applicables dans les domaines de la cancérologie. La production de ces métabolites n'est pour l'instant pas envisagée, les mécanismes d'action et de métabolisation exacts de ces molécules devant encore être précisés. Cependant, le soja, plante qui contient des teneurs proches de 3000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS (Walz, 1931), est très étudiée, puisqu'elle pourrait permettre un apport de génistéine et daïdzéine par l'alimentation. De très nombreuses préparations culinaires élaborées à base de soja ont d'ailleurs été analysées pour leurs teneurs en isoflavonoïdes par l'équipe de Hendrich (Iowa, Etats-Unis).

D'après nos travaux, les Psoralées constitueraient un matériel de choix pour la production de ces métabolites secondaires. Les teneurs en daïdzéine détectées dans la plante entière de *Psoralea cinerea* sont certes inférieures d'un facteur 10 à celles qui existent dans la plante de soja. Cependant, les cultures *in vitro* obtenues à partir de diverses espèces de Psoralées présentent des teneurs largement supérieures à celles récoltées chez le soja.

Ainsi, en ce qui concerne les cultures de cals, nous avons pu mesurer des teneurs supérieures à 9680 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS dans 2 lignées de cals issues de *Psoralea obtusifolia*, soit des concentrations 3 fois supérieures à celles récoltées dans la plante entière de soja. En outre, nous avons pu déterminer l'existence d'une forte variabilité de la production de daïdzéine par les

cultures des cals pourtant issus de la même espèce de Psoralées. Cette apparente variabilité génétique constitue un atout pour mettre en évidence l'existence de souches hyperproductives. Par conséquent, il serait judicieux de créer un soucier de cals de *Psoralea obtusifolia* d'une taille supérieure dans l'objectif d'augmenter la variabilité génétique et par là-même nos chances de découvrir des souches de ce type. Le dosage de la matière sèche se fait désormais en routine selon le protocole mis au point et amélioré au laboratoire (Bourgaud *et al.*, 1994 ; Nguyen *et al.*, sous presse). Il nous est donc possible d'analyser de nombreux cals dans un temps relativement court, et ainsi de déterminer la présence de lignées hyperproductives. Une fois identifiées, ces souches pourront être mises en culture en milieu liquide. La production de daidzéine pourra en outre être améliorée par la mise en culture sur des milieux modifiés au niveau de la concentration et de la nature des régulateurs de croissance, de la source azotée ou carbonée. L'utilisation d'éliciteurs biotiques (parois de champignons autoclavées) ou abiotiques (stress salin ou hydrique) sera envisageable également. Les divers traitements éliciteurs que nous avons eu l'occasion de tester n'ont pas donné les résultats escomptés. Cependant, nous n'avons analysé que quelques souches. Par conséquent, une étude beaucoup plus systématique devrait permettre de mettre en évidence de nouvelles souches hyperproductives et d'améliorer la production en daidzéine par des traitements éliciteurs plus efficaces et plus adaptés aux Psoralées.

Les racines transformées de Psoralées sont également capables de synthétiser de grandes quantités de daidzéine et de génistéine. En effet, lors du dosage du soucier, nous avons pu montrer que les racines transformées issues de *Psoralea leucantha* et *Psoralea lachnostachys* synthétisent de 4000 à 8500 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS de daidzéine. En outre, les expérimentations réalisées sur la souche RTLach5 révèlent la présence de ce métabolite à des concentrations voisines de 12000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS tout au long du cycle de culture. Cette concentration est 4 fois supérieure à elle récoltée dans la plante entière de soja. Cependant, nous avons également pu constater que la production de daidzéine par les racines transformées de la souche RTLach5 est instable puisque dans deux expérimentations différentes, les teneurs en daidzéine se sont révélées nulles à l'issue des cycles de culture. Il apparaît très important de déterminer les raisons de ces comportements variables en terme de production de daidzéine. En effet, si les concentrations obtenues étaient stables, les racines transformées de *Psoralea lachnostachys* pourraient constituer une alternative rentable pour la production de daidzéine. De plus, les concentrations indiquées sont récoltées dans les traitements témoins. L'utilisation d'éliciteurs pourrait par conséquent améliorer encore ces teneurs. Nous avons pu constater que toute modification des paramètres ou des milieux de culture provoquait une chute de biomasse très dommageable pour la production de daidzéine. L'amélioration des rendements en daidzéine produits par les racines transformées de la souche RTLach5 passera donc par la mise au point de traitements éliciteurs qui n'inhibent pas la croissance de ce tissu végétal. En outre, nous avons pu montrer que les concentrations en daidzéine étaient différentes selon l'âge de l'explant. Ainsi, les concentrations maximales en daidzéine sont mesurées dans les parties les plus jeunes de la culture. En conséquence, l'optimisation des rendements en daidzéine par les cultures de RTLach5 sera également

conditionné par le ratio existant entre les parties en croissance et les parties vieilles de l'explant mis en culture.

Ces conclusions sont valables pour la souche RTLach5. Nous avons précisé auparavant que d'autres souches de racines transformées montraient des concentrations en daidzéine intéressantes. Ces souches, ainsi que d'autres qui pourront être obtenues ultérieurement, devront être également analysées en vue de déterminer leur potentiel de production de daidzéine.

Deux autres perspectives émanent des travaux que nous avons pu mener sur la souche RTLach5:

- la daidzéine est détectée dans le milieu de culture lors de plusieurs expérimentations conduites sur la souche RTLach5. Cette constatation avait pu être faite également au cours d'une étude précédente pour deux autres souches de racines transformées (Bourgaud *et al.*, 1995). Dans le cas d'une production à une échelle supérieure, il serait donc intéressant de mettre au point un protocole permettant de libérer dans le milieu de culture la totalité de la daidzéine synthétisée par la matière fraîche. L'extraction de la daidzéine serait ainsi facilitée, et l'on pourrait envisager de conserver le même matériel végétal durant plusieurs cycles de culture sur un milieu renouvelé. Par ailleurs, cette opération pourrait permettre de déterminer si le niveau de biosynthèse de la daidzéine reste constant au cours du cycle de culture en raison d'un phénomène de rétroinhibition dû à l'existence d'un seuil de concentration. En effet, un relargage dans le milieu de culture du métabolite devrait alors supprimer ce phénomène et conduire à une augmentation du potentiel de production en daidzéine pour une même culture.

- La génistéine est détectée à plusieurs reprises dans les cultures de RTLach5. Ce métabolite est, de plus, synthétisé en concentrations supérieures dans le cas des traitements élicités. Cette molécule ayant des applications thérapeutiques plus nombreuses que la daidzéine, il pourrait être intéressant de tenter d'améliorer sa production, même si elle semble s'opérer au dépens de la concentration en daidzéine.

Nous venons d'indiquer quelques unes des perspectives qui émanent de nos travaux dans un objectif appliqué qui concerne la production de furocoumarines et d'isoflavonoïdes. Ces axes de recherche nécessitent des études complémentaires et impliquent les cultures *in vitro sensu stricto* (suspensions cellulaires et racines transformées), ainsi que les techniques et les étapes qui découlent des cultures *in vitro* et qui présenteraient un réel intérêt pour la production de ces métabolites secondaires par la culture de plantes entières (micropropagation, régénération de plantes hyperproductives...).

Au delà de ces considérations très appliquées, nous voudrions exposer quelques réflexions plus fondamentales auxquelles nous a conduit l'ensemble de notre travail.

Tout d'abord, il nous paraît essentiel de souligner l'importance de la notion de stabilisation d'un tissu cultivé *in vitro*. Nous nous sommes trouvés confrontés à ce problème tout au long de notre étude, qu'elle concerne les cultures de cals ou les cultures de racines transformées.

En ce qui concerne les cals, l'évaluation de la stabilité s'est effectuée sur le profil de la courbe de croissance évaluée durant 5 cycles consécutifs. Notre objectif étant d'analyser la production de métabolites secondaires, il eut sans doute été préférable de se baser sur ce critère pour mesurer la stabilité du soucier. Cependant, le soucier comporte un nombre important de souches et la méthode de dosage disponible lorsque cette étude a débuté nécessitait près d'une semaine de travail. En conséquence, vérifier la stabilité du soucier sur un critère de production de métabolites secondaires était irréalisable. En outre, le métabolite recherché était le psoralène, dont la présence n'a jamais pu être mise en évidence. Dans ces conditions, l'évaluation de la stabilité sur un critère de production était impossible. La notion de stabilité, ses critères d'évaluation, le temps nécessaire pour y parvenir, sont rarement indiqués dans la bibliographie. Disposant actuellement d'une méthode d'analyse rapide et d'un métabolite effectivement synthétisé par les cals, il pourrait être intéressant de stabiliser les cultures sur ce critère, de manière à s'assurer que les variations de concentrations observées en réponse aux traitements éliciteurs sont effectivement dues aux traitements testés et non à une variation liée à l'instabilité du tissu cultivé.

La stabilité génétique des racines transformées est à l'origine de l'engouement que de nombreux chercheurs ont manifesté pour ce matériel végétal. Considérée comme acquise durant de nombreuses années, cette propriété des racines transformées est actuellement prise en défaut dans certaines cultures (Yukimune *et al.*, 1994a). L'explication avancée implique la formation de tissus chimères constitués à la fois de cellules transformées stables et de cellules non transformées à l'origine de l'instabilité de la production et de la croissance des tissus qui en sont formés. Ainsi, lors du repiquage, des tissus chimériques sont prélevés et mis en culture, conduisant à des cultures instables. Dans notre cas, de faibles variations de concentration auraient pu être imputées au ratio variable entre parties jeunes et parties âgées de la culture. Cependant, nous avons pu observer des écarts dans la production de biomasse par la souche RTLach5 de 450 mg à 1,2 g, ainsi que l'absence totale de daidzéine à deux reprises. Il est par conséquent possible que nous soyons confronté à ce type de phénomène. Une vérification par dosage des opines ou par mesure de la quantité d'ADN-T grâce à la technique de PCR permettra de déterminer l'origine de l'instabilité de la croissance et de la production de daidzéine par les cultures de RTLach5.

D'une façon plus générale, il nous semble que la stabilité d'un tissu cultivé *in vitro* ne doit jamais être considérée comme définitivement acquise, et mérite d'être vérifiée à intervalles réguliers.

Une dernière perspective d'ordre plus fondamental découle des travaux que nous avons pu effectuer. En effet, nous nous trouvons confrontés à l'absence de synthèse de furocoumarines par des cultures *in vitro* issues de plantes réputées pour leur forte teneur en cette famille de molécules. En revanche, la daidzéine, détectée dans la plante entière à des concentrations très moyennes, est identifiée dans les cultures *in vitro* dans des proportions très supérieures. Les deux voies de biosynthèse étant communes pour une partie, il est tentant d'envisager une déviation du métabolisme secondaire des furocoumarines vers les isoflavonoïdes dans le cas des cultures *in vitro*. Il est cependant impossible de déterminer si les fortes concentrations en daidzéine détectées dans les cals et les racines transformées de Psoralées ont pour origine une concentration accrue en précurseurs communs due au blocage de la voie de biosynthèse des furocoumarines (auquel cas, il s'agit vraiment d'une déviation du métabolisme secondaire), ou si ces teneurs résultent simplement de l'expression d'une variabilité génétique liée à la culture de tissus *in vitro*.

En ce qui concerne l'absence de synthèse de furocoumarines proprement dite, dans les cultures *in vitro*, nous ignorons encore si son origine est liée à l'absence de certains organites, ou à des phénomènes de régulation enzymatique. L'obtention de tératomes (déjà envisagée par ailleurs) pourrait permettre de répondre à la première hypothèse. En effet, nous avons suggéré à plusieurs reprises que la synthèse des furocoumarines avait lieu dans les parties aériennes de la plante entière, et par conséquent pourrait nécessiter la présence du système chlorophyllien. Les tératomes constituent un tissu différencié présentant tous les organites caractéristiques des parties aériennes de la plante entière, et nous devrions par conséquent obtenir la synthèse des furocoumarines si celle-ci n'est inhibée, dans le cas des cultures *in vitro*, que pour des raisons structurales.

En revanche, seule l'identification et la localisation ultrastructurale des enzymes clés de la voie de biosynthèse des furocoumarines chez les Psoralées permettra de déterminer si la chaîne métabolique est toujours fonctionnelle dans les cultures *in vitro* et le cas échéant, d'impliquer des phénomènes de régulation enzymatique dans l'absence de synthèse de ces métabolites par les cals et les racines transformées. Il s'agira ensuite de déterminer à quel niveau de la chaîne de biosynthèse se situe la régulation. La voie des phénylpropanoïdes étant particulièrement complexe, il est en effet possible que la régulation ne se fasse pas sur la voie biosynthétique des furocoumarines mais au niveau d'une ou plusieurs voies parallèles situées en aval.

- localiser les enzymes, les identifier, les isoler, les caractériser,
- déterminer les étapes et les métabolites intermédiaires
- vérifier si tous les éléments de cette chaîne sont présents et fonctionnels
- comprendre enfin à quel niveau se fait la régulation si elle existe, et selon quel mécanisme,

C'est la thématique passionnante qu'il s'agira de développer

- pour comprendre le profil métabolique différent exprimé par la plante entière et les cultures *in vitro*
- pour parvenir à restaurer la synthèse de furocoumarines
- pour agir sur la production, par les cultures *in vitro*, des deux familles de métabolites secondaires identifiées et qui présentent un réel intérêt pharmaceutique

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adlercreutz H. (1990) : Western diet and western diseases : some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scan. J. Clin. Lab. Invest.*, **50** (Supp 201), 3-23.
- Adlercreutz H. (1995) : Phytoestrogens : epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ. Health Persp.*, **103** (Suppl 7), 103-112.
- Adlercreutz H., Markkanen H., Watanabes S. (1993) : Plasma concentrations of phytoestrogens in Japanese men. *Lancet*, **342**, 1209-1210.
- Allen O. N., Allen E. K. (1981) : The *Leguminosae*. A source book of characteristics, uses, and nodulation. *The University of Wisconsin Press, Madison*, 878p.
- Altman D. W., Stipanovic R. D., Mitten D. M., Heinstejn P. (1985) : Interaction of cotton tissue culture cells and *Verticillium dahliae*. *In vitro Cellular and Devel. Biol.*, **21**, 659-664.
- Arellano J., Vasquez F., Villegas T., Hernandez G. (1996) : Establishment of transformed root cultures of *Perezia cuernavacana* producing the sesquiterpene quinone perezone. *Plant Cell Rep.*, **15**, 455-458.
- Arnott T., Murphy T. M. (1991) : A comparison of the effects of a fungal elicitor and ultraviolet radiation on ion transport and hydrogen peroxide synthesis by rose cells. *Environ. Exp. Bot.*, **31** (2), 209-216.
- Ashikawa I., Fukuzawa A., Murai A., Kamada H., Koshi M. (1991) : Production of potato cyst nematode hatching stimulus by hairy root cultures of tomato. *Agric. Bio chem.*, **55** (8), 2025-2029.
- Austin D. J., Brown S. A. (1973) : Furanocoumarin biosynthesis in *Ruta graveolens* cell cultures. *Phytochem.*, **12**, 1657-1667.
- Bailey E. T., Francis C. M. (1971) : Isoflavone concentrations in the leaves of the species of the genus *Trifolium*, section *Colycomorphum*. *Aust. J. Agri. Res.*, **22**, 731-736.
- Baker D. C., Dougall D. K., Glaßgen W. E., Johnson S. C., Metzger J. W., Rose A., Seitz H. U. (1994) : Effects of supplied cinnamic acids and biosynthetic intermediates on the anthocyanins accumulated by wild carrot suspension cultures. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **39**, 79-91.
- Baskin J. M., Ludlow C. J., Harris T. M., Wolf F. T. (1967) : Psoralen, an inhibitor in the seeds of *Psoralea subcaulis* (*Leguminosae*). *Phytochem.*, **9**, 1209-1213.
- Batschauer A., Rocholl M., Kaiser T., Nagatani A., Furuya M., Schäfer E. (1996) : Blue and UV-A light -regulated *CHS* expression in *Arabidopsis* independent of phytochrome A and phytochrome B. *The Plant Journal*, **9** (1), 63-69.
- Beadle N. C. W. (1964) : Nitrogen economy in arid and semi-arid plant communities. Part III : The symbiotic nitrogen-fixing organism. *Proc. Linn. Soc. N. S. W.*, **89**, 273-286.

- Becker R. S., Chakravorti S., Gartner C. A., Miguel M. G. (1993) : Photosensitizers : comprehensive photophysics/chemistry and theory of coumarins, chromones, their homologues and thione analogues. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **89**, 1007-1019.
- Beier R. C., Oertli E. H. (1983) : Psoralen and other linear furocoumarins as phytoalexins in celery. *Phytochem.*, **22** (11), 2595-2597.
- Bell E. A. (1980) : The physiological role(s) of secondary (natural) products. *In*: The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Vol 7. Secondary plant products. Conn E. E. (Eds.), *Academic Press*, 1-20.
- Bellincampi D., Cardarelli M., Zaghi D., Serino G., Salvi G., Gatz C., Cervone F., Altamura M. M., Costantino P., De Lorenzo G. (1996) : Oligogalacturonides prevent rhizogenesis in *rolB*-transformed tobacco explants by inhibiting auxin-induced expression of the *rolB* gene. *The Plant Cell*, **8**, 477-487.
- Bellini C., Chupeau M. C., Gervais M., Vastra G., Chupeau Y. (1990) : Importance of myoinositol, calcium and ammonium for the viability and division of tomato (*Lycopersicon esculentum*) protoplasts. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **23**, 27-37.
- Ben-Hayyim G., Martin-Tanguy J., Tepfer D. (1996) : Changing root and shoot architecture with the *rolA* gene from *Agrobacterium rhizogenes* : interactions with gibberellic acid and polyamine metabolism. *Physiol. Planta.*, **96**, 237-243.
- Berenbaum M. R. (1991) *In*: Herbivores, their interactions with secondary plant metabolites, Vol I, The chemical participants. Rosenthal G. A., Berenbaum M. R. (Eds.), *Academic Press, New York*, 468 p.
- Berenbaum M. R., Zangerl A. R. (1994) : Costs of inducible defense : protein limitation, growth and detoxification in Parsnip webworms. *Ecol.*, **75** (8), 2311-2317.
- Berkley S. F., Hightower A. W., Beier R. R., Fleming D. W., Brokopp C. D., Ivie G. W., Broome C. V. (1986) : Dermatitis in grocery workers associated with high natural concentrations of furanocoumarins in celery. *Ann. Inter. Med.*, **105**, 351-355.
- Berlin J. (1979) : Para-fluorophenylalanine resistant cell lines of tobacco. *Z. Pflanzenphysiol.* **97**, 309.
- Berlin J., Sieg S., Strack D., Bokern M., Harms H. (1986) : Production of betalaines by suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **5**, 163-174.
- Bhadra R., Shanks J. V. (1995) : Statistical design of the effect of inoculum conditions on growth of hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol. Techn.*, **9** (9), 681-686.
- Bickoff E. M., Livingston A. L., Hendrickson A. P., Booth A. N. (1962) : Relative potencies of several oestrogen-like compounds found in forages. *J. Agric. Food Chem.*, **10**, 410-412.
- Biggs, D. R., Welle R., Grisebach H. (1990) : Intracellular localization of prenyltransferases of isoflavonoid phytoalexin biosynthesis in bean and soybean. *Planta*, **181**, 244-248.
- Bihu Z., Alfermann A. W. (1993) : Diterpenoid production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochem.*, **32** (3), 699-703.

