AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Faculté des Sciences - Ecole doctorale S.E.S.A.M.E.S

Thèse de Doctorat

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Lorraine

Mention: Phytochimie

Par

Sahar SALIBA

Nouvelles approches biotechnologiques pour l'obtention d'alcaloïdes : culture *in vitro* de *Leucojum aestivum* L. et isolement d'endophytes bactériens d'Amaryllidaceae

New biotechnological approaches for the production of alkaloids: Leucojum aestivum L. in vitro culture and identification of bacterial endophytes of Amaryllidaceae plants

Soutenue le 09 Juillet 2015, devant le jury composé de:

Rapporteurs :

Pr MITAINE-OFFER Anne-Claire, Université de Bourgogne

Dr BOU DAGHER-KHARRAT Magda, Université Saint Joseph de Beyrouth

Examinateurs :

Pr FORT Yves, Université de Lorraine

Dr HEHN Alain, Université de Lorraine

Directeurs de thèse :

Dr PTAK Agata, Université d'Agriculture de Cracovie

Pr LAURAIN-MATTAR Dominique, Université de Lorraine

Groupe MOBAT, UMR S.R.S.M.C. 7565 – C.N.R.S.
Faculté des Sciences et Techniques, Université de Lorraine
BP 239, F-54506 Vandoeuvre-lès-Nancy

الحركة تكون عمياء لا بركة فيها إن لم ترافقها المعرفة،

المعرفة تكون عميقة سقيمة إن لم يرافقها العمل،

العمل يكون باطلاً وبلا ثمر إن لم يقترن بالمحبة.

جبران خليل جبران

Toute énergie qui n'est pas savoir est aveugle,

Tout savoir est vain qui n'est pas action,

Et toute action est vide qui n'est pas amour.

Gebran Khalil Gebran

Remerciements

Dans les sciences, le chemin est
plus important que le but.
Erwin Chargaff

Ce manuscrit est le fruit de trois ans de travail, je tiens à remercier en quelques lignes tous ceux qui, de près ou de loin, y ont contribué:

J'exprime en premier lieu ma gratitude à Mme Dominique LAURAIN-MATTAR pour la confiance qu'elle a témoignée à mon égard en acceptant de diriger mes travaux de thèse. Je lui suis reconnaissante pour tous ses conseils, sa disponibilité et surtout d'avoir partagé les moments de déception et de joies qui alternent durant une thèse.

Je tiens à remercier également Mme Agata PTAK, co-directeur de cette thèse, pour son encadrement surtout durant mon séjour en Pologne. Merci d'avoir rendu cette expérience la plus agréable et formatrice possible.

Pour avoir financé une bonne partie de mes études, je remercie Mr. Paul ISSA, propriétaire et fondateur des laboratoires Saint Paul. J'aimerai également remercier l'UMR SRSMC 7565 dans son ensemble pour m'avoir accueillie et offert le cadre de travail nécessaire à la réalisation de cette thèse.

Je souhaite exprimer ici mes remerciements aux rapporteurs : Mme Anne-Claire MITAINE-OFFER et Mme Magda BOU DAGHER-KHARRAT, ainsi qu'aux membres du jury : Messieurs Yves FORT et Alain HEHN, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Merci pour le temps que vous y avez consacré malgré vos nombreuses charges.

J'adresse ma gratitude à tous ceux qui, au fil de ma thèse, ont apporté leur contribution scientifique voire leur secours, à savoir, messieurs Michel BOISBRUN et Alain HEHN, mesdames Séverine PIUTTI, Rosella SPINA, Françoise CHRETIEN et Brigitte FERNETTE. Pour avoir passé mes TRES nombreux échantillons en LCMS et pour leur soutien moral, un grand merci à François DUPIRE et Fabien LACHAUD.

Pour les nombreuses discussions, leur soutien, leur humour et le partage des peines quotidiennes, merci à Afra, Mylène et Frédéric.

Et gardant le meilleur pour la fin… J'adresse toute mon affection à ma famille. Sans vous je ne serai pas là. Malgré la distance, votre présence, vos conseils et votre amour m'ont permis d'avancer tous les jours. Je vous aime.

Et puis, une pensée pour toi Robin. Merci d'avoir fait de cette terre qui m'était étrangère, une deuxième maison. Ta présence dans ma vie m'enrichit chaque jour.

Avec la tristesse d'une d'étape qui se termine, je tourne une page et en ouvre une autre : Vivement la suite !

Liste des abréviations

ACC :	Acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique
Ach :	Acétylcholine
AchE :	Acétylcholinestérase
ANA :	Acide 1-naphtalène acétique
AS :	Acide salicylique
BAP :	6-benzylaminopurine
CCM :	Chromatographie sur couche mince
EI :	Electronic impact
ei:	Etalon interne
ESI :	Electrospray ionization
GC-MS :	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
LC-MS :	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LDD :	Limite de détection
LDQ :	Limite de quantification
MeJa :	Méthyljasmonate
Milieu MS :	Milieu Murashige & Skoog
MN:	4'-*O*-méthylnorbelladine
MS :	Matière sèche
MS30 :	Milieu Murashige & Skoog additionné de 30 g/L de saccharose

MS60 :	Milieu Murashige & Skoog additionné de 60 g/L de saccharose
RITA® :	Récipients à immersion temporaire
SPE :	Solid phase extraction
TOF :	Time of flight
2,4-D :	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

Table des Matières

Partie 1 : Propos Introductif 1

Introduction 3

Objectifs 7

Partie 2 : Synthèse Bibliographique 9

1 La famille des Amaryllidaceae 11

1.1 Distribution des plantes de la famille des Amaryllidaceae 11

1.2 Caractères botaniques de la famille des Amaryllidaceae 12

1.2.1 Appareil végétatif 12

1.2.2 Appareil reproducteur 13

1.3 Les principaux genres 14

1.3.1 Leucojum 14

1.3.2 *Galanthus* (perce-neige) 15

1.3.3 *Narcissus* (jonquille) 16

1.3.4 Pancratium 17

2 Les alcaloïdes d'Amaryllidaceae 18

2.1 Généralités sur les alcaloïdes 18

2.2 Rôle des alcaloïdes dans le métabolisme de la plante 19

2.3 Classification des alcaloïdes d'Amaryllidaceae 19

2.4 La voie de biosynthèse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae 20

2.4.1 Les alcaloïdes type galanthamine 22

2.4.2 Les alcaloïdes type lycorine et homolycorine 25

2.4.3 Les alcaloïdes type crinine, haemanthamine, tazettine, narciclasine, et montanine 25

2.5 Les activités biologiques des alcaloïdes d'Amaryllidaceae 25

2.5.1 La galanthamine 26

2.5.2 La lycorine 29

2.5.3 Autres alcaloïdes 30

3 La culture *in vitro* et les métabolites secondaires 32

3.1 Principe de la culture *in vitro* 33

3.2 La microprogation des tissus végétaux 34

3.3 Intérêts des cultures *in vitro* en phytochimie 35

3.4 Les facteurs influençant le métabolisme secondaire des Amaryllidaceae *in vitro* 36

3.4.1 Les facteurs biologiques 36

3.4.2 Les facteurs chimiques 37

3.4.3 Les facteurs physiques 42

4 Les endophytes, source de métabolites secondaires 47

4.1 Endophyte: définition 47

4.2 Origine, évolution et ubiquité des endophytes 48

4.3 Interaction plante hôte-endophyte 50

4.4 Les endophytes source de métabolites bioactifs 50

5 De l'endophyte à la molécule bioactive 52

5.1 La sélection de la plante 53

5.2 L'isolement des endophytes 53

5.3 Le dépistage biologique des endophytes 54

5.4 Le dépistage chimique des endophytes 54

Partie 3 : Matériels et Méthodes 57

1 Obtention du matériel chimique 59

2 Procédures expérimentales générales 59

3 Obtention du matériel biologique 60

4 Etapes de la culture *in vitro*: de l'explant primaire jusqu'aux bulbilles 60

4.1 Décontamination des explants primaires provenant des bulbes *in vivo* 61

4.2 Mise en culture des explants décontaminés 62

4.2.1 Induction de la callogenèse et de l'organogenèse chez les explants de *N. pseudonarcissus* et de *G. elwesii* 63

4.2.2 Induction de l'embryogenèse somatique chez *L. aestivum* et sa variété Gravety Giant 63
4.2.3 Formation des bulbilles de *L. aestivum* 64