- Boardley M., Stirton C. H., Harborne J. B. (1986) : A chemotaxonomic survey of the tribe *Psoraleae* in Africa. *Biochem. Syst. Ecol.*, **14** (6), 603-613.
- Bobak M., Nadaska M., Samaj J., Blehova A., Erdelsky K., Ovecká M., Kristin J. (1995) : The influence of elicitation on the subcellular localization and content of sanguinarine in callus cells of *Papaver somniferum* L. *Biol. Plantarum*, **37** (4), 501-506.
- Bohlman J. Eliert U. (1994) : Elicitor induced metabolism in *Ruta graveolens*. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **38**, 189-198.
- Bohuslaviszki K. H., Hinck-Kneip C., Kneip A., Koppenhöfer E., Reimers A. (1993) : Reduction of MS-related scotoma by a new class of potassium channel blockers from *Ruta graveolens*. *Neuro-ophtalmol.*, **13**, (4), 191-198.
- Bohuslavizki K. H., Hänsel W., Kneip A., Koppenhöfer E., Niemöller E., Sanwann K. (1994) : Mode of action of psoralens, benzofurans, acridons and coumarins on the ionic currents in intact myelinated nerve fibres and its significance in demyelinating diseases. *Gen. Physiol. Biophys.*, **13**, 309-328.
- Bois F. (1992) : The influence of some natural cell-wall derived precursors on organogenesis and differentiation of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) callus cultures. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **28**, 91-96.
- Bolwell G. P. (1992) : A role for phosphorylation in the down-regulation of Phenylalanine Ammonia-Lyase in suspension-cultured cells of French bean . *Phytochem.*, **31** (12), 4081-4086.
- Bolwell P., Bell J. N., Cramer C. L., Schuch W., Lamb C., Dixon R. A. (1985) : L-phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris*. Characterisation and differential induction of multiple forms from elicitor-treated cell suspension cultures. *Eur. J. of Biochem.*, **149**, 411-419.
- Bongue-Bartelsman M., Phillips D. A. (1995) : Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Physiol. Biochem.*, **33**, 539-546.
- Borges M. L., Matos O. C., Pais I., Seixas de Melo J., Ricordo C. P., Macanita A., Becker R. S. (1995) : Evaluation of a broad of variety of coumarins, chromones, their furohomologues and thione analogues as phototoxins activated by UVA and visible light. *Pest. Sci.*, **44**, 155-162.
- Bourgaud F. (1990) : Etude de la biologie des plantes du genre *Psoralea* (Légumineuses), production de furocoumarines à intérêt pharmaceutique. Essais de culture *in vitro*. Thèse de doctorat INPL-ENSAIA, Nancy, 143p.
- Bourgaud F., Allard N., Forlot P., Guckert A. (1990) : Study of two pharmaceutically useful *Psoralea* (*Leguminosae*) species : Influence of inoculation on growth, grain and dry matter yield. *Agronomy*, **10**, 1-8.

- Bourgaud F., Allard N., Guckert A. Forlot P. (1989) : Natural sources of furocoumarins (psoralens). *In: Psoralen : Past, Present and Future of photochemoprotection and other biological activities.* Fitzpatrick T. B., Forlot P., Pathak M. A., Urbach F. (Eds.). *John Libbey Eurotext. Montrouge.* 219-229.
- Bourgaud F., Brunel M. C., Guckert A., Forlot P. (1992) : Effect of nitrogen nutrition and environmental conditions on the production of pharmaceutically useful metabolites by *Psoralea cinerea*. *Eur. J. Agron.*, 1 (1), 37-43.
- Bourgaud F., Grimal J. Y., Nguyen C., Bitton G., Guckert A. (1994a) : A selective photobiological assay to detect and quantify psoralen in *Psoralea* plants (*Leguminosae*). *Phytochem. Anal.*, 5, 315-318.
- Bourgaud F., Nguyen C., Guckert A. (1995) : XXII. *Psoralea* species : *In vitro* culture and production of furanocoumarins and other secondary metabolites. *In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol 33. Medicinal and Aromatic Plants VIII.* Bajaj Y. P. S. (Ed.), *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 388-411.
- Bourgaud F., Poutaraud A., Guckert A. (1994b) : Extraction of coumarins from plant material (*Leguminosae*). *Phytochem. Anal.*, 5 127-132.
- Bradbury R. B. , White D. E. (1954) : Oestrogens and related substances in plants. *Vitamins, Hormones*, 12, 207-233.
- Breathnach S. M., Hinter H. (1993) : Réactions cutanées médicamenteuses. *Dans : Arnette S. A. (Ed)*, 313-393.
- Brindle P. A., Kuhn P. J., Threfall D. R. (1988) : Biosynthesis and metabolism of sesquiterpenoid phytoalexins and triterpenoids in potato cell suspension cultures. *Phytochem.*, 27, 427-459.
- Brooks C. J. W., Watson D. G., Freer I. M. (1986) : Elicitation of capsidiol accumulation in suspended callus cultures of *Capsicum annum*. *Phytochem.*, 25, 1089-1092.
- Brooks C. J. W., Watson D. G., Rycroft D. S. Freer I. M. (1987) : The biosynthesis of sesquiterpenoid phytoalexins in suspended callus cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochem.*, 26, 2243-2245.
- Brown S. A. (1979) : Biosynthetic studies on coumarins. *Planta. Med.*, 36, 299-310.
- Brown S. A. (1981) : Coumarins. *In: Conn EE (Ed.) Secondary plant products, The biochemistry of plants, a comprehensive treatise, VII.* *Academic Press, New York*, 269-300.
- Brown S. A., Steck W. (1972) : 7-demethylsuberosin and osthenol as intermediates in furocoumarin biosynthesis. *Phytochem.*, 12, 1315-1324.
- Bruce R. J., West C. A. (1989) : Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean. *Plant Physiol.*, 91, 889-897.
- Buitelaar R. M., Langenhoff A. A. M., Heidstra R., Trampers J. (1991) : Growth and thiophen production by hairy root cultures of *Tagetes patula* in various two-liquid-phase bioreactors. *Enzyme microb. Technol.* , 13, 487-494.

- Castaneda J. L., Quintero A. (1991) : Regulation of Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL) (E.C.4.3.1.5.) activity by light in *Gomphrena globosa* tissue culture. *Int. J. Exp. Bot.*, **523** (2), 151-154.
- Ceska O., Chaudary S. K., Warrington P. J., Ashwood-Smith M. J. (1987) : Photoactive furocoumarins in fruits of some Umbellifers. *Phytochem.*, **26**, 165-169.
- Chang C. F., Suzuki A., Kumai S., Tamuka S. (1969) : Chemical studies on « clover sickness ». Part II. Biological functions of isoflavonoids and their related compounds. *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 398-408.
- Chang Y., Nair M. G., Santell R. C., Helferich W. G. (1994). Microwave-mediated synthesis of anticarcinogenic isoflavones from soybeans. *J. Agric. Food Chem.*, **42** (9), 1869-1871.
- Chappell J., Halhbrock K. (1984) : Transcription of plant defence genes in response to UV light or fungal elicitor. *Nature*, **311**, 778.
- Chappell J., Lanken C. V., Vögeli U., Bhatt P. (1989) : Sterol and sesquiterpenoid biosynthesis during a growth cycle of tobacco cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.*, **8**, 48-52.
- Chaudary S. K., Warrington P., Ashwood-Smith H. M. J. (1985) : Increase of furocoumarin content of celery during storage. *J. Agric. Food Chem.*, **33** (6), 1153-1157.
- Chilton M. D., Tepfer D. A., Petit A., David C., Casse-Delbart F., Tempé J. (1982) : *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of the host plant root cells, *Nature*, **295**, 432-434.
- Cho M. J., Harper J. E. (1991) : Effect of inoculation and nitrogen on isoflavonoid concentration in wild-type and nodulation-mutant soybean roots. *Plant Physiol.*, **95**, 435-442.
- Choudhary A. D., Lamb C. J., Dixon R. A. (1990) : Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) VI. Differential responsiveness of chalcone synthase induction to fungal elicitor or glutathione in electroporated protoplasts. *Plant Physiol.*, **94**, 1802-1807.
- Christen P., Roberts M. F., Phillipson J. D., Evan W. C. (1989) : High yield production of tropane alkaloids by hairy root cultures of a *Datura candida* hybrid. *Plant Cell Rep.*, **8**, 75-77.
- Ciddi V., Srinivasan V., Shuler M. L. (1995) : Elicitation of *Taxus* sp. cell cultures for production of taxol. *Biotechnol. Lett.*, **17** (12), 1343-1346.
- Cierna M., Kakoniova D., Liskowa D. (1991) : A medium for rapid plant callus growth. *Biologia*, **46** (3), 271-272.
- Cook J. W., Dodds E. C., Hewett C. L. (1933) : A synthetic oestrus-exciting compound. *Nature*, **131**, 56.
- Corchete M. P., Diez J. J., Valle T. (1993) : Phenylalanine Ammonia-Lyase activity in suspension cultures of *Ulmus pumila* and *U. campestris* treated with spores of *Ceratocystis ulmi*. *Plant cell Rep.*, **13**, 111-114.

- Corchete M. P., Jimenez M. A., Moran M., Cacho M., Frenandez-Tarrago J. (1991) : Effect of calcium, manganese and lithium on growth and cardenolide content in cell suspension cultures of *Digitalis thapsi* L. *Plant Cell Rep.*, **10**, 394-396.
- Coronado C., Zuanazzi J. A. S., Sallaud C., Quirion J. C., Esnault R., Husson H. P., Kondorosi A., Ratet P. (1995) : Alfalfa root flavonoid production is nitrogen regulated. *Plant Physiol.*, **108**, 533-542.
- Coward L., Barnes N. C., Setchell K. D. R., Barnes S. (1993) : Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates : antitumor isoflavones in soybean foods from american and asian diets. *J. Agric. Food Chem.*, **41** (11), 1961-1967.
- Cresswell R. C., Fowler M. W., Stafford A., Stepan-Sarkissian (1989) : Inputs and outputs: primary substrates and secondary metabolism. In : Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures, W. G. W. Kurz (Ed), *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg*, 14-26.
- Curtin M. E. (1983) : Harvesting profitable products from plant tissue culture. *Biotechnol.*, **1**, 649-657.
- Dakora F. D., Joseph C. M., Phillips D. A. (1993) : Common bean root exudates contain elevated levels of daidzein and coumestrol in response to *Rhizobium* inoculation. *MPMI*, **6** (5), 665-667.
- Dalkin K., Jorrin J., Dixon R. A. (1990) : Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) VII. Induction of defence related mRNAs in elicitor-treated cell suspension cultures. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **37**, 293-307.
- Dall'Acqua F., Vevaldi D., Recher M. (1978) : The photoreaction between furocoumarins and various DNA with different base compositions. *Photochem. Photobiol.*, **27**, 33-36.
- Daniels F. (1965) : A simple microbiological method for demonstrating phototoxic compounds. *J. Invest. Dermatol.*, **32**, 259-263.
- De Donato M., Chiavazza P. (1994) : Rapid hydrogen peroxide release in cell suspensions of *Capsicum* spp. elicited by fungal preparations. *Applied Biochem. Biotechnol.*, **48**, 45-54.
- Dedaldechamp F., Uhel C., Macheix J. J. (1995) : Enhancement of anthocyanin synthesis and dihydroflavonol reductase (DFR) activity in response to phosphate deprivation in grape cell suspensions. *Phytochem.*, **40** (5), 1357-1360.
- Delle-Monache G., De Rosa M. C., Scurria R., Vitali A., Cuteri A., Monacelli B., Pasqua G., Botta B. (1995) : Comparison between metabolites productions in cell culture and whole plant of *Maclura pomifera*. *Phytochem.*, **39** (3), 575-580.
- Derks W., Trumble J., Winter C. (1990) : Impact of atmospheric pollution on linear furanocoumarin content in celery. *J. Chem. Ecol.*, **16** (2), 443-454.
- Deus B., Zenk M. H. (1982) : Exploitation of plant cells for the production of natural compounds. *Biotech. and Bioeng.*, **24**, 1965-1974.
- Deus-Neumann B., Zenk M. H. (1984) : Instability of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Planta Med.*, **50**, 427-431.

- Dewick P. M. (1988) : *In*: Harborne J. B. (Ed.), The Flavonoids : Advances in Research since 1980. *Chapman & Hall, London*, 125 p.
- Dewick P. M. (1994) : *In*: Harborne J. B. (Ed.), The Flavonoids : Advances in Research since 1986. *Chapman & Hall, London*, 117 p.
- Dhillon D. S., Brown S. A. (1976) : Localization, purification and characterization of dimethylallylpyrophosphate : umbelliferone dimethylallyltransferase from *Ruta graveolens*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **177**, 74.
- Diawara M. M., Trumble J. T., Quiros C. F., Hansen R. (1995). Implications of distribution of linear furanocoumarins within celery. *J. Agric. Food Chem.*, **43** (3), 723-727.
- Dixon R. A., Choudhary A. D., Dalkin., Edwards R., Fahrendorf T., Gowri G., Harrison M. J., Lamb C. J., Loake G. J., Maxwell C. A., Orr J., Paiva N. L. (1992) : Molecular biology of stressed-induced phenylpropanoid biosynthesis in alfalfa. *In*: Phenolic metabolism in plants. Stafford H. A., Ibrahim R. K. (Eds.), *Plenum Press, New York*, 91-138.
- Dixon R. A. , Fuller K. W. (1976) : Effects of synthetic auxin levels on phaseollin production and phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity in tissue cultures of *Phaseolus vulgaris* L. *Physiol. Plant Pathol.*, **9**, 229-312.
- Dixon R. A., Harrison M. J. (1990) : Activation, structure and organization of genes involved in microbial defence in plants. *In*: Advances in genetics, Genomic responses to environmental stress. Scandalios J. G., Wright T. R. F., (Eds.), *Academic press, Inc*, 165-234.
- Dixon R. A., Harrison M. J., Paiva N. L. (1995). The isoflavonoid phytoalexin pathway : From enzymes to genes to transcription factors. *Physiol. Planta.*, **93**, 385-392.
- Dixon R. A., Paiva N. L. (1995) : Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, **7**, 1085-1097.
- Do C. B., Cormier F. (1991) : Effects of low nitrate and high sugar concentrations on anthocyanin content and composition of grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Plant Cell Rep.*, **9**, 500-504.
- Dodds E. C., Folley J. J. , Glascock R. F., Lawson W. (1958) : The excretion of micrograms doses of hexestrol by rabbits and rats. *Biochem. J.*, **68**, 161-167.
- Doerk-Shmitz K., Witte L., Alfermann A. W. (1994) : Tropane alkaloid patterns in plants and hairy roots of *Hyoscyamus albus*. *Phytochem.*, **35** (1), 107-110.
- Dong Y. H., Lancaster J. (1995) : Postharvest stimulation of skin color in Royal Gala apple. *J. Amr. Hoc. ort. Sci.*, **120** (1), 95-100.
- Dörnenburg H., Knorr D. (1994) : Effectiveness of plant-derived and microbial polysachharides as elicitors for anthraquinone synthesis in *Morinda citrifolia* cultures. *J. Agric. Foo Chem.*, **42**, 1048-1052.
- Dörnenburg H., Knorr D. (1996a) : Generation of colors and flavors in plant cell and tissue cultures. *Critic. Rev. in Plant Sci.*, **15** (2)141-168.
- Dörnenburg H., Knorr D. (1996b) : Production of phenolic flavor compounds with cultured cells and tissues of *Vanilla species*. *Food Biotechnol.*, **10** (1), 75-62.

- Douglas C., Hoffmann H., Schulz W., Hahlbrock K. (1987) : Structure and elicitor or UV-light expression of two 4-coumarate : CoA ligase genes in parsley. *EMBO J.*, 3 (5), 1189-1195.
- Drewes F. E., Van Staden J. (1995b) : Initiation and solasodine production in hairy root cultures of *Solanum mauritianum* Scop. *Plant Growth Regul.*, 17, 27-31.
- Ebel J., Stäb M. R., Schmidt W. E. (1985) : Induction of enzymes of phytoalexin synthesis in soybean cells by fungal elicitor. In: Primary and Secondary Metablism of Plant cell cultures, Neumann *et al.* (Eds.), *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 247-254.
- Eckey-Kaltenbach H., Ernst D., Heller W., Sandermann H. (1994a) : Biochemical plant responses to ozone. *Plant Physiol.*, 104, 67-74.
- Eckey-Kaltenbach H., Großkopf E., Sandermann H. Jr., Ernst D. (1994b) : Induction of pathogen defence genes in parsley (*Petroselinum crispum* L.) plants by ozone. *Proc. of the Royal Society of Edimburgh*, 102B, 63-74.
- Edelson R. (1988) : Les médicaments photo-activés. *Pour la science*, 132, 64-72.
- Eilert U. (1989) : Elicitor induction of secondary metabolism in dedifferentiated and differentiated *in vitro* systems of *Ruta graveolens*. In : Primary and secondary metabolism of plant cell cultures, Kurz W. G. W. (Ed.), Springer, Berlin, 219-228.
- Ekiert H. (1990) : Furanocoumarins in tissue culture of *Ammi majus*. *Planta Med.*, 56, 572.
- El Modafar C., Clerivet A., Fleuriet A., Macheix J. J. (1993) : Inoculation of *Platanus acerifolia* with *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *Platani* induces scopoletin and umbelliferone accumulation. *European Journal of Biochemistry*, 72, 353-360.
- Ellis B E., Brown S. A. (1974) : Isolation of dimethylallylpyrophosphate : umbelliferone dimethylallyltransferase from *Ruta graveolens*. *Can. J. Biochem.*, 52, 734-738.
- Engler A. (1906) : Die Vegetation der Erde IX. Die Pflanzenwelt Africas. Die Familien der afrikaanischen Pflanzenwelt. 2-Die dikotyledonen Angiospermen : *Casuarinaceae* bis *Dichapetalaceae*. Leipzig-Verlag von Wilhem Engelmann.
- Ermayanti T. M., McComb J. A., O'Brien P. A. (1993) : Cytological analysis of seedling roots, transformed root cultures and roots regenerated from callus of *Swainsona galegifolia* (Andr.) R. Br. *J. of Exp. Bot.*, 44 (259), 375-380.
- Ermayanti T. M., McComb J. A., O'Brien P. A. (1994a) : Stimulation of synthesis and release of swainosonine from transformed roots of *Swainsonia galegifolia*. *Phytochem.*, 36 (2), 313-317.
- Eyrmayanti T. M., McComb J. A., O'Brien P. A. (1994b) : Growth and swainsonine production of *Swainsona galegifolia* (Andr.) R. Br. untransformed and transformed root cultures. *J. of Exp. Bot.*, 45 (274), 633-639.
- Fahrendorf T., Ni W., Shorrosh B. S., Dixon R. A. (1995) : Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XIX. Transcriptional activation of oxidative pentose phosphate pathway genes at the onset of the isoflavonoid phytoalexin response. *Plant Mol. Biol.*, 28, 885-900.

- Farmer E. E., Moloshok T. D., Saxton M. J., Ryan C. A. (1991) : Oligosaccharide signalling in plants. Specificity of oligouronide-enhanced plasma membrane protein phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 266, 3140-3145.
- Farnsworth N. R., Bingell A. S., Cordell G. A., Crone F. A., Fong H. H. S. (1975) : Potential value of plants as resources of new antifertility agents II. *J. of Pharma. Sci.*, 64, 717-754.
- Feckert L. F., Rügenhagen C., Berlin J. (1993) : Increased production of cadaverine and anabasine in hairy root cultures of *Nicotiana tabacum* expressing a bacterial lysine decarboxylase gene. *Plant Mol. Biol.*, 23, 11-21.
- Fett W. F., Jones J. B. (1995) : Microscopy of the interaction of hsp mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* with a non host plant. *Plant Sci.*, 107 (1), 27-39.
- Fett W. F., Zacharius R. M. (1983) : Bacterial growth and phytoalexin elicitation in soybean cell suspension cultures inoculated with *Pseudomonas syringae* pathovars. *Physiol. Plant Pathol.*, 22, 151-172.
- Fett-Neto A. G., Zhang W. Y., DiCosmo F. (1994) : Kinetics of taxol production , growth, and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 205-210.
- Figueiredo A. C., Salomé M., Pais S., Scheffer J. J. C. (1995) : Composition of the essential oil from cell suspension cultures of *Achillea millefolium* ssp. *millefolium*. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 40, 113-118.
- Firmin J. L., Wilson K. E., Rossen L., Johnson A. W. B. (1986) : Flavonoid activation of nodulation genes in *Bradyrhizobium* reversed by other compounds present in plants. *Nature*, 324, 90-92.
- Fitzpatrick T. B., Pathak M. A. (1959) : Historical aspects of methoxylen and other furocoumarins. *J. Invest. Dermatol.*, 32 (5), 229-237.
- Fleming D. (1990) : Dermatitis among grocery workers associated with natural concentrations of furanocoumarins in celery. *Allergy Proc.*, 11, 125-127.
- Forlot P. (1978) : Les psoralènes en photothérapie. Utilisation en cosmétologie. *Journal Pharmaceutique Belge*, 33 (6), 351-365.
- Fouché S. D., Dubery J. A. (1994) : Chalcone isomerase from *Citrus sinensis* : purification and characterization. *Phytochem.*, 37, 127-132.
- Fowlks W. L. (1959) : The chemistry of the psoralens. *J. Invest Dermatol.*, 32 (2), 249-254.
- Franke A. A., Custer L. J., Cerna C. M., Narala K. K.. (1994) : Quantification of phytoestrogen in legumes by HPLC. *J. Agric. Food Chem.*, 42 (9),
- Frankmann K. T., Kauss H. (1994) : Elicitation of 2,3-dihydroxybenzoic acid and ajmalicine in a *Catharanthus roseus* suspension culture. *Bot. Acta*, 107, 300-305.
- Frick M. (1991) : Callogenesis and carbohydrate utilization in *Lemna minor*. *J. Plant Physiol.* , 137, 394-401.
- Frischknecht P. M., Baumann T. W. (1983) : Stress induced formation of purine alkaloids in plant tissue culture of *Coffea arabica*. *Phytochem.*, 24, 2255-2257.

- Fujita Y., Hara Y., Ogino T., Suga C. (1981) : Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. I. Effects of nitrogen sources on the production of shikonin derivatives. *Plant Cell Rep.*, **1**, 59-60.
- Fukami H., Nakajima M. (1971) : Rotenone and the rotenoids. In: Naturally occurring Insecticides. Jacobson M., Crosby D. G. (Eds.), *Dekker, New York*, 71-97.
- Funk C., Brodelius P. (1990) : Influence of growth regulators and elicitors on phenylpropanoid metabolism in suspensions cultures of *Vanilla planifolia*. *Phytochem.*, **29** (3), 845-848.
- Gagnon H., Tahara S., Ibrahim R. K. (1995) : Biosynthesis, accumulation and secretion of isoflavonoids during germination and development of white lupin (*Lupinus albus* L.). *J. Exp. Bot.*, **46** (287), 609-616.
- Gambord O. L., Miller R. A., Ojima V. (1968) : Nutrient requirements of suspensions cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, **50**, 151-158.
- Garde E., Micic S. (1994) : 8-MOP increases daytime plasma melatonin levels in humans through inhibition of metabolism. *Photochem. Photobiol.*, **60** (5), 475-480.
- Gartland K. M. A., Mc Innes E., Hall J. F., Mulligan B. J., Morgan A. J., Elliott M. C., Davey M. R. (1991) : Effects of Ri plasmid *rol* gene expression on the IAA content of transformed roots of *Solanum dulcamara* L. *Plant Growth Regul.*, **10**, 235-241.
- Gautheret R. J. (1934) : Culture du tissu cambial. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **198**, 2195-2196.
- Girod P. A., Zrýd J. P. (1991) : Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris* L.) cells : differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **25**, 1-12.
- Godwin I., Ford Lloyd B., Newbury H. J. (1992) : *In vitro* approaches to extending the host-range of *Agrobacterium* for plant transformation. *Aust. J. Bot.*, **40**, 751-763.
- Godwin I., Todd G., Ford Lloyd B., Newbury H. J. (1991) : The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species. *Plant Cell Rep.*, **9** (12), 671-675.
- Gowri G., Paiva N. L., Dixon R. A. (1991) : Stress response in alfalfa (*Medicago sativa* L.) 12. Sequence analysis of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) cDNA clones appearance of PAL transcripts in elicitor-treated cell cultures and developing plants. *Plant Mol. Biol.*, **17**, 415-429.
- Graham T. L. (1991b) : Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant Physiol.*, **95**, 594-603.
- Graham T. L., Kim J. E., Graham M. Y. (1990) : Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with *Phytophthora megasperma*. *MPMI*, **3**, 157-166.
- Gränicher F., Christen P., Kamalaprija P., Burger U. (1995a) : An iridoid diester from *Valeriana officinalis* var. *sambucifolia* hairy roots. *Phytochem.*, **38** (1), 103-105.

- Gränicher F., Christen P., Kapétanidis I. (1995b) : Production of valepotriates by hairy root cultures of *Centranthus ruber* DC. *Plant Cell Rep.*, **14**, 294-298.
- Gränicher F., Christen P., Kapetanidis I. (1995c) : Essential oils from normal and hairy roots of *Valeriana officinalis* var. *sambucifolia*. *Phytochem.*, **40** (5), 1421-1424.
- Grimal J. Y. (1989) : Dosages de furocoumarines sur divers organes de Psoralées. Mémoire de maîtrise, Université de Nancy I, 21p.
- Guo Z. J., Ohta Y. (1994) : Effect of ethylene biosynthesis on the accumulation of 6-methoxymellein induced by elicitors in carrot cells. *J. Plant Physiol.*, **144**, 700-704.
- Gustine D. L., Moyer B. G. (1982) : Retention of phytoalexin regulation in legume callus cultures. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **1**, 255-263.
- György P., Murata K., Ikehata H. (1964) : Antioxydants isolated from fermented soybeans (tempeh). *Nature*, **203**, 870-872.
- Hadwiger L. A., Ogawa T., Kuyama H. (1994) : Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers. *MPMI*, **7** (4), 531-533.
- Hahlbrock K., Scheel D. (1989) : Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *An. Rev. of Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **40**, 347-369.
- Hakamatsuka T., Sankawa U. (1993) : Recent progress in studies of the biosynthesis of isoflavonoids : oxidative aryl migration during the formation of the isoflavone skeleton. *J. Plant Res., Special Issue*, **3**, 129-144.
- Hakamatsuka T., Shinkai K., Noguchi H., Ebizuka Y., Sankawa U. (1992) : Isoflavone dimers from yeast extract-treated cell suspension cultures of *Pueraria lobata*. *Z. Naturforsch.* **47c**, 177-182.
- Hamerski D., Matern U. (1988) : Elicitor-induced biosynthesis of psoralens in *Ammi majus* L. suspension cultures, microsomal conversion of demethylsuberosin into (+)marmesin and psoralen. *Eur. J. Biochem.*, **171**, 369-375.
- Hamerski D., Schmitt D., Matern U. (1990) : Induction of two prenyltransferases for the accumulation of coumarine phytoalexins in elicitor treated *Ammi majus* cell suspension cultures. *Phytochem.*, **29**, 1131-1135.
- Hamill J. D., Parr A. J., Robins R. J., Rhodes M. J. C. (1986) : Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.*, **5**, 111-114.
- Hanagata N., Uehara H., Ito A., Takeuchi T., Karube I. (1994) : Elicitor for red pigment formation in *Carthamus tinctorius* cultured cells. *J. Biotechnol.*, **34**, 71-77.
- Handa T. (1996) : Transformation of Prairie Gentian (*Eustoma grandiflorum*) with *Agrobacterium rhizogenes* harboring β -glucuronidase (GUS) and neomycin phosphotransferase II (NPT II) genes. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **64** (4), 913-918.

- Hara M., Kobayashi Y., Fukui H., Tabata M. (1991) : Enhancement of berberine production by spermidine in *Thalictrum minus* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.*, **10**, 494-497.
- Harborne J. B. (1979) : *In: Herbivores : Their interaction with secondary plant metabolites.* Rosendahl G. A., Jansen D. H. (Eds), *Academic Press, New York*, 619-655.
- Harborne, J. B. (1988) : The flavonoids, Advances in research since 1980. p. xiii. *Chapman and Hall, London.*
- Harnes D. K., Thune P. (1993) : Photochemotherapy-psoralen + UVA (PUVA)-increased risk of cancer? *Tissenkraft for Den Norske Laegeforening*, **113** (2), 200-201.
- Harrison M. J., Dixon R. (1993) : Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *MPMI*, **6** (5), 643-654.
- Hayashi T., Gotoh K., Kasahara K. (1996) : Production of scopadulciol by cultured tissues of *Scoparia dulcis*. *Phytochem.*, **41** (1), 193-196.
- Hayashi T., Gotoh K., Ohnishi K., Okamura K., Asamizu T. (1994) : 6-methoxy-2-benzoxazolinone in *Scoparia dulcis* and its production by cultured tissues. *Phytochem.*, **37** (6), 1611-1614.
- Helene C. (1980) : Furocoumarines et photochimiothérapie. *Pathol. Biol.*, **28** (5), 281-285.
- Herman C., Adlercreutz T., Goldin B. R., Gorbach S. L., V. Höckerstedt K. A., Watanabe S., Hämäläinen E. K., Markanen M. H., Mäkelä T. H., Wähälä K. T., Hase T. A., Fotsis T. (1995). Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J. Nutr.*, **125**, 757S-770S.
- Higashi K., Ogawara H. (1994) : Daidzein inhibits insulin- or insulin-like growth factor-1-mediated signaling in cell cycle progression of Swiss 3T3 cells. *Biochim. Biophys Acta*, **1221**, 29-35.
- Hirose M., Yamakawa T., Kodama T., Komamine A. (1990) : Accumulation of betacyanin in *Phytolacca americana* cells and of anthocyanin in *Vitis* sp. cells in relation to cell division in suspension cultures. *Plant Cell Physiol.*, **31** (2), 267-271.
- Hirotani M., Zhou Y., Rui H., Furuya T. (1994) : Cycloartane triterpene glycosides from the hairy root cultures of *Astragalus membranaceus*. *Phytochem.*, **37** (5), 1403-1407.
- Hoagland R. E. (1990) : *Alternaria cassiae* alters phenylpropanoid metabolism in Sicklpod (*Cassia obtusifolia*). *J. Phytopathol.*, **130**, 177-187.
- Holton T. A., Cornish E. C. (1995) : Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell*, **7**, 1071-1083.
- Hook I. (1994) : Secondary metabolites in hairy root cultures of *Leontopodium alpinum* Cass. (Edelweiss). *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **38**, 321-326.
- Hoshino T., Chida M., Yamaura T., Yoshizawa Y., Mizutani J. (1994) : Phytoalexin induction in green pepper cell cultures treated with arachidonic acid. *Phytochem.*, **36** (6), 1417-1419.

- Hrazdina G., Wagner G. (1985) : Metabolic pathways as enzyme complexes : evidence for the synthesis of phenylpropanoids and flavonoids on membrane associated enzyme complexes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **237**, 88-100.
- Huckel V. (1996) : Les Psoralènes, interaction, mode d'action, effets secondaires et ressources naturelles. Thèse de Pharmacie. Faculté de Pharmacie de Nancy, 105 p.
- Huffman G. A., White F. F., Gordon M. P., Nester E. W. (1984) : Hairy root inducing plasmid : physical map and homology to tumour inducing plasmids. *J. Bacteriol.*, **157**, 959-967.
- Hung C. F., Prapaipong H., Berenbaum M. R., Schuler M. A. (1995) : Differential induction of cytochrome P450 transcripts in *Papilio polyxenes* by linear and angular furanocoumarins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **25** (1), 89-99.
- Hutchins A. M., Slavin J. L., Lampe J. W. (1995). Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products. *J. American diet. assoc.*, **95** (5), 545-551.
- Ikemeyer D., Barz W. (1989) : Comparison of secondary product accumulation in photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic *Nicotiana tabacum* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.*, **8**, 479-482.
- Ikenaga T., Oyama T., Muranaka T. (1995) : Growth and steroidal saponin production in hairy root cultures of *Solanum aculeatissimum*. *Plant Cell Rep.*, **14**, 413-417.
- Ilan A., Zanewich K. P., Rood S. B., Dougall D. K. (1994) : Gibberellic acid decreases anthocyanin accumulation in wild carrot cell suspension cultures but does not alter 3'-nucleotidase activity. *Physiol. Planta.*, **92**, 47-52.
- Innocenti G., Cappelletti E. M., Caporale G. (1984) : Morphological and chemical characteristics of some Australian *Psoralea* species. *Int. J. Drug. Res.*, **22**, 97-109.
- Innocenti G., Cappelletti E. M., Caporale G. (1991) : Furocoumarin contents in the vegetative organs of cultivated *Psoralea* species. *Int. J. Pharm.*, **29**, 311-316.
- Innocenti G., Dall'acqua F., Caporale G. (1976) : Investigations of the content of furocoumarins in *Apium graveolens* and in *Petroselinum sativum*. *Planta Med.*, **29**, 165-170.
- Innocenti G., Dall'Acqua F., Guiotto A., Caporale G. (1977) : Investigations on the role of 7-demethylsuberosin in the biosynthesis of linear furocoumarins. *Atti Inst. Veneto Sci., Lett. Arti. Cl. SCI. Mat. Nat.* **135**, 37-46.
- Ishimaru K., Arakawa H., Yamanaka M., Shimomura K. (1994) : Polyacetylenes in *Lobelia sessilifolia* hairy roots. *Phytochem.*, **35** (2), 365-369.
- Ishimaru K., Shimomura K. (1991) : Tannin production in hairy root cultures of *Geranium thunbergii*. *Phytochem.*, **30** (3), 825-828.
- Isogai Y., Komoda Y., Okamoto T. (1970) : Plant growth regulators in the pea plant (*Pisum sativum*). *Chem. Pharma. Bull., Tokyo*, **18**, 1872.

- Jacq B., Lesobre O., Sangwan R. S., Sangwan-Norreel B. (1993) : Factors influencing T-DNA transfer in *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarbeet. *Plant Cell Rep.*, **12**, 621-624.
- Jafari M. A., Kiss J., Gercacz J., Heszky L. E. (1995) : High efficiency callus induction and plant regeneration in petiole culture of four poplar genotypes. *Acta Biol. Hungarica*, **46** (1), 51-59.
- Jensen E. V., Jacobson H. I. (1962) : Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Rec. Prog. Hormonal Res.*, **18**, 387-414.
- Jing Y., Waxman S. (1995) : Structural requirements for differentiation-induction and growth-inhibition of mouse erythroleukemia cells by isoflavonones. *Anticancer Res.*, **15**, 1147-1152.
- Johnson C., Brannon D. R., Kuc J. (1973) : Xanthotoxin : a phytoalexin of *Pastinaca sativa* roots. *Phytochem.*, **12**, 2961-2962.
- Jordan V. C., Mittal S., Gosden R. K., Lieberman M. E. (1985) : Structure-activity relationships of estrogens. *Environ. Health Persp.*, **61**, 97-110.
- Jorin J., Dixon R. A. (1990) : Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) II. Purification, characterization, and induction of Phenylalanine Ammonia-Lyase isoform from elicitor-treated cell suspension cultures. *Plant Physiol.*, **92**, 447-455.
- Juntilla G. (1976) : Allelopathic inhibitor in seeds of *Heracleum laciniatum*. *Physiol. Planta.*, **36**, 374-378.
- Takegawa K., Suda J., Sugiyama M., Komamine A. (1995) : Regulation of anthocyanin biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* in relation to cell division. *Physiol. Planta.*, **94**, 661-666.
- Kato K., Shiozawa Y., Yamada A., Nishida K., Noguchi M. (1972) : A jar fermenter for the culture of *Nicotiana tabacum* L. cell suspensions. *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 899-902.
- Kato T., Kobayashi M., Sasai N., Kitahara Y., Takahashi N. (1978) : The coumarin heraclenol as a growth inhibitor in parsley seeds. *Phytochem.*, **17**, 158-159.
- Kauss H., Jeblick W., Ziegler J., Krabler W. (1994) : Pretreatment of parsley (*Petroselinum crispum* L.) suspension cultures with methyl jasmonate enhances elicitation of activated oxygen species. *Plant Physiol.*, **105**, 89-94.
- Keighery G. J., Dixon I. R. (1981) : *Psoralea* : The genus in Western Australia. *Austr. Plants*, **11** (86), 58-59.
- Kessmann H., Barz W. (1987) : Accumulation of isoflavones and pterocarpan phytoalexins in cell suspension cultures of different cultivars of Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Cell Rep.*, **6**, 55-59.
- Kim J. H., Lee H. J. (1993) : Production of monoterpenoid flavor compounds by suspension cultures of peppermint cells. *Han'guk Nonghwahakhoe Chi* **35**, 443-448. In: CA Selects : Flavors & Fragrances, **13**, 5.