5 Expériences menées sur des bulbilles de *L. aestivum* en présence de la 4'-*O*-méthylnorbelladine 65

5.1 Synthèse de la 4'-*O*-méthylnorbelladine (MN) 65

5.2 Ajout de la MN dans le milieu de culture liquide des bulbilles de *L. aestivum* 66

5.2.1 Ajout de la MN dans le milieu de culture liquide en Erlenmeyer 66
5.2.2 Ajout de la MN dans le milieu de culture liquide en bioréacteur RITA® 68
5.2.3 Ajout de la MN dans le milieu de culture liquide des bulbilles de *L. aestivum* 'Gravety Giant' cultivées en bioréacteur RITA® 69

6 Expériences menées sur des bulbilles de *L. aestivum* en présence d'éliciteurs 69

6.1 Bulbilles de *L. aestivum* cultivées en bioréacteur RITA® 69

6.2 Bulbilles de *L. aestivum* 'Gravety Giant' cultivées en bioréacteur RITA® 70

7 Expériences menées sur des bulbilles de *L. aestivum* en présence de précurseurs d'éthylène 70

7.1 Bulbilles de *L. aestivum* cultivées en bioréacteur RITA® 70

7.2 Bulbilles de *L. aestivum* 'Gravety Giant' cultivées en bioréacteur RITA® 71

8 Evaluation du taux de croissance des bulbilles *in vitro* 71

9 Extraction des alcaloïdes à partir des bulbilles et des milieux de culture 71

10 Purification des extraits méthanoliques 72

10.1 Extraits méthanoliques bruts sans purification 72

10.2 Préparation de la solution-mère d'étalon interne 73

10.3 Purification liquide-liquide des extraits méthanoliques 73

10.4 Purification par extraction en phase solide (SPE) des extraits méthanoliques 73

11 Analyse phytochimique des extraits par LC-ESI-MS et GC-EI-MS 74

11.1 Analyse des extraits en LC-ESI-MS 74

11.2 Analyse des extraits en GC-EI-MS 76

11.3 Validation des méthodes d'analyse en LCMS et GCMS 77

11.3.1 Linéarité des courbes étalon et leur intervalle de validité 77

11.3.2 Limite de détection (LDD) et limite de quantification (LDQ) 77

11.3.3 Répétabilité des méthodes d'analyse 77

11.3.4 Spécificité des méthodes d'analyse 77

11.3.5 Justesse des méthodes d'analyse 78

12 Isolement d'endophytes à partir de bulbes et bulbilles de trois genres d'Amaryllidaceae 78

12.1 Types de tissus prélevés 78

12.2 Décontamination de surface des explants provenant de bulbes *in vivo* 79

12.3 Le test de stérilité 79

12.4 Transfert des explants sur des milieux de culture généraux 79

12.4.1 Préparation des milieux de culture 80

13 Identification des bactéries endophytes 81

13.1 Isolement bactérien 81

13.2 Description morphologique des colonies isolées et des cellules .. 81

13.3 Test de Gram 82

13.4 Identification biochimique: les galeries API® 83

13.5 L'identification moléculaire: PCR du gène codant l'acide ribonucléique ribosomique (ARNr) 16S 84

14 Extraction des alcaloïdes à partir des souches endophytes 87

14.1 Culture liquide des souches bactériennes endophytes 87

14.2 Extraction des alcaloïdes à partir des cultures bactériennes liquides 87

15 Criblage des alcaloïdes 88

15.1 Analyse des alcaloïdes par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) 88

15.2 Tests complémentaires de détection d'alcaloïdes 88

16 Identification des alcaloïdes..... 89

16.1 Analyse des alcaloïdes par chromatographie sur couche mince couplée à la spectrométrie de masse (HPTLC-ESI-MS) 89

16.2 Purification des alcaloïdes 89

Partie 4 : Résultats et Discussions.....91

Chapitre 1 : Mise au point et validation des méthodes chromatographiques..... 93

1 La méthode LC-ESI-MS 94

1.1 Validation de la méthode LC-ESI-MS 97

1.1.1 Etalonnage interne 97
1.1.2 Limite de détection et de quantification..... 100
1.1.3 Répétabilité de la méthode..... 100
1.1.4 Chromatogrammes et spectres de masse en LCMS..... 101
1.1.5 Spécificité de la méthode 102
1.1.6 Justesse de la méthode..... 102

2 La méthode GC-EI-MS 103

2.1 Validation de la méthode GCMS.....105

2.1.1 Etalonnage en interne 105
2.1.2 Limite de détection et de quantification..... 107
2.1.3 Répétabilité de la méthode..... 107
2.1.4 Chromatogrammes et spectres de masse en GCMS..... 107
2.1.5 Spécificité de la méthode 112
2.1.6 Justesse de la méthode..... 112

3 Conclusion du chapitre 1 112

Chapitre 2 : Traitement des échantillons préalablement à leur injection en LCMS et GCMS..... 115

1 La nécessité d'un traitement préalable à l'analyse analytique 115

1.1 Importance de la concentration en alcaloides dans les extraits à injecter 115

1.2 Importance de la purification des échantillons 116

2 Principe du calcul du taux de récupération de l'hyoscyamine 117

3 Première méthode de purification: extraction liquide-liquide 120

3.1 Principe de la méthode de purification liquide-liquide 120

3.2 Évaluation de la purification liquide-liquide 120

4 Seconde méthode de purification: extraction en phase solide (SPE)..... 123

4.1 Principe de la SPE 123

4.2 Pourquoi la SPE? 126

4.3 SPE avec une phase échangeuse de cations (SCX) 126

4.4 SPE avec une phase inverse C18 129

4.5 SPE avec une phase 2H 131

4.6 SPE avec une phase normale de silice 133

4.6.1 CCM pour le choix de la phase mobile..... 133

4.6.2 Protocole de purification SPE avec une phase normale de silice 134

5 Conclusion du chapitre 2 136

Chapitre 3 : Impact d'un précurseur de la voie de biosynthèse sur la production de galanthamine et de lycorine *in vitro* 139

1 Résultats des études antérieures réalisées au laboratoire 140

2 Objectifs du travail actuel 142

3 Optimisation de la synthèse du précurseur MN..... 142

4 Ajout du précurseur au milieu de culture liquide de bulbilles de *L. aestivum* en Erlenmeyer 144

4.1 Evaluation des taux de croissance des bulbilles 144
4.2 Analyse quantitative des alcaloïdes en LCMS 145
4.3 Conclusion partielle 150
4.4 Evaluation des taux de croissance des bulbilles 151
4.5 Analyse quantitative des alcaloïdes en LCM 152
4.6 Conclusion partielle 154

5 Ajout du précurseur MN aux cultures *in vitro* de bulbilles de *L. aestivum* en conditions d'immersion temporaire 155

5.1 Evaluation des taux de croissance 156
5.2 Analyse quantitative des alcaloïdes en LCMS 157
5.3 Conclusion partielle 159
5.4 Evaluation des taux de croissance 160
5.5 Analyse quantitative des alcaloïdes en LCMS 161
5.6 Conclusion partielle 161

6 Conclusion du chapitre 3 162

Chapitre 4 : Eliciteurs et production de galanthamine et lycorine par les bulbilles de *L. aestivum* 167