- Kishitani S., Yomoda A., Konno N., Tanaka Y. (1993) : Involvement of Phenylalanine Ammonia-Lyase in the development of pollen in broccoli (*Brassica oleracea* L.). *Sex Plant Reprod.*, **6**, 244-248.
- Knobloch K. H., Hahlbrock K. (1975) : Isoenzymes of *p*-coumarate : CoA ligase from cell suspension cultures of *Glycine max*. *Eur. J. Biochem.*, **52**, 311-320.
- Knop W. (1865) : Quantitative Untersuchungen über die Ernährungsprozesse der Pflanzen. *Landwirtsch. Vers. Stn.*, **7**, 93-107.
- Kossel H. (1891) : Über die chemische Zusammensetzung der Zelle. *Arch Physiol Physiol Abt, Arch Anat Physiol*, 181-186.
- Kuchitsu K., Kikuyama M., Shibuya (1993) : *N*-acetylchitooligosaccharides, biotic elicitor for phytoalexin production induce transient membrane depolarization in suspension-cultured rice cells. *Protoplasma*, **174**, 79-81.
- Kumar V., Bulumula H. N. K., Wimalasiri W. R., Reisch J. (1994) : Coumarins and an indole alkaloid from *Pampurus missionis*. *Phytochemistry*, **36** (4), 879-881.
- Kuske H. (1938) : Experimentelle Untersuchungen zur Photosensibilisierung der Haut durch pflanzliche Wirkstoffe. *Arch. F., Dermatol. Syphil.*, **178**, 112-113.
- Kuzovkina I. N., Mantrova O. V., Al'terman I. E., Yakimov S. A. (1996) : Culture of genetically transformed hairy roots derived from anthraquinone-producing European Madder plants. *Russian J. Plant Physiol.*, **43** (2), 252-258.
- Kyo M., Miyauchi Y., Fujimoto T., Mayama S. (1990) : Production of a nematocidal compound in hairy root cultures of *Tagetes patula* L. *Plant Cell Rep.*, **9**, 393-397.
- Laurent M. E. M. (1891) : Recherches sur les nodosités radicales des Légumineuses. *Annales de l'Institut Pasteur*, **5**, 105-139.
- Lawton M. AM, Dixon R. A., Hahlbrock K., Lamb C. (1983) : Rapid induction of the synthesis of Phenylalanine Ammonia-Lyase and Chalcone synthase in elicitor-treated plant cells. *Eur. J. Biochem.*, **129**, 593-601.
- Le Bars J., Le Bars P. (1984) : Méthodes pratiques du dosage du coumestrol dans la luzerne et ses dérivés. *Revue Med. Vet.* **135** (2), 73-76.
- Lee D., Ellard M., Wanner L. A., Davis K. R., Douglas C. J. (1995) : The *Arabidopsis thaliana* 4-coumarate:CoA ligase (4CL) gene : stress and developmentally regulated expression and nucleotide sequence of its cDNA. *Plant Mol. Biol.*, **28**, 871-884.
- Leguay J. J., Piécoup M., Puckett J., Jouanneau J. P. (1988) : Common responses of cultured soybean cells to 2,4.D starvation and fungal elicitor treatment. *Plant Cell Rep.*, **7**, 19-22.
- Legué V., Vilaine F. Tepfer M., Peral G. (1994) : Modification of the gravitropic response of seedling roots of rapeseed (*Brassica napus*) transformed by *Agrobacterium rhizogenes* A4. *Physiol. Planta.*, **91**, 559-566.
- Leifert C., Murphy K. P., Lumsden P. J. (1995) : Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **14** (2), 83-109.

- Leopold A. S., Erwin M., Oh J., Browning B. (1976) : Phytoestrogens : adverse effects on reproduction in California quails. *Science*, **191**, 98-100.
- Lerouge P., Roche P., Faucher C., Mailliet F., Truchet G., Prome J. C., Denarie J. (1990) : Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*, **344**, 781-784.
- Li W. X., Kodama O., Akatsuka T. (1991) : Role of fatty acids in rice phytoalexin production. *Agric. Biol. Chem.*, **55** (4), 1041-1047.
- Lindl T., Kreuzaler F., Hahlbrock K. (1973) : Synthesis of *p*-coumaroyl coenzyme A with a partial purified *p*-coumarate : CoA ligase from cell suspension cultures of Soybean (*Glycine max*). *Biochem. Biophys. Acta*, **302**, 457-464.
- Lipp Joao K. H., Brown T. A. (1994) : Long-term stability of root cultures of tomato transformed with *Agrobacterium rhizogenes* R1601. *J. Exp. Bot.*, **45** (274), 641-647.
- Loake G. J., Choudhary A. D., Harrison M. J., Mavandad M., Lamb C. J., Dixon R. A. (1991) : Phenylpropanoid pathway intermediates regulate transient expression of a chalcone synthase gene promoter. *The Plant Cell*, **3**, 829-840.
- Lozoya E., Hoffmann H., Douglas C., Schulz W., Scheel D., Hahlbrock K. (1988) : Primary structures and catalytic properties of isoenzymes encoded by the two 4-coumarate : CoA ligase genes in parsley. *Eur. J. Biochem.*, **176**, 661-667.
- Mackenbrock U., Gunia W., Barz W. (1993) : Accumulation and metabolism of medicarpin and maackiain malonylglucosides in elicited chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures. *J. Plant Physiol.*, **142**, 385-391.
- Mäkälä S., Santti R., Salo L., McLachan J. A. (1995) : Phytoestrogens are partial estrogen agonists in the adult male mouse. *Environ. Health Persp.*, **103** (Supp 7), 123-127.
- Malamy J., Carr J. P., Klessig D. F., Raskin I. (1990) : Salicylic acid : a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, **250**, 1002-1004.
- Maldonado-Mendoza I. E., Ayora-Talavera T., Loyola-Vargas V. M. (1993) : Establishment of hairy root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **33**, 321-329.
- Mansfield J. W., Bailey J. A. (1984) : In: Phytoalexins : current problem and future prospects. Bailey J. A., Mansfield J. W. (Eds), *Blackie, Glasgow and London*, 319-322.
- Marinelli F., Di Gregorio S., Nutti Ronchi V. (1991) : Phytoalexin production and cell death in elicited carrot cell suspension cultures. *Plant Sci.*, **77**, 261-266.
- Marinelli F., Nutti Ronchi V., Pini D., Salvadori P. (1990) : Induction of 6-methoxymellein and 6-hydroxymellein production in carrot cells. *Phytochem.*, **29**, 849-851.
- Marinelli F., Nutti Ronchi V., Salvadori P. (1994) : Elicitor induction of enzyme activities and 6-methoxymellein production in carrot cell suspension culture. *Phytochem.*, **35** (6) 1457-1460.

- Markaverich B. N., Webb B., Densmore C. L., Gregory R. R. (1995) : Effects of coumestrol on estrogen receptor function and uterine growth in ovariectomized rats. *Environ. Health Persp.*, **103** (6), 574-581.
- Marsen T. A., Simonson M. S., Dunn M. J. (1995) : Thrombin induces preproendothelin-1 gene in endothelial cells by a protein tyrosine-linked mechanism. *Circ.Res.*, **7635**, 987-995.
- Matern U., Strasser H., Wendorff H., Hamerski D. (1988) : *In: Phytochemicals in plant cell cultures*. Vol 5. Constabel F., Vasil I. K., (Eds.), *Academic Press, New York*, 3-21.
- Matsukawa Y., Marui N., Sakai T., Satomi Y., Yoshida M., Matsumoto K., Nishino H., Aoike A. (1993) : Genistein arrests cell cycle progression at G2-M. *Cancer res.* **53**, 1328-1331.
- Matsuura M., Obata A. (1993) : β -glucosidases from soybeans hydrolyse daidzin and genistin. *J. Food Sci.*, **58**, (1), 144-147.
- Matsuura M., Sasaki J., Murao S. (1995) : Studies on β -glucosidases from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin : isolation and characterization of an isozyme. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59** (9), 1623-1627.
- Matsuura T., Kakuda T., Kinoshita T., Takeuchi N., Sasaki K. (1992) : Theanine formation by tea suspension cultures. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1179-1181.
- McCloud E. S., Berenbaum M. R., Tuveson R. W. (1992) : Furanocoumarin content and phototoxicity of rough lemon (*Citrus jambhiri*) foliage exposed to enhanced ultraviolet-B (UVB) irradiation. *J. Chem. Ecol.*, **18** (7), 1125-1137.
- McKey D. (1974) : Adaptative patterns in alkaloid physiology. *American Nat.*, **108**, 305-320.
- McKhann H. I., Hirsch A. M. (1994) : Isolation of chalcone synthase and chalcone isomerase cDNAs from alfalfa (*Medicago sativa* L.): highest transcript levels occur in young roots and root tips. *Plant Mol. Biol.*, **24**, 767-777.
- Mellor R. B., Rosendahl L. (1994) : A soybean peribacteroid space component, riboflavin, represses daidzein-induced common *nod*-gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Plant Physiol.*, **144**, 34-37.
- Merkle T., Frohnmeter H., Schulze-Lefert P., Dangl J. L., Hahlbrock K., Schäfer E. (1994) : Analysis of the Parsley chalcone synthase promoter in response to different light qualities. *Planta*, **193**, 275-282.
- Métreaux J. P., Signer H., Ryals J., Ward E., Wyss-Benz M., Gaudin J., Rashdorf K., Shmid E., Blum W., Inverardi B. (1990) : Increase in salicylic acid at the time of onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, **250**, 1004-1006.
- Meyer H. J., Van Staden J. (1995) : The *in vitro* production of an anthocyanin from callus of *Oxalis linearis*. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **40**, 55-58.
- Miguel M. G., Barroso J. G. (1994) : Accumulation of stress metabolites in cell suspension cultures of *Hyoscyamus albus*. *Phytochem.*, **35** (2), 371-375.
- Miklas P. N. (1993) : Estimating Phenylalanine Ammonia-Lyase activity in common beans inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum*. *Hort. Science*, **28** (9), 937-938.

- Mirjalili N., Linden J. C. (1995) : Gas phase composition effects on suspension cultures of *Taxus cuspidata*. *Biotechnol. Bioeng.*, **48**, 123-132.
- Mita G., Gerardi C., Miceli A., Bollini R., De Leo P. (1994) : Pigment production from *in vitro* cultures of *Alkanna tinctoria* Tausch. *Plant Cell Rep.*, **13**, 406-410.
- Mizukami H., Tabira Y., Ellis B. E. (1993) : Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.*, **12**, 706-709.
- Mizukami H., Tomita K., Ohashi H., Hiraoka N. (1988) : Anthocyanin production in callus cultures of roselle. *Plant Cell Rep.*, **7**, 553-556.
- Molteni A., Brizio-Molteni L., Persky V. (1995) : *In vitro* hormonal effects of soybean isoflavones. *J. Nutr.*, **125**, 751S-765S.
- Morandi D., Le Quere R. (1991) : Influence of nitrogen on accumulation of isosojagol (a newly detected coumestan in soybean) and associated isoflavonoids in roots and nodules of mycorrhizal and non-mycorrhizal soybean. *New Phytol.*, **117**, 75-79.
- Moreno P. R. H., Van der Heijden R., Verpoorte R. (1993) : Effect of terpenoid precursor feeding and elicitation on formation of indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep.*, **12**, 702-705.
- Moreno P. R. H., Van der Heijden R., Verpoorte R. (1995) : Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus*. A literature survey II: Updating from 1988 to 1993. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **42**, 1-25.
- Mori T., Sakurai M., Seki M., Furusaki S. (1994a) : Effects of conditioning factor on anthocyanin production in strawberry suspension cultures. *J. Sci. Food Agric.* **66**, 381-388.
- Mori T., Sakurai M., Seki M., Furusaki S. (1994b) : Use of auxin and cytokinin to regulate anthocyanin production and composition in suspension cultures of strawberry cell. *J. Sci. Food Agric.* **65**, 271-276.
- Morris P. F., Rudge K., Cresswell R., Fowler M. W. (1989) : Regulation of product synthesis in cell cultures of *Catharanthus roseus*. V. Long-term maintenance of cells on production medium. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **17**, 79-90.
- Morris P. F., Savard M. E., Ward E. W. B. (1991) : *Physiology and molecular Plant Pathology*, **39**, 229.
- Motomori Y., Shimomura K., Mori K., Kunitake H., Nakashima T., Tanaka M., Miyazaki S., Ishimaru K. (1995) : Polyphenol production in hairy root cultures of *Fragaria x ananassa*. *Phytochem.*, **40** (5), 1425-1428.
- Mugnier J. (1988) : Establishment of a new axenic hairy root line by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.*, **7**, 9-12.
- Mukundan U., A. Hjortso M. (1990) : Thiophene content in normal and transformed root cultures of *Tagetes erecta*. A comparison with thiophene content in roots of intact plants. *J. Exp. Bot.*, **41** (232), 1497-1501.

- Muranaka T., Kazuoka T., Ohkawa H., Yamada Y. (1993a) : Characteristics of scopolamine-releasing hairy root clones of *Duboisia leichhardtii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57** (8), 1398-1399.
- Muranaka T., Ohkawa H., Yamada Y. (1993b) : Continuous production of scopolamine by a culture of *Duboisia leichhardtii* hairy root clone in a bioreactor system. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 219-223.
- Murashige T. (1978) : The impact of plant tissue culture on agriculture. In: Frontiers of plant tissue culture. Thorpe T. A. (Eds.), *Calgary, University of Calgary*, 15.
- Murashige T., Skoog F. (1962) : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Planta.*, **5**, 473-497.
- Murray R. D. H., Mendez J., Brown S. A. (1982) : The natural coumarins, occurrence chemistry and biochemistry. *John Wiley & Sons, Chicester, England*.
- Nadaska M., Erdelsky K. (1991) : PAL and SDH-specific activity in elicitor-treated callus culture of *Papaver somniferum* L. during a growth period. *Biologia*, **46** (7), 577-582.
- Nagai N., Kitauchi F., Okamoto K., Kanda T., Shimosaka M., Okazaki M. (1994a) : A transient increase of Phenylalanine Ammonia-Lyase transcript in kinetin-treated tobacco callus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 558-559.
- Nagai N., Kitauchi F., Shimosaka M., Okazaki M. (1994b) : Cloning and sequencing of a full-length cDNA coding for Phenylalanine Ammonia-Lyase from tobacco cell culture. *Plant physiol.*, **104**, 1091-1092.
- Neal J. J., Wu D. (1994) : Inhibition of insect Cytochromes P450 by furanocoumarins. *Pest. Biochem. Physiol.*, **50**, 43-50.
- Nguyen C. (1992) : Contribution à l'étude de la production de psoralène (Furocoumarine) par la culture *in vitro* de plantes du genre *Psoralea* (*Leguminosae*). Thèse de doctorat INPL-ENSAIA, Nancy, 168 p.
- Nguyen C., Bouque V., Bourgaud F., Guckert A. (1997) : Quantification of daidzein and furanocoumarin conjugates of *Psoralea cinerea* L. (*Leguminosae*). *Phytochem. Anal.*, **8**, 27-31.
- Nguyen C., Bourgaud F., Forlot P., Guckert A. (1992) : Establishment of hairy root cultures of *Psoralea* species. *Plant Cell Rep.*, **11**, 424-427.
- Nitsch J. P. (1969) : Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphol.*, **19**, 289-404.
- Notsu S., Saito N., Kosaki H., Inui H., Hirano S. (1994) : Stimulation of Phenylalanine Ammonia-Lyase activity and lignification in Rice callus treated with chitin, chitosan, and their derivatives. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58** (3), 552-553.
- Nuutila A. M., Toivonen L., Kauppinen V. (1994) : Bioreactor studies on hairy root cultures of *Catharanthus roseus* : comparison of three bioreactor types. *Biotechnol. Tech.*, **8** (1), 61-66.

- O'Dowd N. A., McCauley P. G., Richardson D. H. S., Wilson G. (1993) : Callus production, suspension culture and *in vitro* alkaloid yields of *Ephedra*. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **34**, 149-155.
- Oba K., Uritani I. (1979) : Biosynthesis of furanoterpenes by sweet potato cell culture. *Plant Cell Physiol.*, **20**, 207-215.
- Ockendon D. J., Alston R. E., Naifeh K. (1965) : The flavonoids of *Psoralea* (*Leguminosae*). *Phytochem.*, **5**, 601-608.
- Oksman-Caldentey K. M., Sevon N., Vanhala L., Hiltunen R. (1994) : Effect of nitrogen and sucrose on the primary and secondary metabolism of transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **38**, 263-272.
- Ontiveros-Jimenez A., Rodriguez-Monroy M. (1993) : Selección de líneas celulares de *Beta vulgaris* productoras de batallinas. *Biotechnologia, Revista de la Sociedad Mexicana de Biotechnologia y Bioingeniería*, **3** (3 y 4), AV 35- AV40.
- Ozeki Y., Matsuoka M., Ohashi Y., Kano-murakami Y., Yamamoto N. (1989) : Induction and suppression of anthocyanin synthesis in carrot suspension cell cultures regulated by 2,4-D. In: Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. Kurz W. G. W. (Eds.), *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg*, 103-109.
- Pare P. W., Dmitrieva N., Mabry T. J. (1991) : Phytoalexin aurone induced in *Cephalocereus senilis* liquid suspension culture. *Phytochem.*, **30** (4), 1133-1135.
- Park H. H., Hakamatsuka T., Sankawa U., Ebizuka Y. (1995) : Rapid metabolism of isoflavonoids in elicitor-treated cell suspension cultures of *Pueraria lobata*. *Phytochem.*, **38** (2), 373-380.
- Parker J. A., Schulte W., Hahlbrock K., Scheel D. (1991) : An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts. *MPMI*, **4** (1), 19-27.
- Parker R. A., Miller S. J., Gibson D. M. (1989) : Phosphorylation of native 97-kDa 3'-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from rat liver : impact on activity and degradation of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, **264** (9), 4877-4887.
- Parr A. D., Hamill J. D. (1987) : Relationship between *Agrobacterium rhizogenes* transformed hairy root and intact, uninfected *Nicotiana* plants. *Phytochem.*, **26**, 3241-3245.
- Parr A. J., Peerless A. C. J., Hamill J. D., Walton N. J., Robins R. J. (1988) : Alkaloid production by transformed root cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochem.*, **7**, 309-312.
- Pasqualetto P. L., Zimmerman R. H., Fordham I. (1988) : The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vitro*. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **14**, 31-40.
- Pathak M. A., Farrington D. J., Fitzpatrick T. B. (1962) : The presently known distribution of furocoumarins (psoralens) in plants. *J. Invest. Dermatol.*, **39**, 225-229.
- Pathak M. A., Fitzpatrick T. (1992) : The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA) : 2000 BC to 1992. *J. Photochem. Photobiol.*, **14**, 3-22.