1 Synthèse des études antérieures réalisées au laboratoire 168

2 Objectifs du travail actuel 169

3 Ajout d'éliciteurs dans les cultures de bulbilles de *L. aestivum* en bioréacteur RITA® 169

3.1 Evaluation des taux de croissance 170
3.2 Analyse quantitative des alcaloïdes en GCMS.....173
3.3 Conclusion partielle 176

4 Ajout d'éliciteurs dans les cultures de bulbilles de la variété Gravety Giant en bioréacteur RITA® 177

4.1 Evaluation des taux de croissance 177
4.2 Analyse quantitative des alcaloïdes en GCMS 179
4.3 Conclusion partielle 182
5 Conclusion du chapitre 4 182
Chapitre 5: Précurseurs d'éthylène et production de galanthamine et de lycorine par les bulbilles de *L. aestivum* 185
1 Synthèse des études antérieures réalisées au laboratoire 186
2 Objectifs du travail 187
3 Ajout de précurseurs d'éthylène dans les cultures de bulbilles de *L. aestivum* et *L. aestivum* 'Gravety Giant' en bioréacteurs RITA® 187
3.1 Evaluation des taux de croissance 188
3.2 Analyse quantitative des alcaloïdes en GCMS 190
4 Conclusion du chapitre 5 192
Chapitre 6 : Isolement de bactéries endophytes à partir d'Amaryllidaceae 193
1 Isolement d'endophytes à partir de plantes de la famille des Amarylidaceae 194
1.1 Décontamination de la surface des explants primaires et test de stérilité 194
1.2 Isolement des endophytes 195
2 Identification des bactéries endophytes isolées 197
2.1 Description morphologique des colonies isolées 198
2.2 Composition biochimique des parois cellulaires: test de Gram ... 199
2.3 Identification biochimique : API® 20 E™ 200
2.4 Identification moléculaire : gène codant pour l'ARNr 16S (ADNr 16S) 202

3 Dépistage chimique à la recherche d'alcaloïdes 203

3.1 Criblage des alcaloïdes par CCM.....204

3.2 Identification avec les réactifs de Bouchardat et Mayer.....205

4 Identification des alcaloïdes d'origine endophytique..... 206

4.1 Analyse des alcaloïdes par HPTLC-MS 206

4.2 Purification de l'alcaloïde d'origine endophytique 207

5 Conclusion du chapitre 6 208

Partie 5 : Conclusion Générale et Perspectives 211

Partie 6 : Références Bibliographiques 219

Partie 7 : Annexes.....237

Annexe 1 : Composition du milieu de culture MS..... 239

1 Préparation de la solution-mère de macroéléments 239

2 Préparation de la solution-mère de micro-éléments..... 239

3 Préparation de la solution-mère d'iodure de potassium 239

4 Préparation de la solution-mère de chlorure de calcium ... 240

5 Solution-mère de vitamines 240

6 Solution-mère de Fer EDTA 240

7 Préparation du milieu MS standard 241

Annexe 2 : Les solutions de la coloration de Gram..... 243

Annexe 3 : Composition des réactifs généraux des alcaloïdes 245

Liste des Figures

Figure 1 : Distribution mondiale des plantes de la famille des Amaryllidaceae[4]. 12

Figure 2 : *Leucojum aestivum*[26]. 12

Figure 3: *Narcissus pseudonarcissus* (1), une anthère d'*Amaryllis* (2), et coupe longitudinale d'une fleur de *N. pseudonarcissus* (3)[25]. 13

Figure 4 : *Leucojum aestivum* (1), *L. autumnale* (2), *L. vernum* (3)[27]. 15

Figure 5: *Galanthus elwesii* (1), *G. nivalis* (2), *G. plicatus* (3)[28]. 16

Figure 6 : *Narcissus pseudonarcissus* (1), *N. poeticus* (2), *N. tazetta* (3)[29]. 17

Figure 7: *Pancratium canariense* (1), *P. illyricum* (2), *P. maritimum* (3), les graines de *P. maritimum* (4, à droite les graines entières, en bas à gauche les graines dépourvues de leur membrane externe spongieuse et en haut à gauche le tissus spongieux couvrant la graine)[30]. 18

Figure 8 : Les types d'alcaloïdes d'Amaryllidaceae. 20

Figure 9: Voie de biosynthèse de la norbelladine. 21

Figure 10 : Couplages oxydatifs des alcaloïdes d'Amaryllidaceae. 22

Figure 11 : Voie de biosynthèse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae après les couplages *ortho-para'* et *para-ortho'* de la 4'-*O*-méthylnorbelladine. 23

Figure 12 : Voie de biosynthèse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae, après un couplage *para-para'* de la 4'-*O*-méthylnorbelladine. 24

Figure 13 : Mode d'action des anticholinestérasiques (ici la galanthamine) : inhibition de l'acétylcholinestérase augmentant ainsi le taux d'acétylcholine au niveau de la fente synaptique. 28

Figure 14 : Différentes méthodes de micropropagation de tissus végétaux *in vitro*[73]. 35

Figure 15 : Conception technologique et principe de fonctionnement du système RITA : (A) période d'exposition, (B) dislocation du milieu de culture liquide. La pression d'air est appliquée sur le compartiment inférieur à travers le tuyau central. Le milieu de culture passe dans le compartiment supérieur, (C) période d'immersion, (D) le flux d'air s'arrête et le milieu de culture revient au compartiment inférieur par gravité[100]..... 45

Figure 16 : Champignon endophyte (filaments bleus) vivant dans l'espace intercellulaire chez des plantes[28]. 48

Figure 17 : Le cycle de vie d'un endophyte[120]..... 49

Figure 18 : Bulbes de *L. aestivum* achetés chez Graines Baumaux (Nancy, France) et utilisés pour l'établissement des cultures *in vitro*. 60

Figure 19: Prélèvement des explants (2) à partir de bulbes *in vivo* (1) et leur décontamination (3). 62

Figure 20: Mise en culture des explants primaires de *L. aestivum* sur un milieu MS solide. 62

Figure 21 : Bulbilles de *G. elwesii*. 63

Figure 22 : Cals de *L. aestivum*. 64

Figure 23 : Embryons somatiques de *L. aestivum*. 64

Figure 24 : Formation de bulbilles de *L. aestivum* (A), bulbilles avec des feuilles (B). 65

Figure 25 : Synthèse du précurseur MN. 66

Figure 26 : Ajout de la MN dans le milieu de culture liquide des bulbilles de *L. aestivum* cultivés en Erlenmeyer. 67

Figure 27 : Ajout de la MN dans le milieu de culture liquide des bulbilles de *L. aestivum* cultivées en bioréacteur RITA®. 69

Figure 28 : Gradient d'élution de la GC-EI-MS. 76

Figure 29 : Méthode d'ensemencement par quadrants[152]. 81

Figure 30 : Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse. 93

Figure 31 : Phase stationnaire d'une colonne Mixed Mode HILIC. Le greffon comporte une chaîne alkyle et un groupement diol. 95

Figure 32 : Ionisation par electrospray (ESI) : à pression atmosphérique, la phase mobile est nébulisée. Les molécules sont ionisées et des ions moléculaires sont majoritairement obtenus[154]. 95

Figure 33 : Représentation d'un analyseur de type quadripôle[155]..... 96

Figure 34 : Structure de l'étalon interne, hyoscyamine. 98

Figure 35 : Courbes étalons de la galanthamine et de la lycorine obtenues en LCMS avec l'hyoscyamine comme étalon interne. 99

Figure 36 : Domaine de linéarité des courbes étalons obtenues en LCMS. 100

Figure 37 : Chromatogramme LCMS des standards de lycorine (10,1 min), de galanthamine (14,5 min) et d'hyoscyamine (17,9 min). 101

Figure 38 : Spectres de masse des standards de lycorine (adduit proton détécté à 288,124 Da), de galanthamine ($[M+H]^+$ 288,159) et d'hyoscyamine ($[M+H]^+$ 290,175) en LC-ESI-MS. 102