- Payne M. A., Hamill J. D., Robins R. J., Rhodes M. J. C. (1987) : Production of hyoscyamine by hairy root culture of *Datura stramonium*. *Planta Med.*, **53**, 474-478.
- Pendharkar M. B., Nair P. M. (1995) : A comparative study of phenylpropanoid metabolism in gamma irradiated and unirradiated potato tubers. *Potato Res.*, **38**, 187-198.
- Petit A., Dessaux Y., Tempé J. (1978) : The biological significance of opines. I. A study of opine catabolism by *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. 4 th Int. Conf. Plant Pathog. Bact.* Ridé (Eds.), INRA Angers, 143-152.
- Phillips D. A., Kalpunik Y. (1995) : Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts. *Trends in Microbiol.*, **3** (2), 58-64.
- Piovan A., Filippini R., Innocenti G., Caniato R., Cappelletti E. M. (1996) : IX *Coronilla* species : *in vitro* culture and the production of coumarin compounds. *In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 37, Medicinal and Aromatic Plants IX*, Bajaj Y. P. S. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 127-143.
- Porter J. R. (1991) : Host-range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **10** (4), 387-421.
- Pratt D. E., Birac P. M. (1979) : Source of antioxydant activity os soybeans and soy products. *J. Food Sci.*, **44**, 1720-1722.
- Price K. R., Fenwick G. R. (1985) : Natural occurring oestrogens in foods : a review. *Food additives and contaminants*, **2** (2), 73-106.
- Quadri L. E. N., Giuletti A. M. (1993) : Effect of elicitation on the accumulation of solasodine by immobilized cells of *Solanum eleagnifolium* Cav. *Enz. Microb. Technol.*, **15**, 1074-1077.
- Rathwell W. G., Smith D. A. (1980) : Lack of activity of selected isoflavonoids phytoalexins as protectant fungicides. *Pest. Sci.*, **11**, 568-572.
- Rhodes M. J. C. (1994) : Physiological roles for secondary mtabolites in plants : some progress, many outstanding problems. *Plant Mol. Biol.*, **24**, 1-20.
- Rhodes M. J. C., Robins R. J., Hamill J. D., Parr A. J., Hilton M. G., Walton N. J. (1990) : Properties of transformed root cultures. *In: Secondary products from plant tissue culture*. Charlwood B. V., Rhodes M. J. C. (Eds.), Clarendon Press, Oxford, 201-225.
- Rich P. R., Lamb C. J. (1977) : Biophysical and enzymological studies upon the interaction of *trans*-cinnamic acid with higher plant microsomal cytochromes P450.
- Robbins M. P., Bolwell G. P., Dixon R. A. (1985) : Metabolic changes in elicitor treated cells. Selectivity of enzyme induction in relation to phytoalexin accumulation. *Eur. J. Biochem.*, **148**, 563-569.
- Rocholl M., Talke-Messerer C., Kaiser T., Batschauer A. (1994) : Unit 1 of the mustard chalcone synthase promoter is sufficient to mediate light responses from different photoreceptors. *Plant Sci.*, **97**, 189-198.

- Rodriguez-Monroy M., Jimenez Aparicio A., Davila Ortiz G., Sepulveda Jimenez G. (1994) : Effect of carbon source on cell growth and betalain production in cell suspension culture of *Beta vulgaris*. *Biotechnol. Lett.*, **16** (8), 853-858.
- Rodriguez-Talou J., Giuletti A. M. (1995) : *In vitro* thiophene production by transformed root cultures of *Tagetes laxa (cabrera)*. *Biotechnol. Lett.*, **17** (12), 1337-1342.
- Rossiter R. C., Beck A. B. (1967) : Physiological and ecological studies on the oestrogenic isoflavones in subterranean clover (*T. subterraneum* L.) .V Ontogenic changes. *Aust. J. Agric. Res.*, **18**, 561-573.
- Sakai K., Kusaba K., Tsutsumi Y., Shiraishi T. (1994) : Secondary metabolites in cell culture of woody plants III. Formation of β -thujaplicin in *Cupressus lusitanica* callus cultures treated with fungal elicitors. *Mokuzai Gakkaishi*, **40** (1), 1-5.
- Sakano K., Matsumoto M., Yazaki Y., Kiyota S., Okihara K. (1995a) : Inorganic phosphate as a negative conditioning factor in plant cell culture. *Plant Sci.*, **107**, 117-124.
- Sakano K., Yazaki Y., Okihara K., Mimura T., Kiyota S. (1995b) : Lack of control in inorganic phosphate uptake by *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cells. Cytoplasmic inorganic phosphate homeostasis depends on the tonoplast inorganic phosphate transport system?. *Plant Physiol.*, **108**, 295-302.
- Sakuta M., Tagaki T., Komamine A. (1986) : Growth related accumulation of betacyanin in suspension cultures of *Phytolacca americana* L. *J. Plant Physiol.*, **125**, 337-343.
- Sato K., Yamazaki T., Okuyama E., Yoshihira K., Shimomura K. (1991) : Anthraquinone production by transformed root cultures of *Rubia tinctorum* : influence of phytohormones and sucrose concentration. *Phytochem.*, **30**, 1507-1509.
- Sauerwein M., Yamazaki T., Shimomura K. (1991) : Hernandulcin in hairy root cultures of *Lippia dulcis*. *Plant Cell Rep.*, **9**, 579-581.
- Schenk N., Hsiao K. C., Bornman C. H. (1991) : Avoidance of precipitation and carbohydrate breakdown in autoclaved plant tissue culture media. *Plant Cell Rep.*, **10**, 115-119.
- Schriner R. L., Hull C. J. (1945) : Isoflavones. III. The structure of prunetin and a new synthesis of genistein. *J. Org. Chem.*, **10**, 288-291.
- Schripsema J., Verpoorte R. (1995) : Novel techniques for growth characterization and phytochemical analysis of plant cell suspension cultures. *J. Nat. Prod.*, **58** (9), 1305-1314.
- Schröder G., Brown J. W. S., Schröder J. (1988) : Molecular analysis of resveratrol synthase : cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. *Eur. J. Biochem.*, **172**, 161-169.
- Schröder W., Böhm H. (1995) : Once more : secondary metabolite concentration in whole plants and in cell cultures derived therefrom. *J. Plant Physiol.*, **145**, 126-130.
- Scott B. R., Pathak M. A., Mohn G. R. (1976) : Molecular and genetic basis of furanocoumarins reactions. *Mutation Res.*, **39**, 29-74.

- Selby C., Harvey B. M. R. (1990) : The influence of composition of the basal medium on the growth and morphogenesis of cultured Sitka spruce (*Picea sitchensis*) tissues. *Ann. Bot.* **65**, 395-407.
- Sharma P. D. (1979) : Isoflavones and hypocholesterolemia in rats. *Lipids*, **14**, 535-540.
- Sharp J. M., Doran P. M. (1990) : Characteristics of growth and tropane alkaloid synthesis in *Atropa belladonna* roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Biotechnol.*, **16**, 171-186.
- Shetty K., Asano Y. (1991) : The influence of organic nitrogen sources on the induction of embryogenic callus in *Agrostis alba* L. *J. Plant Physiol.*, **139**, 82-85.
- Shimomura K., Sauerwein M., Ishimaru K. (1991) : Tropane alkaloids in the adventitious and hairy root cultures of solanaceous plants. *Phytochem.*, **30**, 2275-2279.
- Shure K. B., Acree T. E. (1994) : Production of β -damascenone precursors in cell cultures of *Vitis labruscana* cv Concord grapes. *Plant Cell Rep.*, **13**, 477-480.
- Shutt D. A. (1976) : The effects of plant oestrogens on animal reproduction. *Endeavour*, **35**, 110-113.
- Sim S. J., Chang H. N., Liu J. R., Jung K. H. (1994) : Production and secretion of indole alkaloids in hairy root cultures of *Catharanthus roseus* : effects of *in situ* adsorption, fungal elicitation and permeabilization. *J. Ferm. Bioeng.*, **78** (3), 229-234.
- Skoog F., Miller C. O. (1957) : Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **11**, 118-160.
- Smith C. G., Rodgers M. W., Zimmerlin A., Ferdinando D., Bolwell G. P. (1994) : Tissue and subcellular immunolocalization of enzymes of lignin synthesis in differentiating and wounded hypocotyl tissue of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta*, **192**, 155-164.
- Song K. S., Tooda M., Shimizu N., Sankawa U., Ebizuka Y. (1995) : Mannan glycopptide elicits *p*-coumaroylamino acids in *Ephedra distachya* cultures. *Phytochem.*, **38** (1), 95-102.
- Sou tre E., Salvati E., Darcourt G. (1989) : Melatonin and depression. A possible role of psoralens. In : Psoralens : Past, present and future of photochemoprotection and other biological activities. Fitzpatrick T. B., Forlot P., Pathak M. A., Urbach F. (Eds.), *John Libbey Eurotext., Montrouge*, 301-326.
- Sparvoli F., Martin C., Scienza A., Gavazzi G., Tonelli C. (1994) : Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol. Biol.*, **24**, 743-755.
- Späth E. (1937) : Die natürlichen Cumarine. *Chem Ber*, **70** (A), 83-117.
- Stachel S. E., An G., Flores C., Nester E. W. (1985) : A Tn3 *lacZ* transposon for the random generation of β -galactosidase gene fusions : application to the analysis of gene expression in *Agrobacterium*. *EMBO J.*, **4** (4), 891-898.
- Stafford A., Smith L. (1986) : Effect of modification of the primary precursor level by selection and feeding on indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus*. In: Secondary

- metabolism in plant cell cultures. Morris P., Scragg A. H., Stafford A., Fowler M. W. (Eds.), *Cambridge Univ. Press*, 250-256.
- Steinbrenner B., Schroeder R., Knoop B., Beiberbeck R. (1989) : Viability factors in cell suspension cultures - a novel bioassay. *J. Plant Physiol.*, **134**, 582-585.
- Stek W., Brown S. A. (1970) : Biosynthesis of angular furocoumarins. *Can. J. Biochem.*, **48**, 872-880.
- Stob M. (1983) : Naturally occurring food toxicants : oestrogens. In : Handbook of naturally occurring food toxicants. Rechcigl M. Jr (Ed.), *CRC Press, Boca Ratos, Florida*, 81-100.
- Ströbel J., Hieke J. M., Gebauer E., Wind E., Gröger D. (1990) : The influence of organic and inorganic chemical factors on cell growth and anthraquinone formation in suspension culture of *Gallium vernum*. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **186**, 117-124.
- Subroto M. A., Doran P. M. (1994) : Production of steroidal alkaloids by hairy root of *Solanum aviculare* and the effect of gibberelic acid. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **38**, 93-102.
- Subroto M. A., Kwok K. H., Hamill J. D., Doran P. M. (1996) : Coculture of genetically transformed roots and shoots for synthesis, translocation, and biotransformation of secondary metabolites. *Biotechnol. Bioeng.*, **49**, 481-494.
- Tahara S., Ibrahim R. K. (1995) : Prenylated isoflavonoids - an update. *Phytochem.*, **18** (5), 1073-1094.
- Takeda J., Abe S., Hirose Y., Ozeki Y. (1993) : Effect of light and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the level of mRNAs for Phenylalanine Ammonia-Lyase and chalcone synthase in carrot cells cultured in suspension. *Physiol. Planta.*, **89**, 4-10.
- Takeuchi A., Matsumoto S, Hayatsu M. (1994) : Chalcone synthase from *Camellia sinensis* : isolation of the cDNAs and the organ-specific and sugar-responsive expression of the genes. *Plant Cell Physiol.*, **35** (7), 1011-1018.
- Takahara-Matsuura T., Sakane I., Kakuda T., Kitada T., Kinoshita T., Takeuchi N. (1994) : Effects of plant growth regulators and carbon sources on theanine formation in callus cultures of tea (*Camellia sinensis*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 1519-1521.
- Tanaka Y., Kojima M. Uritani I. (1974) : Properties, development and cellular -localization of cinnamic acid 4-hydroxylase in cut-injured sweet potato. *Plant Cell Physiol.*, **15**, 843-854.
- Tani M., Takeda K., Yazaki K., Tabata M. (1993) : Effects of oligogalacturonides on biosynthesis of shikonin in *Lithospermum* cell cultures. *Phytochem.*, **34**, 1285-1290.
- Tao R., Handa T., Tamura M., Sugiura A. (1994) : Genetic transformation of Japanese Persimmon (*Diospyros kaki* L.) by *Agrobacterium rhizogenes* wild type strain A4. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, **63** (2), 283-289.
- Tepfer D., Tempé J. (1981) : Production d'agropine par des racines formées sous l'action d'*Agrobacterium rhizogenes*, souche A4. *C. R. Acad. Sci.*, **292**, série III, 153-156.
- Thioly-Bensoussan D., Berretti B., Grupper C. (1988) : PUVA and rePUVA in the treatment of mycosis fungoides : 58 cases of mycosis with 710, 10years follow up. In:

- Psoralens in 1988 : Past, Present and Future of photochemoprotection and other biological activities. Fitzpatrick T. B., Forlot P., Pathak M. A., Urbach F. (Eds.), *John Libbey Eurotext, Montrouge*, 293-300.
- Thomas P., Amblard P. (1988) : La PUVAthérapie. *Dans* : Photodermatologie et photothérapie. *Editions Masson, Paris*, 67-78.
- Threfall D. R., Whitehead I. M. (1988) : The use of biotic and abiotic elicitors to induce the formation of secondary plant products in cell suspension cultures of solanaceous plants. *Biochem. Soc. Trans.*, **16**, 71-75.
- Tietjen K. G., Hunkler D., Matern U. (1983) : Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi. 1. Identification of induced products as coumarin derivatives. *Eur. J. Biochem.*, **131**, 401-407.
- Tietjen K. G., Matern U. (1984) : Induction and suppression of phytoalexin synthesis in cultured cells of safflower, *Carthamus tinctorius* L. by metabolites of *Alternaria carthami* Chowdhury. *Arch. Biochem. Biophys.*, **229**, 136-144.
- Topping J. F., Wei W., Clarke M. C., Muskett P., Lindsey K (1996) : *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* ; application in T-DNA tagging. *In*: Methods in Molecular Biology : Plant gene transfer and expression protocols. H. Jones Humana Press Inc. (Ed.), *Totowa, New Jersey*, 64-76.
- Torrey J. M. D., Gray A. M. D. (1969) : Flora of North America. 1, Facsimile of the 1838-43 Edition, *Hafner Publishing Company, New York*, 711p.
- Uden W. V., Pras N., Maingré T. M. (1990) : The accumulation of podophyllotoxin-b-D-glucoside by cell suspension cultures derived from the conifer *Callitris drummondii*. *Plant Cell Rep.*, **9**, 257-260.
- Uozumi N., Makino S., Kobayashi T. (1995) : 20-hydroxyecdysone production in *Ajuga* hairy root controlling intracellular phosphate content based on kinetic model. *J. Ferm. Bioeng.*, **80** (4), 362-368.
- Van Ark H. F., Zaal M. A. C. M., Creemers-Molenaar J., Van der Valk P. (1991) : Improvement of the tissue culture response of seed-derived callus cultures of *Poa pratensis* L. : Effect of gelling agent and abscissic acid. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **27**, 275-280.
- Van der Heijden R., Verpoorte R., Harkes P. A. A. (1988) : Effects of elicitors on the production of secondary metabolites in plant cell cultures of *Conchona*, *Rubia*, *Morinda* and *Tabernaemontana*. *In*: Manipulating secondary metabolism in culture. Robins R. J., Rhodes M. J. C. (Eds.), *Cambridge Univ. Press. Cambridge UK.*, 217-224.
- Van der Heijden R., Verpoorte R., Hoekstra S. S., Hoge J. H. C. (1994) : Nordmannacanthal, a major anthraquinone from an *Agrobacterium rhizogenes* root culture of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol. Biochem.*, **32** (3), 399-404.
- Van der Plas L. H. W., Eijkelboom C., Hagendoorn M. J. M. (1995) : Relation between primary and secondary metabolism in plant cell suspensions. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **43**, 111-116.

- Van Etten H. D. (1976) : Antifungal activity of pterocarpan and other selected isoflavonoids. *Phytochem.*, **15**, 655-659.
- Van Uden W., Pras N., Homan B., Malingré T. M. (1991) : Improvement of the production of 5-methoxypodophyllotoxin using a new selected root culture of *Linum flavum* L. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **27**, 115-121.
- Vanhala L., Hiltunen R., Oksman-Caldentey K. M. (1995) : Virulence of different *Agrobacterium* strains on hairy root formation of *Hyoscyamus muticus*. *Plant Cell Rep.*, **14**, 236-240.
- Varga J. M., Wiesenhahn G., Bartholomew J. C., Hearth J. E. (1982) : Dose related effects of psoralen and ultraviolet light on the cell cycle of murine melanoma cells. *Cancer res.*, **42**, 2223-2226.
- Walz E. (1931) : Isoflavon und saponin-glucoside in *Soja hispida*. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 118-155.
- Wang H., Murphy P. A. (1994) : Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.*, **42** (8), 1666-1672.
- Wanner L. A., Li G., Ware D., Somssich I., Davis K. (1995) : The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **27**, 327-338.
- Weathers P. J., Cheetham R. D., Follansbee E., Teoh K (1994) : Artemisinin production by transformed roots of *Artemisia annua*. *Biotechnol. Lett.*, **16** (12), 1281-1286.
- Wei H. C., Wei L. H., Frenkel K., Bowen R., Barnes S. (1993) : Inhibition of tumor promotor-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein. *Nutr. Cancer*, **20**, 1-12.
- Wei H., Bowen R., Cai Q., Barnes S. and Wang Y. (1995) : Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **208**, 124-130.
- Weidenborner M., Hindorf H., Weltzien H. W., Jha H. C. (1992) : An effective treatment of legume seeds with flavonoids and isoflavonoids against storage fungi of the genus *Aspergillus*. *Seed Sci. Technol.*, **20**, 447-463.
- Weidenborner M., Jha H. C. (1994) : Structure-activity relationships among isoflavonoids with regard to their antifungal properties. *Mycol. Res.*, **98** (12), 1376-1378.
- Welle R., Grisebach H. (1988) : Isolation of a novel NADPH-dependent reductase which coacts with chalcone synthase in the biosynthesis of 6'-deoxychalcone. *FEBS Lett.*, **236**, 221-225.
- Welle R., Grisebach H. (1989) : Phytoalexin synthesis in soybean cells : elicitor induction of reductase onvolved in biosynthesis of 6'-deoxychalcone. *Arch. Biochem. Biophys.*, **272**, 97-102.
- Whetten R. W., Sederoff R. R. (1992) : Phenylalanine Ammonia-lyase from Lobloly Pine. Purification of the enzyme and isolation of complementary DNA clones. *Plant Physiol.*, **98**, 380-386.