Figure 39 : Ionisation par impact électronique (EI). Les molécules rentrent en collision avec un faisceau électronique et se fragmentent. Les ions moléculaires ainsi que les autres produits de fragmentation passent ensuite dans l'accélérateur[157]. 104

Figure 40 : Courbes étalons de la galanthamine et de la lycorine obtenues en GCMS avec l'hyoscyamine comme étalon interne. 106

Figure 41 : Domaine de linéarité des courbes étalon obtenues en GCMS. 106

Figure 42 : Chromatogramme GCMS des standards d'hyoscyamine (9,5 min), de galanthamine (11,6 min) et de lycorine (16,5 min). 108

Figure 43 : Spectre de masse du standard de galanthamine (286 (100) ; 287 (89) ; 216 (38)) obtenu en GCMS (A) et identifié dans la librairie NIST08.LIB (B). ... 109

Figure 44 : Spectre de masse du standard de lycorine (225,85 (100) ; 287 (28) ; 227 (76)) obtenu en GCMS (A) et identifié dans la librairie NIST08.LIB (B). 110

Figure 45 : Spectre de masse du standard d'hyoscyamine (124 (100) ; 289 (4) ; 82 (48)) obtenu en GCMS (A) et identifiés dans la librairie NIST08.LIB (B)..... 111

Figure 46 : Chromatogrammes obtenus en LCMS (A) et en GCMS (B) en injectant des extraits méthanoliques bruts (sans purification préalable) de bulbilles[12]. 117

Figure 47: Etalonnage interne dans le calcul du taux de récuperation après une étape de traitement de l'échantillon. 118

Figure 48: Pics d'hyoscyamine obtenus en injectant les 6 extraits purifiés par extraction liquide-liquide. Les pics obtenus (I^{i}_{e}) sont comparés au pic d'hyoscyamine dans une solution étalon (I^{f}_{e}). 121

Figure 49 : Inconvénients de la purification par extraction liquide-liquide..... 122

Figure 50 : Différents types de cartouches SPE[160]. 123

Figure 51 : Les 4 étapes de la purification par SPE recommandées par Interchim[160]. 125

Figure 52 : Manifold pour SPE permettant de purifier simultanément 24 échantillons[157]. 125

Figure 53 : Ionisation de la galanthamine renfermant un azote basique pouvant se protonner en milieu acide..... 126

Figure 54 : Protocole de purification des alcaloïdes avec la SPE sur une phase SCX. 127

Figure 55 : Conversion de la chlorophylle a en phéophytine suite à une décomplexation en milieu acide[163]. 128

Figure 57 : Protocole de purification des alcaloïdes avec la SPE sur une phase C18. 130

Figure 58 : Protocole de purification des alcaloïdes dans le milieu de culture mis au point avec la SPE sur une phase 2H suivie d'une SPE sur une phase SCX. ... 132

Figure 59 : Protocole de purification des alcaloïdes dans les extraits de bulbes mis au point avec la SPE sur une phase normale de silice suivie d'une SPE sur une phase SCX. ... 135

Figure 60 : Chromatogramme LCMS (A) et GCMS (B) d'un extrait de bulbilles purifié par la méthode SPE avec une phase normale de silice suivie d'une SPE sur une phase SCX. ... 136

Figure 61 : Evaluation du taux de croissance des bulbilles de *L. aestivum* en présence de 0,05 ; 0,10 et 0,20 g/L de MN. Les résultats sont la moyenne de trois répétitions. ... 145

Figure 62 : Arrêt des culture (1), extraction des alcaloïdes et purification des extraits par SPE (2), quantification des alcaloïdes par LCMS (3). ... 146

Figure 63 : Quantités de MN contenues dans les milieux de culture (A) et dans les extraits de bulbilles de *L. aestivum* (B) mises en culture en présence de 0,05 ; 0,10 et 0,20 g/L de précurseur MN. ... 147

Figure 64 : Quantités de galanthamine et de lycorine dans les extraits de bulbilles de *L. aestivum* et relarguées dans les milieux de culture en présence de 0,05 ; 0,10 et 0,20 g/L de MN. ... 149

Figure 65: Evaluation du taux de croissance des bulbilles de *L. aestivum* en présence de 0,10 ; 0,15 et 0,20 g/L de MN. Les résultats sont la moyenne de trois répétitions. ... 151

Figure 66: Quantités de galanthamine (A) et de lycorine (B) contenues dans les extraits de bulbilles de *L. aestivum* en présence de 0,10 ; 0,15 et 0,20 g/L de MN. ... 153

Figure 67: Evaluation du taux de croissance des bulbilles de *L. aestivum* mises en culture dans des bioréacteurs RITA® en présence de 0,15 et 0,30 g/L de MN. Les résultats sont la moyenne de trois répétitions. ... 156

Figure 68 : Bulbilles de *L. aestivum* après 50 jours de culture dans les bioréacteurs RITA®. ... 157

Figure 69: Quantités de galanthamine (A) et de lycorine (B) contenues dans les extraits de bulbilles de *L. aestivum* mises en culture dans des bioréacteurs RITA® en présence de 0,15 et 0,30 g/L de MN. 158

Figure 70: Evaluation du taux de croissance des bulbilles de *L. aestivum* de la variété Gravety Giant, mises en culture dans des bioréacteurs RITA® en présence de 0,15 et 0,30 g/L de MN. Les résultats sont la moyenne de trois répétitions. 160

Figure 71: Quantités de galanthamine (A) et de lycorine (B) contenues dans les extraits de bulbilles de *L. aestivum* de la variété Gravety Giant mises en culture dans des bioréacteurs RITA® en présence de 0,15 et 0,30 g/L de MN. 162

Figure 72 : Protocole d'incubation des bulbilles de *L. aestivum* en présence du MeJa et de l'AS. 170

Figure 73: Evaluation des taux de croissance des bulbilles de *L. aestivum*, mises en culture dans des bioréacteur RITA® en présence du Méthyljasmonate (série *a*) et de l'acide salicylique (série *b*). Les résultats sont la moyenne de trois répétitions. 171

Figure 74: Quantités de galanthamine et de lycorine contenues dans les extraits de bulbilles de *L. aestivum* mises en culture dans des bioréacteurs RITA® en présence du Méthyljasmonate (série *a*) et de l'acide salicylique (série *b*). 174

Figure 75: Evaluation des taux de croissance des bulbilles de *L. aestivum* 'Gravety Giant', mises en culture dans des bioréacteur RITA® en présence du MeJa (série *a*) et de l'AS (série *b*). Les résultats sont la moyenne de trois répétitions. 178

Figure 76: Quantités de galanthamine et de lycorine contenues dans les extraits de bulbilles de *L. aestivum* de la variété Gravety Giant mises en culture dans des bioréacteurs RITA® en présence du MeJa (série *a*) et de l'AS (série *b*). 180

Figure 77 : Protocole d'incubation des bulbilles de *L. aestivum* et de *L. aestivum* 'Gravety Giant' en présence d'un précurseur de l'éthylène (ACC) et d'un relargueur d'éthylène (étéphon). 188

Figure 78: Concentrations en galanthamine et lycorine dans les extraits de bulbilles de *L. aestivum* et de *L. aestivum* de la variété Gravety Giant mises en culture dans des bioréacteurs RITA® en présence de l'ACC ou de l'étéphon. 190

Figure 79: Développement de colonies bactériennes endophytes à partir d'explants de bulbilles de *L. aestivum* (à gauche les explants sont mis en culture sur un milieu NA, à droite sur un milieu PDA). 197

Figure 80: Repiquage des colonies selon la méthode des quadrants (à gauche sans dilution préalabale de la colonie, à droite avec 6 dilutions successives au 1/10^{e}). 197

Figure 81 : Enveloppe de bactérie à gram + et à gram -..... 199

Figure 82 : Bactéries à gram + en forme de bacilles observées au microscope optique sous grossissement x1000..... 200

Figure 83 : Etapes de la réalisation du test API® 20 E™ depuis l'inoculation de la galerie jusqu'à la lecture. 201

Figure 84 : L'ARN ribosomique 16S, un constituant de la petite sous-unité ribosomale des procaryotes..... 202

Figure 85 : Migration sur plaque de silice des standards de galanthamine (1), lycorine (2), hyoscyamine (3) et norbelladine (4) et des extraits de bactéries endophytes (5 à 7). 204

Figure 86 : Test de Mayer (à gauche) et test de Bouchardat (à droite)..... 205

Figure 87 : Spectre de masse en ESI-MS de l'alcaloïde isolé à partir des endophytes. L'ion moléculaire est obtenu à m/z 1336,4717..... 207

Figure 88 : Spectre UV de l'alcaloïde produit par les bactéries endophytes. L'absorbance maximale est atteinte à 205 nm. 208

Liste des Tableaux

Tableau 1: Les trois stades de développement de la galanthamine au médicament. 27

Tableau 2 : Les activités biologiques de quelques alcaloïdes d'Amaryllidaceae..... 30

Tableau 3 : Effet synergique de deux facteurs : ajout du saccharose et de phytorégulateurs sur différents paramètres de la culture *in vitro* de plantes de la famille des Amaryllidaceae. 40

Tableau 4 : Quelques métabolites secondaires isolés à partir de bactéries et de champignons endophytes. 51

Tableau 5 : Gradient d'élution LCMS adapté à la séparation des alcaloïdes contenus dans les extraits. 75

Tableau 6 : Conditions d'isolement des endophytes 80

Tableau 7: Composition des milieux de culture NA et PDA. 80

Tableau 8 : Description morphologique des colonies et des cellules bactériennes. 82

Tableau 9 : Préparation du mélange réactionnel de la PCR (le volume de réaction final est de 25 µL). 85

Tableau 10 : Conditions d'amplifications PCR du gène codant pour l'ARNr 16S. 87

Tableau 11 : Vérification de la répétabilité de la méthode LCMS. L'échantillon injecté renferme la galanthamine, la lycorine et l'hyoscyamine à des concentrations théoriques respectives de 2,47 ; 2,33 et 2 µg/mL. 101

Tableau 12 : Evaluation de la justesse de la méthode LCMS : calcul de la moyenne et de l'écart-type du taux de récupération de la galanthamine. N = 3. 103

Tableau 13 : Vérification de la répétabilité de la méthode GCMS. L'échantillon injecté renferme la galanthamine, la lycorine et l'hyoscyamine à des concentrations théoriques respectives de 14,78 ; 19,56 et 20 µg/mL. 107

Tableau 14 : Evaluation de la justesse de la méthode GCMS : calcul de la moyenne et de l'écart-type du taux de récupération. N = 3. 112

Tableau 15 : Taux de récupération de l'hyoscyamine dans les extraits purifiés par la méthode liquide-liquide. 121

Tableau 16 : Taux de récupération de l'hyoscyamine obtenus avec les deux méthodes de purification testées : liquide-liquide et SPE. 137

Tableau 17 : Biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine sous toutes les conditions testées. 164

Tableau 18 : Taux de croissance des bulbilles en présence d'ACC ou d'étéphon. 189

Tableau 19 : Résultats du dépistage d'endophytes. NA+ et PDA+ désignent les milieux Nutrient Agar et Potato Dextrose Agar additionnés de 0,5 g/L de chloramphénicol. Les signes (+) et (-) désignent respectivement présence et absence d'endophytes. 196

Tableau 20 : Description morphologique des 4 types de colonies bactériennes endophytes. 198

Tableau 21 : Résumé des effets des différents facteurs stimulateurs étudiés durant cette thèse sur la croissance des bulbilles et sur la stimulation de la biosynthèse de galanthamine (G) et de lycorine (L). 217

Partie 1 : Propos Introductif

Introduction

En 1950, un pharmacognoste russe découvrit une pratique de villageois vivants au pied de l'Oural qui suscita, très rapidement, la curiosité de la communauté scientifique. Ceux-ci, utilisaient une décoction de bulbes sauvages de perce neige conduisant à la guérison complète des enfants atteints de poliomyélite[1]. Peu après, la galanthamine, le principe actif de cette décoction douée de propriétés antiacétylcholinestérasiques, fut extraite à partir des bulbes de *Galanthus woronowii*[1]. Elle a été commercialisée, dans un premier temps, pour le traitement de la poliomyélite et dans un second temps et jusqu'à nos jours, pour le traitement palliatif de la maladie d'Alzheimer[1]. En effet, la galanthamine est un inhibiteur sélectif, réversible et compétitif de l'acétylcholinestérase[2]. Aujourd'hui, cet alcaloïde, à haute valeur ajoutée, est principalement extrait à partir des bulbes de la famille des Amaryllidaceae : la nivéole d'été (*Leucojum aestivum*), le perce neige (*Galanthus nivalis*) et les narcisses (*Narcissus* sp.)[3].

Depuis l'isolement de la lycorine en 1877[4] et la découverte de la galanthamine en 1951, plus de 300 alcaloïdes, doués d'activités biologiques, ont été isolés à partir de plantes d'Amaryllidaceae[2]. La lycorine par exemple, est antivirale[5], antimalarique[6], apoptotique[7] et analgésique[2]. La prétazettine[8] et l'homolycorine[9] sont cytotoxiques. La vittatine, quant à elle, est antibactérienne[10]. Cependant, comme pour de nombreuses molécules naturelles à haute valeur ajoutée, l'accumulation limitée des alcaloïdes d'Amaryllidaceae dans les plantes restreint leur usage commercial[11].

Jusqu'à nos jours, seule la galanthamine est commercialisée. Elle peut être obtenue soit par synthèse chimique, soit par extraction à partir des plantes de culture. Ces deux méthodes d'obtention présentent des failles qui sont à l'origine des coûts élevés de cet alcaloïde[12]. En effet, la structure de ce composé renferme trois carbones asymétriques et le respect de la configuration rend la synthèse chimique complexe et fastidieuse. Par ailleurs, les plantes de *L. aestivum* utilisées comme source de matière première, renferment de la galanthamine à un taux moyen de 0,1% de matière sèche[13]. Sachant que la dose journalière de galanthamine prescrite varie de 30 à 50 mg en fonction du poids du patient, il faut 18 000 kg/an de galanthamine pour le traitement de seulement un million de patients. Ces besoins

nécessitent la manipulation d'environ 18 000 tonnes de bulbes/an[14]. En raison de l'augmentation de l'espérance de vie, le nombre de personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer ne cesse d'augmenter, entraînant ainsi une demande croissante du marché pharmaceutique que les sources naturelles, et la chimie de synthèse, ne peuvent pas satisfaire.

Bien que les plantes constituent théoriquement des ressources renouvelables, le manque de réglementation concernant leur exploitation conduit progressivement à une destruction de leurs habitats naturels et donc à une diminution des ressources disponibles. De plus, les métabolites secondaires extraits à partir des plantes de culture sont plutôt vulnérables aux fluctuations du climat, des pathogènes sur les cultures et de la situation politique des pays producteurs[11]. Pour toutes ces raisons, il est nécessaire de trouver une solution alternative pour la production des alcaloïdes à une échelle commerciale et économiquement viable.