- White F. F., Garfinkel D. J., Huffman G. A., Gordon M. P., Nester E. W. (1985) : Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Bacteriol.*, **164**, 33-44.
- Whitehead I. M., Ewing D. F., Threfall D. R. (1988) : Sesquiterpenoids related to the phytoalexin debneyol from elicited cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochem.*, **27** (5), 1365-1370.
- Whitney P. J. (1992) : Novel bioreactors for the growth of roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Enz. Microb. Technol.*, **14**, 13-17.
- Wibberley M. S., Lenton J. R., Neill S. J. (1994) : Sesquiterpenoid phytoalexins produced by hairy roots of *Nicotiana tabacum*. *Phytochem.*, **37** (2), 349-351.
- Wickremesinhe E. R. M., Arteca R. N. (1993) : *Taxus* callus cultures : initiation, growth optimization, characterization and taxol production. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **35**, 181-193.
- Wilcox J. N., Blumenthal B. F. (1995) : Thrombotic mechanisms in atherosclerosis : potential impact of soy proteins. *J. Nutr.*, **125**, 631S-638S.
- Wilson P. D. G., Hilton M. G., Robins R. J., Rhodes M. J. C. (1987) : Fermentation studies of transformed root cultures. In: Bioreactors and Biotransformations (International Conference on Bioreactors and Biotransformations, Gleneagles, Scotland, UK, 9-12 November, 1987). Moody G. W. and Baker P. B. (Eds.), *Elsevier Applied Science Publishers, London*, 38-51.
- Wink M. (1987) : Why do lupin cell cultures fail to produce alkaloids in large quantities? *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **8**, 103-111.
- Xu X., Wang H., Murphy P. A., Cook L., Hendrich S. (1994). Daidzein is a more available soymilk isoflavone than is genistein in adult women. *J. Nutr.*, **124**, 825-832.
- Yagi T., Morisaki M., Kushiro T., Yoshida H., Fujimoto Y. (1996) : Biosynthesis of 24 β -alkyl- Δ^{25} -sterols in hairy roots of *Ajuga reptans* var. *Atropurpurea*. *Phytochem.*, **41** (4), 1057-1064.
- Yamada A., Shibuya N., Komada O., Akatsuka T. (1993) : Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by *N*-acetylchitooligosaccharides. *Biosc. Biotech. Biochem.*, **57** (3), 405-409.
- Yamakawa Y., Chen L. H. (1996) : *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) by direct formation of adventitious buds. *J. Japan Soc. Hort. Sci.*, **64** (4), 741-747.
- Yu S., Doran P. M. (1994) : Oxygen requirements and mass transfer in hairy root culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 880-887.
- Yukimune Y., Hara Y., Yamada Y. (1994a) : Tropane alkaloid production in root cultures of *Duboisia myoporoides* obtained by repeated selection. *Biosc. Biotech. Biochem.*, **58** (8), 1443-1446.

- Yukimune Y., Tabata H., Hara Y., Yamada Y. (1994b) : Increase of scopolamine production by high density culture of *Duboisia myoporoides* roots. *Biosc. Biotech. Biochem.*, **58** (8), 1447-1450.
- Yura Y., Yoshida H., Sato M. (1993) : Inhibition of herpes simplex virus replication by genistein, an inhibitor of protein-tyrosine kinase. *Arch. Virol.*, **132**, 451-461.
- Zangerl A. R., Berenbaum M. R. (1987) : Furanocoumarins in wild parsnip : effects of photosynthetically active radiation, ultraviolet light, and nutrients. *Ecology*, **68** (3), 516-520.
- Zangerl A. R., Berenbaum M. R. (1995) : Spatial, temporal, and environmental limits on xanthotoxin induction in wild parsnip foliage. *Chemoecology*, **5** (6), 37-42.
- Zangerl A. R., Rutledge C. E. (1996) : The probability of attacks and patterns of constitutive and induced defense : a test of optimal defense theory. *The American Nat.*, **147** (4), 559-608.
- Zenk M. H., Deus B. (1982) : Natural product synthesis by plant cell culture. In: Plant tissue culture. Fujiwara (Ed.), *Proc. 5th Int. Congr. Plant Tissue Cell Cult.*, 11-16 July. *Maru Tokyo*, 395-396.
- Zhao Y., Kung S. D., Dube S. K. (1990) : Nucleotide sequence of rice 4-coumarate : CoA ligase gene 4-CL.1. *Nucleic Acids Res.*, **18** (20), 6144.
- Zhong J. J., Bai Y., Wang S. J. (1996) : Effects of plant growth regulators on cell growth and ginsenoside saponin production by suspension cultures of *Panax quinquefolium*. *J. Biotechnol.*, **45**, 227-234.
- Zhong J. J., Xu G. R., Yoshida T. (1994) : Effects of initial sucrose concentration on excretion of anthocyanin pigments in suspended cultures of *Perilla frutescens* cells. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **10**, 590-592.
- Zhou Y., Hirotani M., Rui H., Furuya T. (1995) : Two triglycosidic triterpene astragalosides from hairy root cultures of *Astragalus membranaceus*. *Phytochem.*, **38** (6), 1407-1410.
- Zobel A. M., Brown S. A. (1988) : Determination of furanocoumarins on the leaf surface of *Ruta graveolens* with an improved extraction technique. *J. Nat. Prod.*, **51**, 941-946.
- Zobel A. M., Brown S. A. (1990) : Seasonal changes of furanocoumarin concentrations in leaves of *Heracleum lanatum*. *J. Chem. Ecol.*, **16** (5), 1623-1634.
- Zobel A. M., Brown S. A. (1991a) : Furanocoumarin concentrations in fruits and seeds of *Angelica archangelica*. *Environ. Exp. Bot.*, **31** (4), 447-452.
- Zobel A. M., Brown S. A. (1993) : Furanocoumarins on the surface of callus cultures from species of the *Rutacea* and *Umbelliferae*. *Can. J. Bot.*, **71**, 966-969.
- Zrýd J. P. (1988) : Culture *in vitro* et production de métabolites secondaires. In: Cultures de cellules, tissus et organes végétaux, fondements théoriques et utilisations pratiques. Zrýd J. P. (Ed.), *Presses Polytechniques Romandes, Lausanne*, 227-234.
- Zumwalt J. G., Neal J. J. (1993) : Cytochromes P450 from *Papilio polyxenes* : Adaptations to host plant allelochemicals. *Comp. Biochem. Physiol.*, **106C** (1), 111-118.

ANNEXES

ANNEXE 1

	White (mg/l)	Heller (mg/l)	Nitsch (mg/l)	MS (mg/l)	B 5 (mg/l)	Z (mg/l)
Macroéléments						
NH ₄ NO ₃			720	1650		1800
KNO ₃	80		950	1900	2527,5	2000
CaCl ₂ , 2H ₂ O		75		440	150	300
MgSO ₄ , 7H ₂ O	750	250	185	370	246,5	300
KH ₂ PO ₄			68	170		200
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	300					
NaNO ₃		600				
NaH ₂ PO ₂ , H ₂ O	19	125			150	
Na ₂ SO ₄	200					
KCl	65	750				
CaCl ₂			166			
(NH ₄) ₂ SO ₄					134	

Microéléments						
KI	0,75	0,01		0,83	0,75	0,83
H ₃ BO ₃	1,5	1	10	6,2	3	10
MnSO ₄ , H ₂ O					10	
MnSO ₄ , 4H ₂ O	5	0,1	25	22,3		20
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	3	1	10	8,6	2	6,16
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O			0,25	0,25	0,25	0,25
MoO ₃	0,001					
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,01	0,03	0,025	0,025	0,025	0,025
AlCl ₃		0,03				
NiCl ₂ , 6H ₂ O		0,03				
CoCl ₂ , 6H ₂ O				0,025	0,025	0,025

Fer						
FeCl ₃ , 6H ₂ O		1				
Fe ₂ (SO ₄) ₃	2,5					
FeSO ₄ , 7H ₂ O			27,8	27,8		27,8
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O			37,3	37,3		37,3
Sequestrene 330 Fe					28	

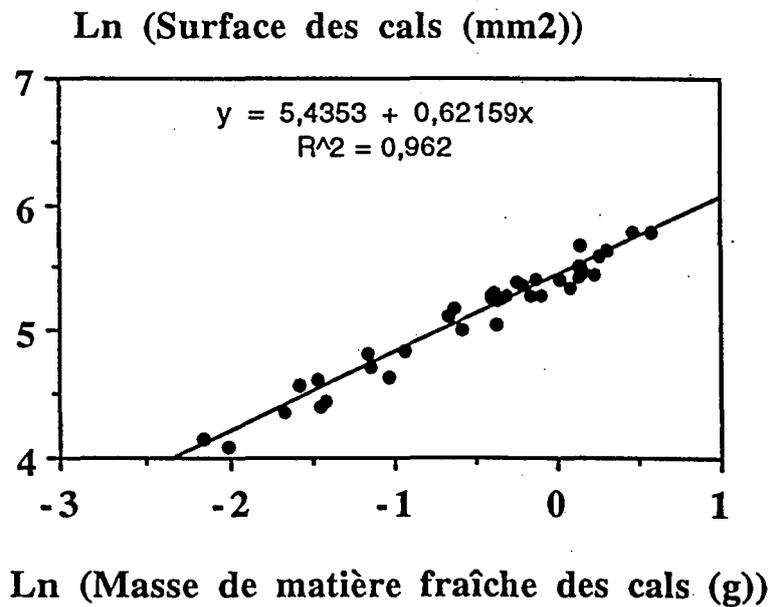
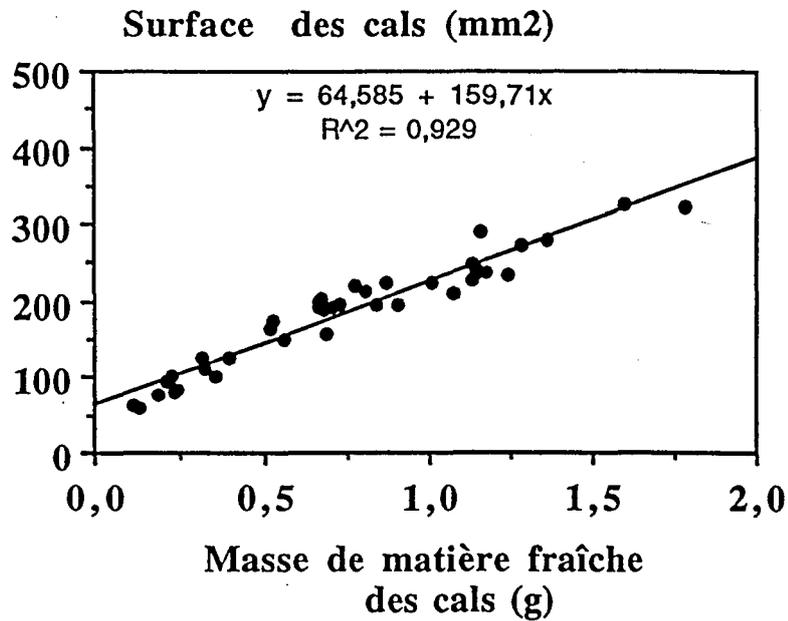
Vitamines						
Inositol			100	100	100	100
Ac. Nicotinique	0,05		5	0,5	1	1,5
Pyridoxine HCl	0,01		0,5	0,5	1	0,3
Thiamine HCl	0,01	1	0,5	0,1	10	0,8
Glycine	3		2	2		
Ac. Folique			0,5			
Biotine			0,05			
Hyd. Caseine						500

Sucres						
Saccharose	20 000	20 000	20 000	30 000	30 000	20 000
Mannitol						2 000

pH	6,5	6,5	6,5	5,8	5,8	5,8
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

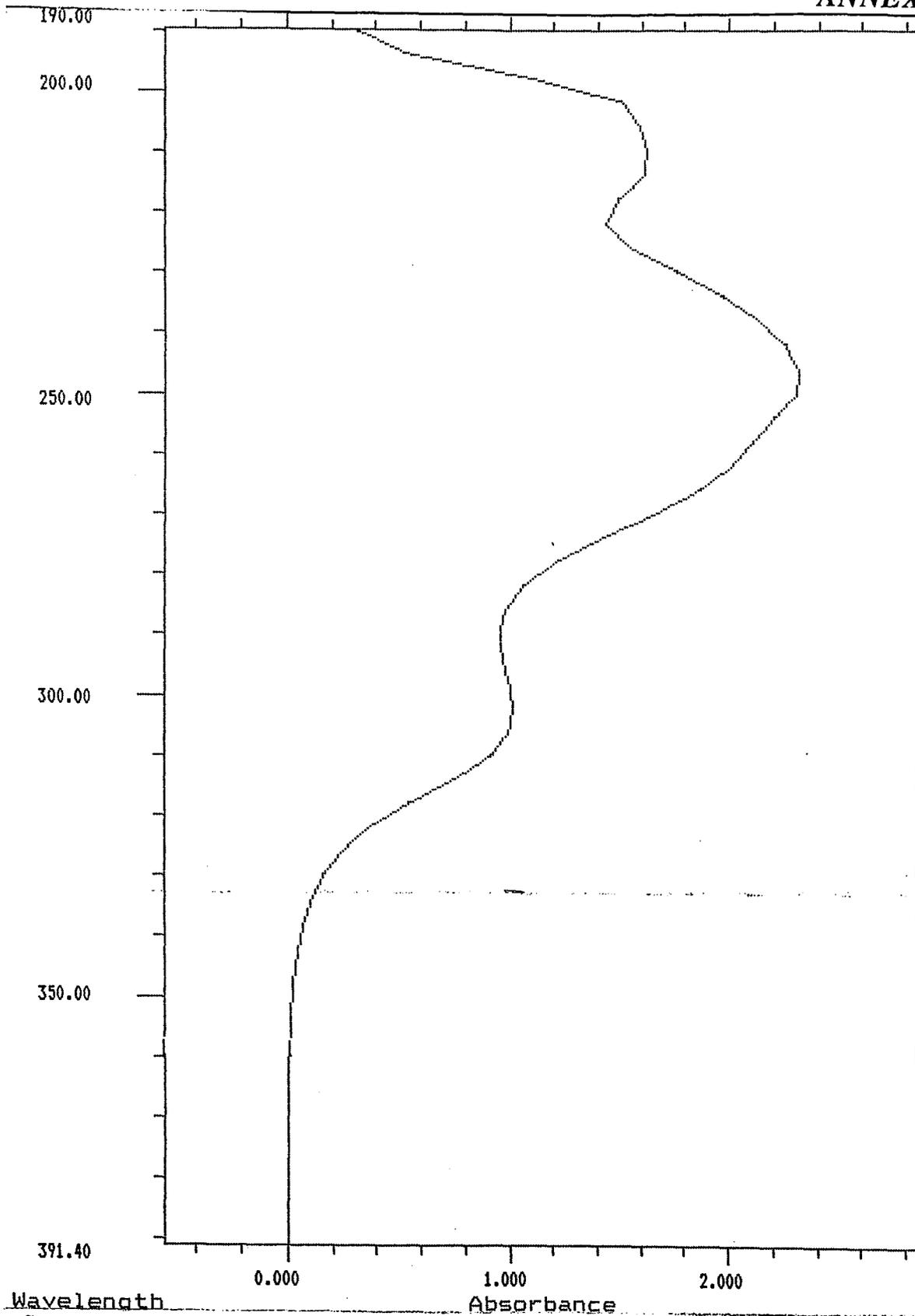
Composition de quelques milieux de culture utilisés pour la culture de cals.

ANNEXE 2



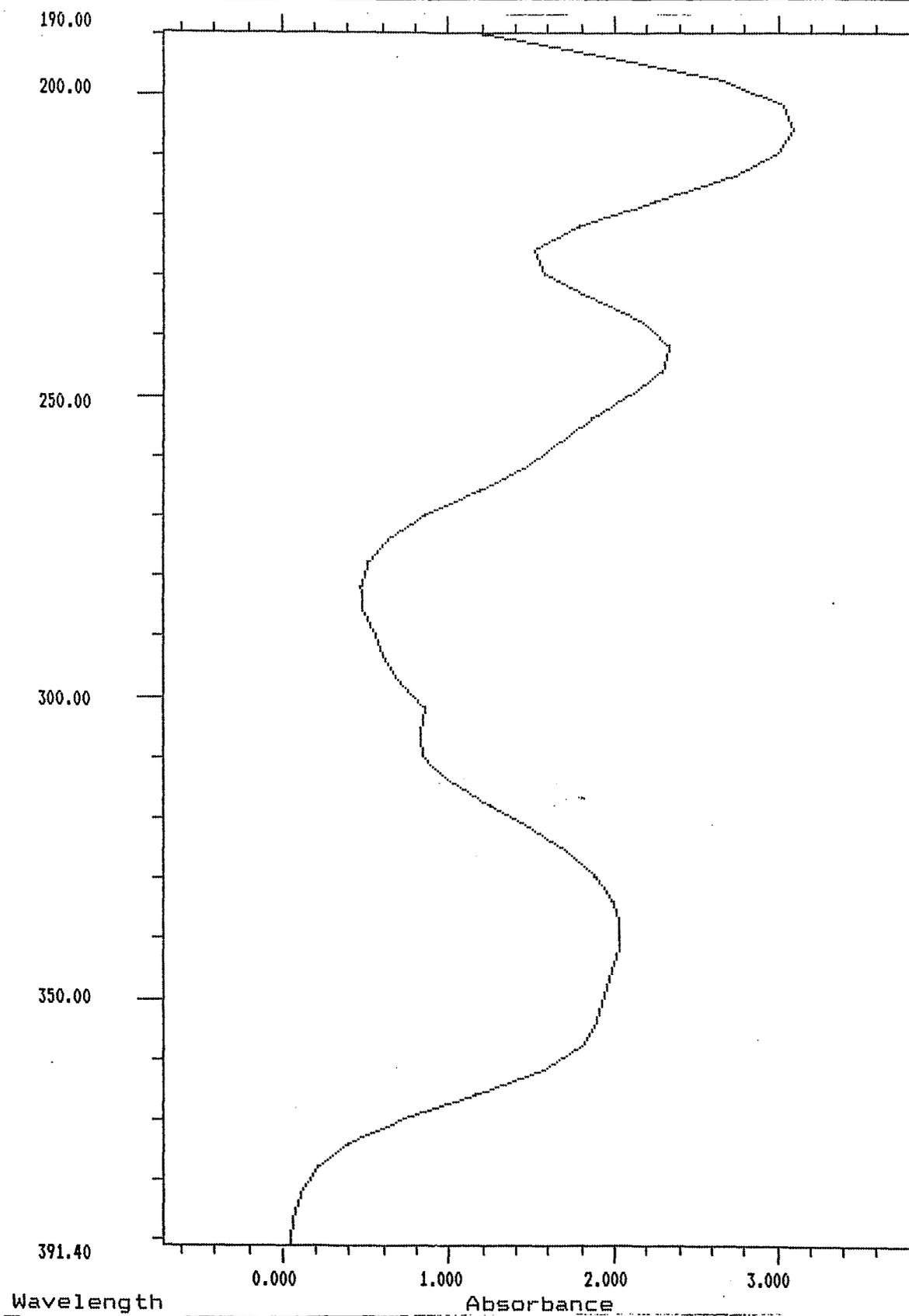
Corrélations linéaires entre la surface mesurée par un intégrateur de surface et la matière fraîche des calcs de *Psoralea* d'une part (a), et entre le logarithme népérien de ces deux variables d'autre part (b).