Les cultures *in vitro* de cellules, et surtout de tissus différenciés de plantes, du fait de leur totipotence, offrent une alternative pour la production *in vitro* de métabolites secondaires d'intérêt. Elles permettent de contrôler la multiplication de la biomasse et l'élicitation des voies de biosynthèse dans un environnement contrôlé contrairement à la culture en champs ou en serre. La culture *in vitro* a été appliquée avec succès pour la production à échelle commerciale de shikonine par des cultures cellulaires de *Lithospermum erythrorhizon*[11], de saponosides à partir de cellules de *Panax ginseng*[15], et du paclitaxel à partir de cultures de cellules de *Taxus baccata*[16],

En vue d'améliorer le rendement de ces procédés biotechnologiques en termes de production de biomasse et d'alcaloïdes, de nombreuses stratégies ont été mises en œuvre et des facteurs biologiques, physiques et chimiques influençant la qualité des cultures ont été définis. On peut citer, le degré de différenciation[17] et le type de tissus utilisés[3], la composition des milieux de culture[18], en particulier au niveau de l'apport des régulateurs de croissance[19], l'application d'agents éliciteurs[20] ou l'ajout de précurseurs de biosynthèse[21].

Les organismes vivants sont la source d'une panoplie de métabolites. Bien que la plupart de ces composés soient découverts chez les plantes, les microorganismes constituent aussi une source importante avec plus de 200 000 composés biologiquement actifs déjà identifiés. Ces dernières

années, un grand intérêt a été porté aux endophytes. En effet, des 300 000 espèces de plantes existantes, chacune est l'hôte d'un ou de plusieurs endophytes[22]. Ces organismes vivants à l'intérieur des tissus végétaux de manière asymptomatique, seraient bénéfiques pour la plante hôte[23]. La production d'alcaloïdes par les endophytes, issus de plantes appartenant à la famille des Amaryllidaceae, pourrait constituer une nouvelle source de composés biologiquement actifs.

Ce travail, dirigé par le Pr. D. LAURAIN-MATTAR au sein du groupe MOBAT de l'UMR 7565 à l'Université de Lorraine, s'inscrit dans le cadre de la production de molécules d'intérêt thérapeutique par une approche biotechnologique. Une partie de ce travail a été codirigée par le Dr. A. PTAK de l'Université d'Agriculture de Cracovie (Pologne), notamment les expériences d'élicitation menées dans des bioréacteurs RITA®.

Cette thèse comprend deux grandes parties. La première partie porte sur l'étude de plusieurs facteurs exogènes pouvant agir sur la voie de biosynthèse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae, en particulier la galanthamine et la lycorine. Les expériences ont été menées sur des cultures *in vitro* de bulbilles initiées à partir de la culture d'explants de feuilles de *Leucojum aestivum* et de sa variété Gravety Giant. L'effet des facteurs exogènes (précurseur biogénétique de la galanthamine et de la lycorine, méthyljasmonate, acide salicylique, précurseurs et relargueurs d'éthylène) a été mesuré en réalisant une étude phytochimique sur les extraits obtenus à partir des bulbilles *in vitro*. Les alcaloïdes d'Amaryllidaceae ont été identifiés. La galanthamine et la lycorine ont été quantifiées à l'aide de méthodes chromatographiques liquides et gazeuses couplées à la spectrométrie de masse. C'est pour cette raison que des validations de méthodes analytiques chromatographiques ont été réalisées.

La seconde partie rapporte l'isolement et l'identification d'endophytes bactériens à partir de trois espèces d'Amaryllidaceae (*Leucojum aestivum*, *Narcissus pseudonarissus* et *Galanthus elwesii*) à la fois sur des bulbes *in vivo* et sur le matériel développé *in vitro*. Un screening chimique a été réalisé sur les extraits des souches isolées pour rechercher la présence d'alcaloïdes.

Objectifs

Ces travaux de thèse comportent trois objectifs principaux :

Le premier vise à développer une méthode de purification simple et rapide des extraits complexes de plantes issues de la culture *in vitro* et de leur milieu de culture, afin de faciliter leur analyse phytochimique par les méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse (LCMS et GCMS). Cette étape de traitement préalable à l'analyse chromatographique est indispensable pour permettre une meilleure identification et une meilleure quantification des alcaloïdes recherchés dans les extraits. La méthode de purification doit permettre le traitement efficace d'un maximum d'échantillons dans un minimum de temps possible.

Le second objectif vise à stimuler la voie de biosynthèse de la galanthamine et celle de la lycorine à partir de bulbilles de *L. aestivum* et de sa variété Gravety Giant par le biais des cultures *in vitro*. Plusieurs facteurs, ayant montré dans des études antérieures un effet stimulateur sur l'accumulation de ces alcaloïdes dans les bulbes de *L. aestivum*, ont été testés dans de nouvelles conditions de culture. L'étude a porté sur l'effet des cultures en conditions d'immersion temporaire, dans des bioréacteurs RITA®, associé à l'ajout de plusieurs agents exogènes au milieu de culture des bulbilles : ajout d'un précurseur de la voie de biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine (4'-*O*-méthylnorbelladine), ajout d'éliciteurs (méthyljasmonate et acide salicylique), ajout d'un précurseur (acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique) et d'un relargueur (éthéphon) d'éthylène.

Le troisième objectif porte sur la recherche, l'isolement et l'identification d'endophytes producteurs d'alcaloïdes chez trois espèces d'Amaryllidaceae (*L. aestivum*, *N. pseudonarcissus* et *G. elwesii*). Pour cela, les techniques de microbiologie (cultures bactériennes, isolement de colonies, test de Gram, identification biochimique) et de biologie moléculaire (PCR, séquençage) se sont ajoutées à celles de la phytochimie.

Après une étude bibliographique portant sur les principaux membres de la famille des Amaryllidaceae, les alcaloïdes d'Amaryllidaceae, leur voie de biosynthèse et leurs activités biologiques, ainsi que sur les endophytes nous

présenterons les matériels et méthodes utilisés. L'ensemble des résultats obtenus seront discutés dans une partie « Résultats et Discussions » comportant six chapitres. Une partie « Conclusion Générale et Perspectives » achèvera ce travail.

Partie 2 : Synthèse Bibliographique

1 La famille des Amaryllidaceae

Pendant des siècles, un grand nombre de plantes ont été utilisées comme ressources essentielles d'agents thérapeutiques pour lutter contre des maladies humaines diverses. Parmi ces sources traditionnelles de médicaments, la famille des Amaryllidaceae renferme de nombreuses plantes sources de molécules bioactives[24]. En plus de leur intérêt pharmacologique, la valeur ornementale des Amaryllidaceae est depuis longtemps reconnue et exploitée.

1.1 Distribution des plantes de la famille des Amaryllidaceae

Cette famille de monocotylédones comprend 65 genres et environ 1100 espèces réparties à travers le monde entier (Figure 1). L'Amérique du Sud (28 genres) et l'Afrique du Sud (19 genres) sont les régions les plus riches en termes de diversité. La région méditerranéenne comporte huit genres ; alors que l'Australie en a seulement trois[4]. Les plantes appartenant à cette famille occupent plusieurs habitats différents : endroits secs par saison, piscines éphémères, sous-étages des forêts tropicales, et bords de rivières.

La famille des Amaryllidaceae doit son nom à l'*Amaryllis*, genre monospécifique d'Afrique du Sud qui est largement cultivé comme plante ornementale. Les principaux genres sont les *Crinum* avec plus de 120 espèces, *Hippeastrum* avec 75 espèces, *Cyrtanthus*, *Zephyranthes* et *Hymenocallis* avec plus de 40 espèces chacun. La flore française comprend à l'état spontané une bonne dizaine d'espèces du genre *Narcissus*, ainsi que des *Leucojum* (7 espèces), *Sternbergia* (7 espèces), *Pancratium* (2 espèces), et *Galanthus* (1 espèce).



Figure 1 : Distribution mondiale des plantes de la famille des Amaryllidaceae[4].

1.2 Caractères botaniques de la famille des Amaryllidaceae

1.2.1 Appareil végétatif

Ce sont des plantes monocotylédones vivaces par un bulbe. Les feuilles sont plates, engainantes à la base et habituellement glabres (Figure 2)[25].



Figure 2 : *Leucojum aestivum*[26].