ANNEXE 3



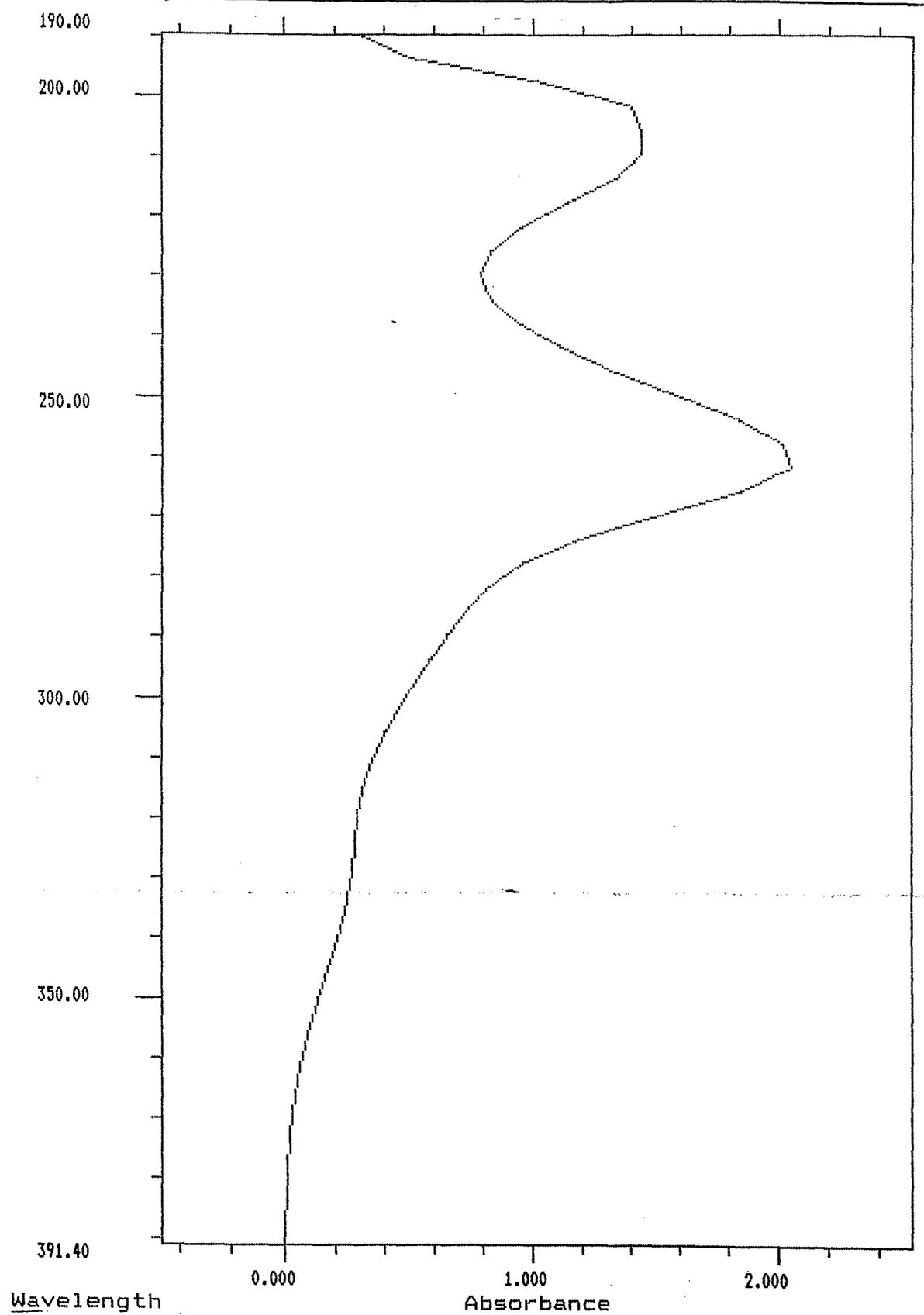
Wavelength Absorbance
Spectre UV entre 190 et 390 nm de la daidzéine. Le composé est dilué dans l'éthanol pur.

ANNEXE 4



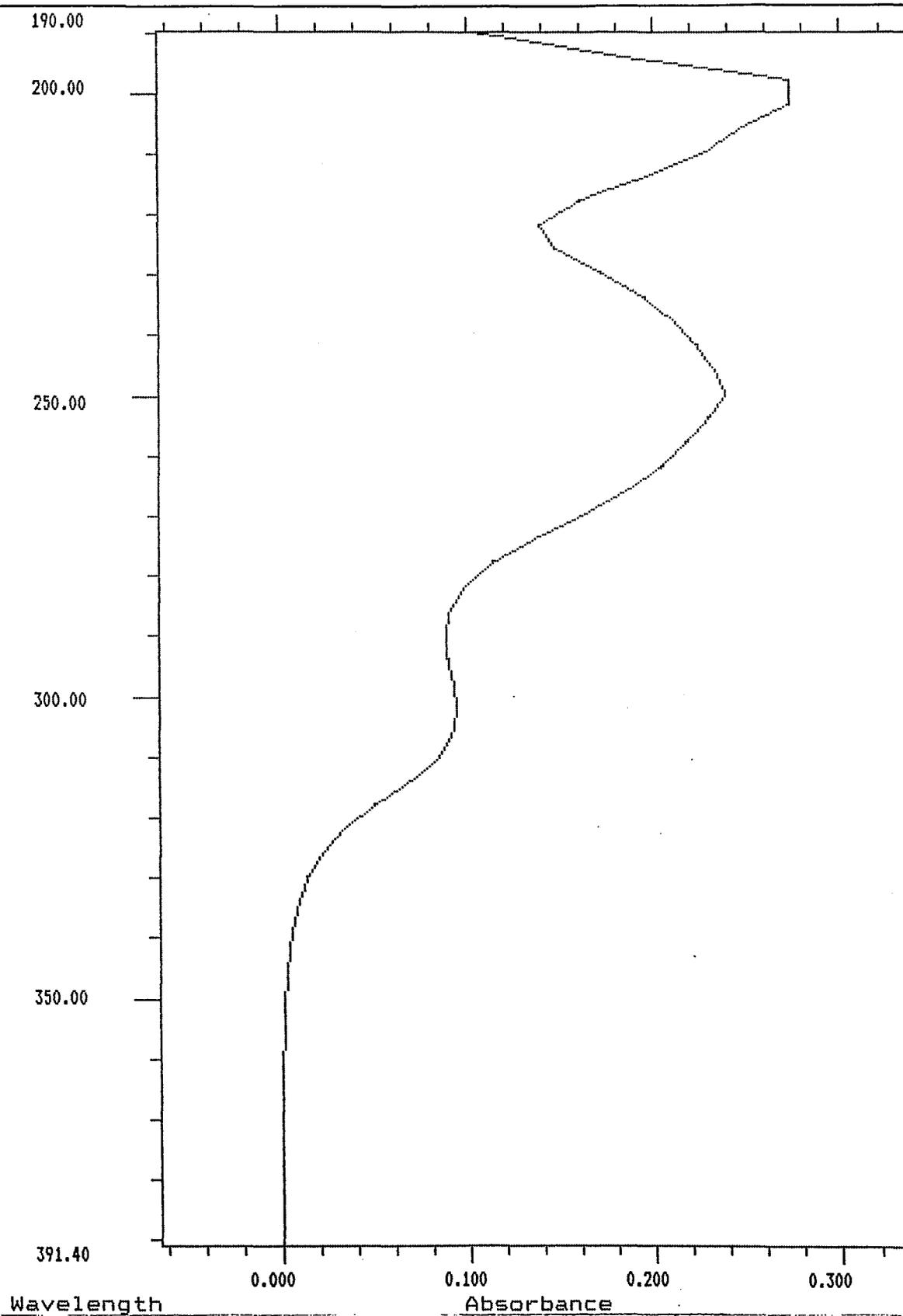
Spectre UV entre 190 et 390 nm du coumestrol. Le composé est dilué dans l'éthanol pur.

ANNEXE 5



Spectre UV entre 190 et 390 nm de la génistéine. Le composé est dilué dans l'éthanol pur.

ANNEXE 6



Spectre UV entre 190 et 390 nm de la formononétine. Le composé est dilué dans l'éthanol pur.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

Résumé	4
Abstract	5
Glossaire	6
INTRODUCTION GENERALE	7
ELEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES	10
1. LES PSORALÉES	10
1.1. Éléments de botanique	11
1.2. Ecophysiologie	12
1.3. Teneurs en métabolites secondaires	12
2. LES METABOLITES SECONDAIRES	15
2.1. Les furocoumarines	15
2.1.1. Historique	15
2.1.2. Nature chimique des furocoumarines	15
2.1.3. Propriétés des furocoumarines	16
2.1.3.1. Rôle écophysiologique des furocoumarines	16
2.1.3.2. Propriétés pharmacologiques des furocoumarines	18
2.1.3.2.1. Photoaddition	18
2.1.3.2.2. Activation de la mélanogenèse	19
2.1.3.3.3. Action mélatonino-mimétique	19
2.1.3.3.4. Régulation de l'ouverture des canaux potassiques	20
2.1.3.3.5. Autres applications thérapeutiques des psoralènes	20
2.1.3.3.6. Effets secondaires et toxicité des furocoumarines	20
2.1.4. Ressources en psoralènes	21
2.1.5. Biosynthèse des furocoumarines	22
2.2. Les isoflavonoïdes	23
2.2.1. Historique	23
2.2.2. Nature chimique des isoflavonoïdes	23
2.2.3. Propriétés des isoflavonoïdes	24
2.2.3.1. Rôle écophysiologique des isoflavonoïdes	24
2.2.3.2. Propriétés pharmacologiques des isoflavonoïdes	26
2.2.3.2.1. Activité antioxydante des isoflavonoïdes	26

2.2.3.2.2. Inhibitions enzymatiques par les isoflavonoides	26
2.2.3.2.3. Activité oestrogénique des isoflavonoides	27
2.2.3.3. Applications thérapeutiques des propriétés biologiques des isoflavonoides	28
2.2.4. Répartition des isoflavonoides dans le règne végétal	29
2.2.5. Biosynthèse des isoflavonoides	31
2.2.5.1. Voie métabolique	31
2.2.5.2. Régulation enzymatique de la voie de biosynthèse des phénylpropanoides	32
3- CULTURES <i>IN VITRO</i>	36
3.1. Cultures de cals	36
3.1.1. Obtention d'une lignée de cals	36
3.1.2. Production de métabolites secondaires	38
3.2. Les racines transformées	45
3.2.1. Mécanismes de la transformation par <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	45
3.2.2. Utilisation des racines transformées pour la production de métabolites secondaires	46
3.2.3. La transformation d'espèces de Psoralées par <i>Agrobacterium</i>	49

CHAPITRE 1 :

Identification et quantification des métabolites secondaires synthétisés par les cultures in vitro. Comparaison avec la plante entière.

INTRODUCTION	51
1. MATERIELS ET METHODES	51
1.1. Travail en conditions d'asepsie	51
1.2. Matériel végétal	51
1.2.1. Les racines transformées	51
1.2.1.1. Etablissement d'un soucier	51
1.2.1.1.1. Obtention du soucier	51
1.2.1.1.2. Entretien du soucier	52
1.2.1.1.3. Culture en milieu liquide	52
1.2.1.2. Expérimentations : obtention d'un soucier de racines photosynthétiques	52
1.2.1.2.1. Entretien du soucier	52
1.2.1.2.2. Culture en milieu liquide	52
1.2.1.3. Analyse des échantillons	53
1.2.1.3.1. Analyse du matériel végétal	53
1.2.1.3.1.1. Détermination de la biomasse	53

1.2.1.3.1.2. Extraction des métabolites secondaires	53
1.2.1.3.2. Analyse des milieux de culture	53
1.2.2. Les cals	54
1.2.2.1. Etablissement du soucier	54
1.2.2.1.1. Obtention du soucier	54
1.2.2.1.2. Entretien du soucier	54
1.2.2.2. Expérimentations: addition de <i>p</i> -coumarate	55
1.2.2.3. Analyse des échantillons	55
1.2.2.3.1. Analyse du matériel végétal	55
1.2.2.3.1.1. Détermination de la biomasse	55
1.2.2.3.1.2. Extraction des métabolites secondaires	55
1.2.2.3.2. Analyse des milieux de culture	56
1.2.3. La plante entière	56
1.2.3.1. Matériel végétal	56
1.2.3.2. Analyse des échantillons	56
1.2.3.2.1. Récolte et échantillonnage	56
1.2.3.2.2. Détermination de la biomasse	57
1.2.3.2.3. Extraction des métabolites secondaires	57
1.3. Technique d'analyse	57
1.3.1. Analyse des métabolites secondaires par CLHP	57
1.3.2. Quantification des métabolites secondaires	58
1.4. Identification des molécules	58
2. RESULTATS	59
2.1. Analyse du soucier de racines transformées	59
2.1.1. Biomasse des racines transformées cultivées en milieu liquide	59
2.1.2. Etude de la production de métabolites secondaires	59
2.1.2.1. Détermination de la nature des métabolites secondaires produits	60
2.1.2.2. Quantification des métabolites secondaires dans la biomasse racinaire sèche	60
2.1.2.3. Quantification des métabolites secondaires dans le milieu de culture	61
2.2. Analyse du soucier de cals	62
2.2.1. Etude de la croissance des cals issus de <i>Psoralea cinerea</i>	62
2.2.1.1. Stabilisation du soucier	62
2.2.1.2. Croissance des souches de cals issus de <i>P. cinerea</i>	63
2.2.2. Etude de la production de métabolites secondaires par des cals issus de <i>P. cinerea</i>	63
2.2.2.1. Teneurs en daidzéine dans la matière sèche	63
2.2.2.2. Teneurs en daidzéine dans les milieux de culture	64
2.2.2.3. Teneurs en coumestrol	65
2.3. Analyse de la plante entière	65
2.3.1. Production de biomasse	66
2.3.2. Teneurs en métabolites secondaires	66
2.3.3. Localisation des métabolites	67
2.3.3.1. Localisation de la daidzéine	67
2.3.3.2. Localisation du psoralène	67

2.4. Tentative de rétablissement de la synthèse de psoralène dans les cultures <i>in vitro</i> de <i>Psoralea cinerea</i>	69
2.4.1. Rétablissement de la synthèse de furocoumarines par les cultures de cals	70
2.4.1.1. Effet de l'addition de <i>p</i> -coumarate sur la croissance des 7 souches de cals de <i>Psoralea cinerea</i>	71
2.4.1.2. Effet de l'addition de <i>p</i> -coumarate sur la production de métabolites secondaires par 7 souches de cals de <i>Psoralea cinerea</i>	71
2.4.1.2.1. Analyse de la matière sèche	71
2.4.1.2.2. Analyse des milieux de culture	72
2.4.2. Rétablissement de la synthèse de furocoumarines par des cultures de racines transformées chlorophylliennes	73
2.4.2.1. Biomasse des racines transformées cultivées à la lumière	73
2.4.2.2. Analyse de la production de métabolites secondaires identifiés dans les racines transformées « vertes »	74
2.4.2.2.1. Analyse de la matière sèche	74
2.4.2.2.2. Analyse des milieux de culture	75
3. DISCUSSION	76
3.1. Notion de stabilité génétique du matériel végétal <i>in vitro</i>	76
3.2. Production de biomasse	77
3.3. Production de métabolites secondaires	78
3.3.1. Production d'isoflavonoïdes	78
3.3.2. Production de furocoumarines	81
CONCLUSION	83
CHAPITRE 2 :	
<i>Etude de la production d'isoflavonoïdes par des cultures de cals de Psoralées</i>	
INTRODUCTION	85
1. MATERIEL ET METHODES	85
1.1. Etablissement d'un soucier de cals issu de cinq espèces de Psoralées	86
1.1.1. Obtention du soucier	86
1.1.1.1. Matériel végétal	
1.1.1.1.1. Les plantes	86
1.1.1.1.2. Obtention d'explants stériles	86
1.1.1.2. Culture en conditions stériles	86
1.1.1.2.1. Préparation des milieux	86
	190

1.1.1.2.2. Conditions de culture	86
1.1.1.3. Appréciation de la callogenèse	87
1.1.2. Entretien du soucier	87
1.2. Expérimentations	87
1.2.1. Influence de la durée de culture	87
1.2.1.1. Matériel végétal	87
1.2.1.2. Conditions de culture	88
1.2.2. Influence de la composition du milieu de culture	88
1.2.2.1. Influence de la concentration en 2,4.D.	88
1.2.2.2. Influence d'un éliciteur	88
1.2.2.3. Influence de la nutrition azotée	89
1.3. Analyse des échantillons	90
1.3.1. Analyse du matériel végétal	90
1.3.1.1. Détermination de la biomasse	90
1.3.1.2. Extraction des métabolites secondaires	90
1.3.2. Analyse des milieux de culture	90
1.4. Technique d'analyse et identification des métabolites	90
2. RESULTATS ET DISCUSSION	92
2.1. Etablissement d'un soucier de calcs de Psoralées	92
2.1.1. Etude de la callogenèse	92
2.1.1.1. Espèces <i>Psoralea obtusifolia</i> et <i>Psoralea tenax</i>	92
2.1.1.2. Espèces <i>P. bituminosa</i> , <i>P. lupinellus</i> et <i>P. macrostachya</i>	92
2.1.1.2.1. Etude du pourcentage de callogenèse	93
2.1.1.2.2. Détermination des balances hormonales optimales	94
2.1.2. Etude de la croissance du soucier de calcs de Psoralées	95
2.1.2.1. Stabilisation du soucier	95
2.1.2.2. Croissance des souches de calcs	96
2.1.3. Etude de la production de métabolites secondaires par les calcs de Psoralées	96
2.1.3.1. Teneurs en daidzéine dans la matière sèche	97
2.1.3.2. Teneurs en daidzéine dans les milieux de culture	98
2.1.3.3. Autres métabolites secondaires	98
2.2. Influence des paramètres de culture sur la production de métabolites secondaires par les calcs de Psoralées	100
2.2.1. Influence de la durée de culture	100
2.2.2. Influence de la composition du milieu de culture	101
2.2.2.1. Influence de l'addition d'éliciteurs et de la balance hormonale	101
2.2.2.1.1. Influence sur la production de biomasse	102
2.2.2.1.2. Influence sur la production de métabolites secondaires	103
2.2.2.2. Influence de la nutrition azotée et phosphatée sur la production de métabolites secondaires par des calcs de <i>Psoralea obtusifolia</i>	104
CONCLUSION	105

CHAPITRE 3

Production d'isoflavonoïdes par des cultures de racines transformées de Psoralées

INTRODUCTION	107
1- MATERIEL ET METHODES	107
1.1. Matériel végétal	107
1.2. Entretien de la souche RTLach5	107
1.3. Expérimentations	108
1.3.1. Culture en milieu liquide	108
1.3.2. Cinétique de production de la souche RTLach5	108
1.3.3. Etude de la production d'isoflavonoïdes par compartiment racinaire	108
1.3.4. Etude de l'influence de la composition du milieu sur la production d'isoflavonoïdes par la souche RTLach5	109
1.3.4.1. Culture de RTLach5 sur milieu Murashige et Skoog (1962)	109
1.3.4.2. Culture de RTLach5 sur milieu additionné de chitosane	109
1.3.4.2.1. Addition de chitosane au premier jour de culture	110
1.3.4.2.2. Addition du chitosane après 3 semaines de culture	110
1.3.4.2.3. Etablissement d'une cinétique d'excrétion des isoflavonoïdes par suivi de radioactivité	111
1.4. Analyse des échantillons	111
1.4.1. Analyse du matériel végétal	111
1.4.2. Analyse des milieux de culture	112
1.5. Technique d'analyse et identification des métabolites	112
2. RESULTATS ET DISCUSSION	113
2.1. Etude de la cinétique de croissance et de production d'isoflavonoïdes par la souche de racines transformées RTLach5	113
2.1.1. Etude de la croissance en milieu liquide B5	113
2.1.2. Etude de la production d'isoflavonoïdes	114
2.2. Relation entre morphologie racinaire et production d'isoflavonoïdes par la souche RTLach5	116
2.2.1. Etude de la morphologie racinaire de la souche de racines transformées RTLach5	116
2.2.1.1. Etude de l'élongation de la souche RTLach5 sur une période de 15 jours	116
2.2.1.2. Etude de la production de biomasse de la souche RTLach5 sur une période de 15 jours	119
2.2.2. Etude de la production des isoflavonoïdes par la souche RTLach5 pendant une période de 15 jours	120

2.2.2.1. Dosage des milieux de culture	120
2.2.2.2. Dosage de la matière sèche	120
2.3. Influence de la composition des milieux de culture sur la croissance et la production d'isoflavonoïdes par la souche RTLach5	124
2.3.1. Croissance et production d'isoflavonoïdes par RTLach5 cultivée en milieu M & S	124
2.3.1.1. Influence du milieu M & S sur la croissance de la souche RTLach5	124
2.3.1.2. Influence du milieu M & S sur la production d'isoflavonoïdes par la souche RTLach5	125
2.3.2. Croissance et production d'isoflavonoïdes par RTLach5 cultivé en présence de chitosane	127
2.3.2.1. Effet de l'addition de chitosane au temps T0 sur la production de biomasse et d'isoflavonoïdes par la souche RTLach5	127
2.3.2.1.1. Influence de l'addition de chitosane au temps T0 sur la croissance de la souche RTLach5	127
2.3.2.1.2. Influence de l'addition de chitosane au temps T0 sur la production d'isoflavonoïdes par la souche RTLach5	128
2.3.2.2. Effet de l'addition de chitosane sur la production de biomasse et d'isoflavonoïdes par une culture de RTLach5 âgée de 21 jours	132
2.3.2.2.1. Influence sur la croissance de la souche RTLach5	132
2.3.2.2.2. Influence sur la production d'isoflavonoïdes par la souche RTLach5	133
2.3.2.3. Cinétique d'excrétion des isoflavonoïdes dans le milieu de culture après traitement au chitosane	134
2.4. Réflexions sur la notion de stabilité des cultures de racines transformées	137
CONCLUSION GENERALE	143
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	153
ANNEXES	181

LISTE DES FIGURES**ELEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES**

Figure 1. Structure chimique des furocoumarines linéaires et angulaires les plus communes.	16
Figure 2. Schéma de biosynthèse conduisant à la formation du psoralène et de l'angélicine (modifié, d'après Brown, 1979).	22
Figure 3. Structure chimique des isoflavonoïdes et flavonoïdes les plus simples.	23
Figure 4. Principales classes d'isoflavonoïdes et liens biosynthétiques directs et indirects (modifié d'après Dewick, 1988).	24
Figure 5. Schéma de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.	31
Figure 6. Biosynthèse chimique des isoflavones.	35

CHAPITRE 1

Figure 7. Biomasse racinaire récoltée à l'issue de 4 semaines de culture sur milieu B5 liquide	59
Figure 8. Teneurs en daïdzéine et coumestrol dans la biomasse racinaire sèche.	60
Figure 9. Evolution de la biomasse fraîche de deux souches de cals de <i>P. cinerea</i> durant 3 repiquages.	62
Figure 10. Comparaison des temps de doublement pour des cals de <i>P. cinerea</i> issus de feuilles, de tiges ou de cotylédons.	63
Figure 11. Evolution de la biomasse fraîche de <i>Psoralea cinerea</i> à 5 stades de récolte.	66
Figure 12. Répartition de la daïdzéine en pourcentage dans 6 compartiments de la plante entière à 5 stades de récolte différents	67
Figure 13. Répartition du psoralène en pourcentage dans 6 compartiments de la plante entière à 5 stades de récolte différents	67
Figure 14. Schéma simplifié des voies de biosynthèse conduisant aux furocoumarines et aux isoflavonoïdes.	70
Figure 15. Teneurs en daïdzéine, coumestrol et génistéine de 7 souches de cals issues de feuilles, de tiges et de cotylédons de <i>Psoralea cinerea</i> et cultivées sur milieu Z (Cierna <i>et al.</i> , 1991) additionné de 0 ; 0,1 ou 0,2 μM de <i>p</i> -coumarate.	71
Figure 16. Structure chimique comparée de la daïdzéine et de la génistéine.	72

Figure 17. Biomasse racinaire récoltée à l'issue de 4 semaines de culture en milieu B5 liquide à la lumière.	73
Figure 18a. Teneurs en daidzéine dans la biomasse sèche des racines vertes.	74
Figure 18b. Teneurs en coumestrol dans la biomasse sèche des racines vertes.	74

CHAPITRE 2

Figure 19. Influence des concentrations en kinétine et en 2,4.D. sur le pourcentage de callogenèse de <i>Psoralea bituminosa</i> , <i>Psoralea macrostachya</i> et <i>Psoralea lupinellus</i> .	93
Figure 20. Evolution du pourcentage de souches de cals stabilisées. Cette courbe est réalisée avec un échantillon de 147 lignées établies à partir d'explants de six espèces de Psoralées.	96
Figure 21. Comparaison des temps de doublement pour des lignées de cals issues de feuilles de <i>Psoralea obtusifolia</i> , <i>Psoralea bituminosa</i> , <i>Psoralea macrostachya</i> , <i>Psoralea lupinellus</i> et <i>Psoralea tenax</i> .	96
Figure 22. Fréquence de distribution des lignées de cals issus de 5 espèces de Psoralées par classe de concentration en daidzéine.	98
Figure 23. Production d'isoflavonoïdes dans la matière sèche de cals de Psoralées cultivés pendant 60 jours.	100
Figure 24. Cinétique de production de biomasse par 4 souches de cals issues de <i>Psoralea cinerea</i> cultivées sur 5 milieux Z modifiés.	102
Figure 25. Production d'isoflavonoïdes par 4 souches de cals issues de <i>Psoralea cinerea</i> cultivées sur un milieu témoin et 5 milieux modifiés.	103
Figure 26. Production d'isoflavonoïdes par des souches de cals issues de <i>Psoralea obtusifolia</i> cultivées sur un milieu témoin et 3 milieux modifiés.	104

CHAPITRE 3

Figure 27. Cinétique de croissance de la souche RTLach5 cultivée sur milieu liquide B5	113
Figure 28. Cinétique de production d'isoflavonoïdes par la souche RTLach5 cultivée sur milieu liquide B5.	114
Figure 29. Elongation d'une racine de la souche RTLach5 cultivée sur milieu liquide B5	116
Figure 30. Elongation d'une racine principale de la souche RTLach5 cultivée sur milieu liquide B5	117

Figure 31. Elongation moyenne d'une racine d'ordre 2 de la souche RTLach5 cultivée sur milieu liquide B5	117
Figure 32. Evolution du nombre de ramifications d'ordre 2 sur les racines de la souche RTLach5 cultivées en milieu liquide B5.	118
Figure 33. Evolution du nombre de ramifications d'ordre 2 sur les racines de la souche RTLach5 représentée en fonction de la longueur de la racine principale.	118
Figure 34. Cinétique de croissance d'une racine de la souche RTLach5 cultivée sur milieu liquide B5	118
Figure 35. Evolution de la longueur totale d'une racine de la souche RTLach5 en fonction de sa biomasse sèche.	118
Figure 36. Répartition de la biomasse entre la racine principale (RP) et la racine d'ordre 2 (RS) pour une racine de la souche RTLach5 cultivée sur milieu liquide B5.	120
Figure 37. Evolution de la concentration en isoflavonoïdes dans la matière sèche de la racine de la souche RTLach5 cultivée sur milieu liquide B5.	120
Figure 38a. Cinétique de production des isoflavonoïdes par la racine principale de la souche RTLach5 cultivée sur milieu liquide B5.	121
Figure 38b. Cinétique de production des isoflavonoïdes par un apex de la souche RTLach5 cultivée sur milieu liquide B5.	121
Figure 39a. Cinétique de production de la daïdzéine par la racine principale et l'apex d'une racine de la souche RTLach5 cultivée sur milieu liquide B5.	122
Figure 39b. Cinétique de production de coumestrol par la racine principale et l'apex d'une racine de la souche RTLach5 cultivée sur milieu liquide B5.	122
Figure 40. Cinétique de croissance de la souche RTLach5 cultivée sur milieu liquide B5 (Témoin) ou Murashige et Skoog (M & S).	124
Figure 41. Production d'isoflavonoïdes par les racines de la souche RTLach5 cultivées sur milieu B5 (Témoin) ou Murashige et Skog (M & S).	125
Figure 42. Cinétique de croissance de la souche RTLach5 cultivée sur milieu B5 liquide (Témoin) ou B5 additionné de chitosane à une concentration de 30 mg.l ⁻¹ (Chitosane).	127
Figure 43. Production d'isoflavonoïdes par les racines de la souche RTLach5 cultivées sur milieu B5 (Témoin) ou B5 additionné de chitosane à une concentration de 30 mg.l ⁻¹ (Chitosane).	128
Figure 44. Cinétique de croissance de la souche RTLach5 cultivée durant 21 jours sur milieu B5, puis sur milieu B5 (Témoin) ou B5 additionné de chitosane à une concentration de 30 mg.l ⁻¹ (Chitosane) durant une semaine.	132
Figure 45. Production d'isoflavonoïdes par les racines de la souche RTLach5 cultivée durant 21 jours sur milieu B5, puis sur milieu B5 (Témoin) ou B5 additionné de chitosane à une concentration de 30 mg.l ⁻¹ (Chitosane) durant une semaine.	133
Figure 46. Cinétique d'excrétion des isoflavonoïdes dans le milieu de culture par les racines de la souche RTLach5 cultivées sur milieu B5 (Témoin) ou sur milieu B5 additionné de chitosane à une concentration de 30 mg.l ⁻¹ (Chitosane).	134

LISTE DES TABLEAUX

ELEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES

Tableau 1. Teneurs en psoralène et angélicine exprimés en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de matière sèche de graine (d'après Innocenti <i>et al.</i> , 1984).	11
Tableau 2. Teneurs en psoralène et angélicine exprimés en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de matière fraîche de feuilles, tiges et racines de 4 espèces de Psoralées (d'après Innocenti <i>et al.</i> , 1991).	13
Tableau 3. Teneurs en angélicine et psoralène ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de matière sèche) de différents organes de <i>Psoralea cinerea</i> cultivés en serre ou en phytotron suivant les différents traitements. Les plantes témoins correspondent à une culture sans inoculation de <i>Bradyrhizobium</i> , ni fertilisation azotée. (D'après Bourgaud <i>et al.</i> , 1990 ; 1992).	14
Tableau 4. Quelques facteurs externes intervenant sur la régulation de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes référencés dans la littérature.	33
Tableau 5. Molécules synthétisées par des cultures de cals, sous l'action d'éliciteurs. Cette liste n'est pas exhaustive.	44
Tableau 6. Aperçu bibliographique des métabolites secondaires identifiés dans des racines transformées de diverses familles de plantes.	48

CHAPITRE 1

Tableau 7. Distribution (%) des lignées de cals issus de deux types d'explants de <i>P. cinerea</i> , classées par classe de concentration en daidzéine.	64
Tableau 8. Teneurs moyennes en daidzéine et psoralène dans la plante entière à 5 stades de récolte. Les valeurs indiquées sont des moyennes établies pour 5 plantes sans distinction d'organes.	66

CHAPITRE 2

Tableau 9. Distribution des lignées de cals de 5 espèces de Psoralées par classe de concentration en daidzéine (OBT : <i>P. obtusifolia</i> ; MAC : <i>P. macrostachya</i> ; TEN : <i>P. tenax</i> ; BIT : <i>P. bituminosa</i> ; CIN. F, CIN. T et CIN. C : Feuilles, Tiges et Cotylédons de <i>P. cinerea</i> , respectivement).	97
Tableau 10. Teneurs en coumestrol dans les souches de cals issus de <i>Psoralea tenax</i> .	99

CHAPITRE 3

Tableau 11. Quantités de daidzéine et de coumestrol récoltées dans la matière sèche après culture de la souche RTLach5 durant 15 jours. Les chiffres représentent des μg de produit par fiole Erlenmeyer. Les écarts types sont calculés pour 3 fioles. 123

LISTE DES PHOTOGRAPHIES

CHAPITRE 2

Photos 1 . Culture en serre des espèces de Psoralées d'où sont issus les cals étudiés
a: *P. bituminosa* ; b: *P. macrostachya* ; c: *P. lupinellus* ; d: *P. tenax* ;
e: *P. obtusifolia*. 86

Photos 2 . Nuances de la couleur pour des cals cultivés à la lumière
2a: cal vert ; 2b: cal vert/brun ; 2c: cal brun/vert ; 2d: cal noir. 87

CHAPITRE 3

Photo 3 . Aspect morphologie de la souche RTLach5 cultivée sur milieu B5 solide
(Gamborg *et al.*, 1968), à l'obscurité. 108

LISTE DES ABREVIATIONS

- 2,4.D. : Acide 2,4 Dichlorophénoxyacétique
4CL : 4- coumarate CoA Ligase
A.D.N. : Acide Desoxyribonucléique
A.I.A. : Acide Indole Acétique
A.I.B. : Acide Indole Butyrique
A.N.A. : Acide Naphtalène Acétique
BA. : Benzyle Adénine
BAP : 6-Benzyle Amino Purine
CA4OH : cinnamate 4-hydroxylase
CHI : Chalcone isomérase
CHR : Chalcone réductase
CHS : Chalcone synthase
C. I. : Ionisation Chimique
C.L.H.P : Chromatographie Liquide à Hautes Performances
COMT : Acide caféique-O-méthyltransférase
E.D.T.A. : Ethylène Diamine Tétra Acétique
E. I. : Impact Electronique
F5H : férulate 5-hydroxylase
IFR : isoflavone réductase
IFS : isoflavone synthase
M : mole/litre
Milieu B5 : Milieu de culture de Gamborg *et al.* (1968)
MF : Matière Fraîche
MS : Matière Sèche
MS-MS : Double Spectrométrie de Masse
M & S : Milieu de Murashige et Skoog (1962)
Milieu Z : Milieu de culture de Cierna *et al.* (1991)
P.A.L. : Phénylalanine Ammonia Lyase
PCR : Polymerase Chain Reaction
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
U.V. : Ultra-Violet

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE**

000

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Madame MARC Annie, Directeur de Recherches CNRS, ENSIC/INPL,
Madame SANGWAN Brigitte, Professeur, Faculté des Sciences d'Amiens,
Madame KALLERHOFF, HDR, INP Toulouse.**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Mademoiselle BOUQUE Virginie

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

"Etude de la production de métabolites secondaires par des cultures *in vitro* de psoralées (*Léguminosae*)"

en vue de l'obtention du titre de :

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE**

Spécialité : **"SCIENCES AGRONOMIQUES"**

Fait à Vandoeuvre le, 6 Mars 1997

Le Président de l'I.N.P.L.,


J. HARDY



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F. - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

TEL. 33/83.59.59.59
FAX. 33/83.59.59.55

Résumé

Les furocoumarines linéaires sont des molécules photosensibilisantes qui présentent une réelle importance économique de par leur utilisation en pharmacologie. Le coût de la synthèse chimique de ces composés conduit à envisager un approvisionnement à partir de ressources végétales. Dans cette optique, des études ont été engagées sur la possibilité d'utiliser des cultures *in vitro* de plantes du genre *Psoralea*.

Un soucier de 131 cals provenant de *Psoralea cinerea* ainsi que des cultures de racines issues de la transformation de huit espèces de Psoralées par *Agrobacterium rhizogenes* ont été initiées (Nguyen, 1992), et analysées par CLHP. Aucune trace de furocoumarine n'a pu être détectée. En revanche, nous avons pu mettre en évidence la présence de daidzéine et de coumestrol dans ces deux types de cultures *in vitro*. Une analyse de la plante entière de *Psoralea cinerea*, révèle un profil métabolique très différent de celui des cultures *in vitro* : les teneurs en furocoumarine sont importantes et localisées préférentiellement dans les parties aériennes, alors que la daidzéine est localisée en quantité plus faible au niveau des racines. Les isoflavonoïdes et les furocoumarines ayant des voies biosynthétiques en partie commune, l'hypothèse d'une altération de la régulation enzymatique a été émise. Plusieurs traitements ont été testés pour tenter de rétablir de façon simple la synthèse des furocoumarines, sans toutefois y parvenir.

Devant l'intérêt présenté par la daidzéine (applications thérapeutiques dans la prévention des cancers hormonaux-dépendants), nous nous sommes attachés à améliorer la production de ce métabolite par les cultures *in vitro*. L'élargissement du soucier de cals à d'autres espèces de Psoralées, ainsi que des modifications des paramètres et de la composition des milieux de culture ont été envisagés. Il s'avère qu'aucun des traitements éliciteurs testés ne permet d'améliorer la production des isoflavonoïdes recherchés. En revanche, la variabilité génétique exprimée par les cals provenant des diverses espèces mise en culture permet de mettre en évidence des souches hyperproductives. En ce qui concerne les racines transformées, une étude approfondie de la souche RTLach5 permet de montrer que la production des isoflavonoïdes est fortement corrélée à la production de biomasse, ainsi qu'à l'âge de l'explant analysé.

Deux objectifs sont désormais envisageables : déterminer les conditions de culture qui permettront d'optimiser la production des isoflavonoïdes détectés, et procéder à une étude approfondie de la voie biosynthétique des furocoumarines chez les Psoralées en vue de comprendre l'origine des profils métaboliques différents chez la plante entière et les cultures *in vitro*, et de rétablir éventuellement la synthèse des furocoumarines par les cultures de cals et de racines transformées.

Mots-clés : *Psoralea*, furocoumarine, isoflavonoïde, daidzéine, cal, racine transformée, métabolisme secondaire