1.2.2 Appareil reproducteur

1.2.2.1 L'inflorescence

On observe une inflorescence terminale ombelliforme, formée de cymes hélicoïdes condensées à l'aisselle d'une spathe membraneuse (Figure 3). Chez certains genres, la fleur est solitaire (*Narcissus pseudonarcissus* L.)[25].

1.2.2.2 La fleur

La fleur est régulière, bisexuée et trimère.

Le périanthe est constitué de 2 verticilles de 3 tépales, libres (*Galanthus*, *Leucojum*) ou soudés en une profonde coupe évasée au sommet (*Sternbergia*). Parfois il existe une couronne pétaloïde interne issue de la soudure des stipules staminales, appelée paracorolle (*Narcissus*).

L'androcée montre 2 verticilles de 3 étamines, mais leur nombre peut aller jusqu'à 18 ; leurs filets sont libres, mais parfois soudés à la base du tube du périanthe (*Pancratium*). Les anthères sont à déhiscence généralement longitudinale, mais parfois poricide (*Galanthus*, *Leucojum*). La pollinisation est entomophile.

Le gynécée présente 3 carpelles, formant un ovaire infère triloculaire. Chaque loge renferme un nombre variable d'ovules anatropes[25].

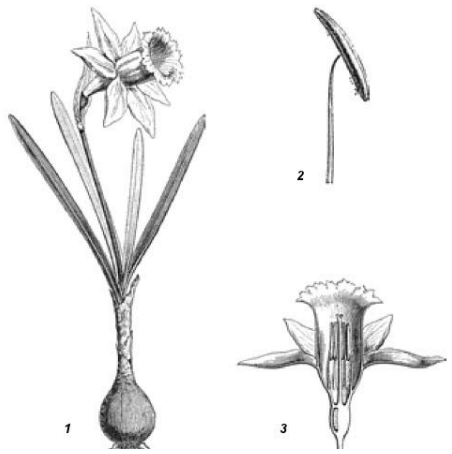


Figure 3: *Narcissus pseudonarcissus* (1), une anthère d'*Amaryllis* (2), et coupe longitudinale d'une fleur de *N. pseudonarcissus* (3)[25].

1.2.2.3 Le fruit

Le fruit est une capsule loculicide, parfois une baie (*Clivia*). La graine dispose d'un albumen charnu.

1.3 Les principaux genres

1.3.1 Leucojum

Pendant des siècles *Leucojum* a été employé pour désigner aussi bien les perce-neige (*Galanthus*) que les nivéoles. Linné sépara de cet ensemble les *Galanthus*, qui se distinguent par des tépales internes plus courts que les externes. Le "reste" se retrouva dans le genre *Leucojum*. Des botanistes remarquèrent que ce "reste" était hétérogène, et ils subdivisèrent ce genre en plusieurs genres, dont le genre *Acis*. De 1878 à 1888 Baker abaissa ces genres au rang de sous genres de *Leucojum*. A l'aide de la phylogénétique et du séquençage de l'ADN, le genre *Acis* revit le jour en juillet 2004. Les espèces les plus étudiées sont :

Leucojum aestivum (nivéole d'été): Cette plante est à floraison printanière. Elle est originaire d'Europe et d'Asie Mineure. Ses fleurs parfumées, blanches tâchetées de vert à la pointe des pétales, sont portées en grappe sur des tiges de 45 cm de hauteur. La plante porte des feuilles vert bleutées, longues et étroites. Elle apprécie une plantation sous couvert d'arbres à feuilles caduques (Figure 4).

Leucojum autumnale (nivéole d'automne): Cette espèce se distingue par ses fleurs blanches teintées de rose, solitaires ou regroupées par deux ou trois, au sommet de tiges de 25 cm de hauteur. Ses feuilles basales dressées très étroites, se développent après la floraison. La fleur s'épanouit en fin d'été et en début d'automne (Figure 4). Les bulbes doivent être plantés à 5 cm de profondeur, en sol bien drainé, au soleil.

Leucojum vernum (nivéole de printemps) : Originaire d'Europe centrale, cette espèce de 45 cm de hauteur, pousse dans des endroits détrempés, au soleil ou à l'ombre, et supporte bien un été sec. Elle présente des fleurs en clochette, écloses en fin d'hiver et au début du printemps. Groupées par deux sur les tiges, elles ont des pétales blancs tâchetés de vert ou de jaune (Figure 4).

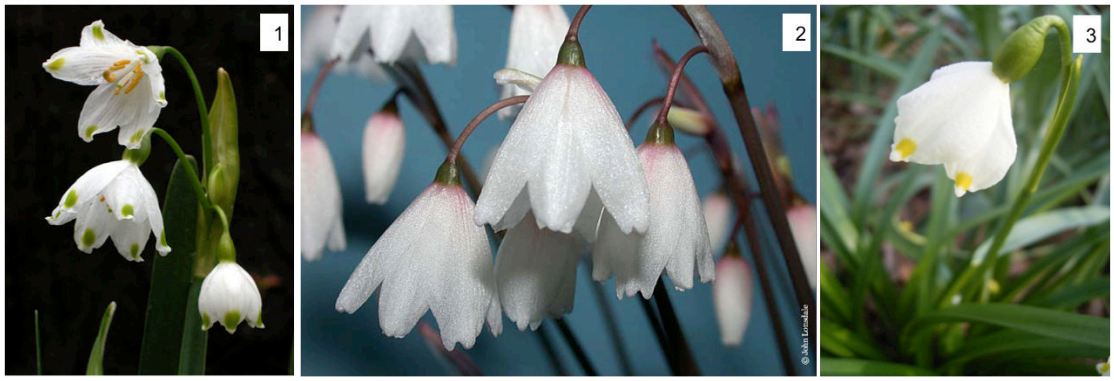


Figure 4 : *Leucojum aestivum* (1), *L. autumnale* (2), *L. vernum* (3)[27].

1.3.2 *Galanthus* (perce-neige)

Ce genre regroupe environ 19 espèces de petites plantes à bulbe, originaire d'Europe et d'Asie Mineure. Annonçant la venue du printemps, leurs petites fleurs retombantes blanches, parfois parfumées, surgissent en fin d'hiver. Le genre se reconnaît aux trois pétales internes marqués de vert, nettement plus courts que les trois pétales externes. Très rustiques, les perce-neige apprécient un climat frais et fleurissent dans les bois, les prairies, les forêts de feuilles mixtes et les pineraies. Les espèces les plus étudiées sont :

Galanthus elwesii: Originaire de Turquie et des Balkans, cette espèce prospère en climat tempéré et se distingue par ses feuilles bleu-gris repliées l'une sur l'autre à la base. Elle exhibe en fin d'hiver des fleurs en clochettes blanches de 25 cm de hauteur (Figure 5).

Galanthus nivalis: Cette espèce de 15 cm de hauteur, aux feuilles vert bleuté est la plus commune du genre (Figure 5).

Galanthus plicatus: Originaire de Turquie et d'Europe de l'Est, cette espèce de 20 cm de hauteur porte de larges feuilles vert sombre (Figure 5).



Figure 5: *Galanthus elwesii* (1), *G. nivalis* (2), *G. plicatus* (3)[28].

1.3.3 *Narcissus* (jonquille)

Selon la mythologie grecque, Narcisse du grec « Νάρκισσος" était un chasseur originaire de Thespies en Béotie. A sa naissance, le devin Tirésias annonça à Liriopé (mère de Narcisse): "Narcisse vivra très vieux à condition qu'il ne se voit jamais". En effet Narcisse était d'une beauté exceptionnelle et d'un caractère très fier insensible à l'amour. Il repoussa toutes ses prétendantes, parmi lesquelles la nymphe Echo. Némésis entendit le désespoir d'Echo et fait voir à Narcisse son reflet dans l'eau d'une source claire. Celui-ci en tomba amoureux et face à cette passion sans espoir, il préféra se suicider.

Narcissus est un genre très connu comptant une cinquantaine d'espèces de bulbes rencontrées principalement en Méditerranée occidentale, mais aussi en Afrique et en Asie. Ces plantes fleurissent dans les prairies, pâturages et forêts claires. Les espèces les plus étudiées sont :

Narcissus pseudonarcissus: Originaire d'Europe occidentale, cette espèce présente, au printemps, des trompettes jaune vif (Figure 6).

Narcissus poeticus: Il s'agit de plantes à floraison tardive de 45cm de hauteur, originaire d'Europe méridionale. Chaque tige présente deux fleurs à pétales blancs souvent à bord frisé rouge ou orange (Figure 6).

Narcissus tazetta: Ces narcisses très parfumées exhibent, de l'automne jusqu'au printemps, des fleurs en bouquets sur des tiges de 40 cm de hauteur (Figure 6).

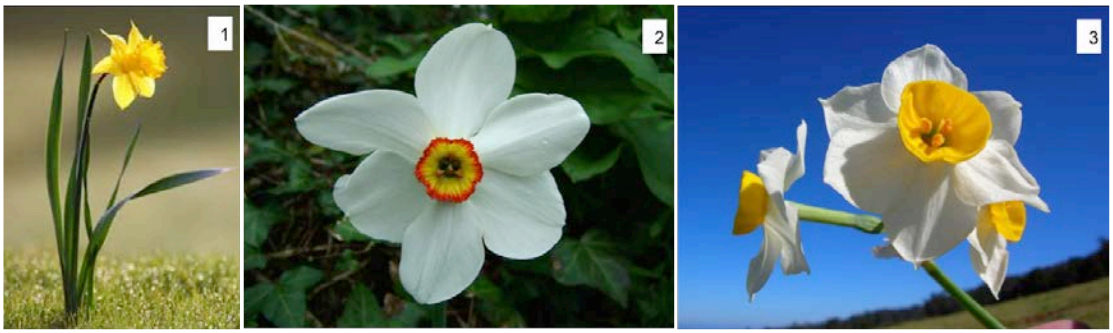


Figure 6 : *Narcissus pseudonarcissus* (1), *N. poeticus* (2), *N. tazetta* (3)[29].

1.3.4 Pancratium

Le nom *Pancratium* dérive du mot grec « pagkration » signifiant tout-puissant. Cette appellation est peut-être due aux propriétés médicinales que possèdent les espèces appartenant à ce genre. Ces plantes ont été cultivées dès l'antiquité autour de la Méditerranée et on les retrouve sur des fresques crétoises préclassiques et des timbres. *Pancratium* est le genre d'Amaryllidaceae le plus rependu en Eurasie. Plus de 21 espèces ont été identifiées. Ce genre est largement distribué dans les Iles des Canaries, en Afrique du Nord, en Méditerranée, et en Inde. Les espèces les plus étudiées sont :

Pancratium canariense: Originaire des Iles de Canaries, elle pousse sur les falaises (Figure 7).

Pancratium Illyricum: Originaire de la Corse, Sardaigne et Capri, cette plante prospère sur les pentes rocheuses et dans les zones boisées à des altitudes allant jusqu'à 1300 m du niveau de la mer. Elle fleurit en mai. Les fleurs sont blanches et parfumées (Figure 7).

Pancratium maritimum: Se développant sur le long des côtes sableuses de la Méditerranée, en sol humide, cette plante reste verte durant toute l'année. Les graines sont épaisses, ceci est probablement dû à leur membrane externe spongieuse leur permettant ainsi de flotter sur l'eau (Figure 7).

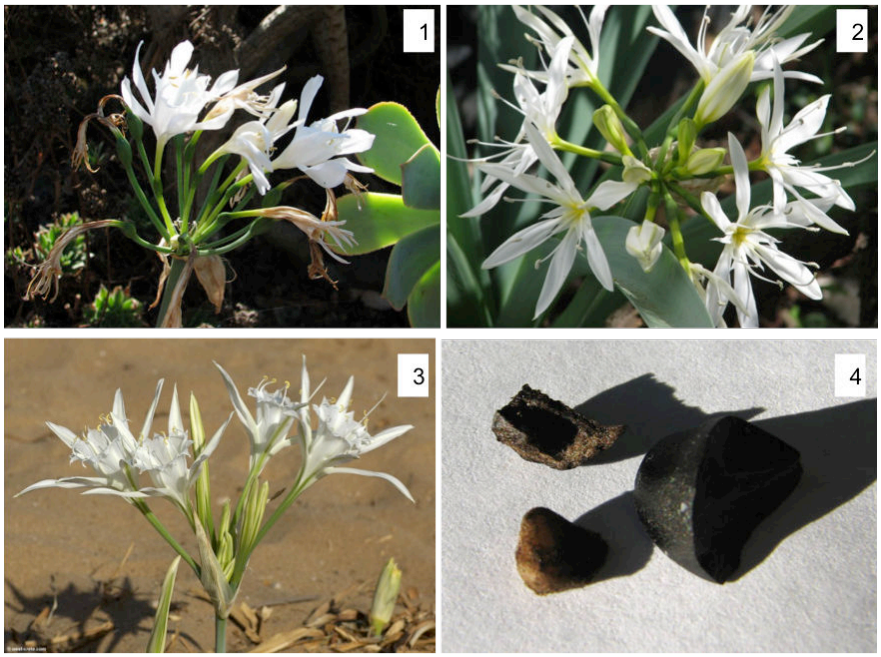


Figure 7: *Pancratium canariense* (1), *P. illyricum* (2), *P. maritimum* (3), les graines de *P. maritimum* (4, à droite les graines entières, en bas à gauche les graines dépourvues de leur membrane externe spongieuse et en haut à gauche le tissus spongieux couvrant la graine)[30].

2 Les alcaloïdes d'Amaryllidaceae

Les plantes appartenant à la famille des Amaryllidaceae sont connues pour produire un groupe exclusif d'alcaloïdes appelés « les alcaloïdes d'Amaryllidaceae ». Ils sont isolés à partir de tous les genres de cette famille. Depuis l'isolement de la lycorine à partir de *N. pseudonarcissus* en 1877[4], plus de 300 alcaloïdes ont été isolés à partir de plantes d'Amaryllidaceae[2]. Ces alcaloïdes sont connus et exploités pour leurs activités biologiques diverses.

2.1 Généralités sur les alcaloïdes

Les alcaloïdes représentent des molécules d'origine naturelle, renfermant du carbone, de l'hydrogène, et plus spécialement, de l'azote. Leur dénomination de l'arabe « al kali », fait référence à leur caractère alcalin ou basique. La plupart possèdent une activité biologique marquée qui a suscité, de longue date, un intérêt thérapeutique. Parmi les alcaloïdes qui ont incité le développement de plusieurs médicaments on peut citer, la morphine analgésique, la tubocurarine et la papavérine spasmolytiques, la vincamine et l'ajmalicine vasodilatatrices, la vinblastine anticancéreuse, l'émétine avec

son activité antiparasitaire, la codéine antitussive et la galanthamine antiacétylcholinestérasique.

Ce sont des métabolites secondaires généralement synthétisés dans les tissus périphériques des plantes, puis ils sont stockés dans des compartiments cellulaires tels les vacuoles. La régulation de la synthèse de ces alcaloïdes, qui peut s'exercer au niveau de l'expression enzymatique, est dépendante du stade de différenciation cellulaire[12].

2.2 Rôle des alcaloïdes dans le métabolisme de la plante

Plusieurs hypothèses ont été émises concernant le rôle des alcaloïdes dans le métabolisme de la plante, cependant, leurs fonctions restent obscures. Les alcaloïdes étaient considérés précédemment comme des déchets azotés, tels l'urée ou l'acide urique chez les animaux, ou aussi comme des réservoirs pour le stockage de l'azote, même si la plupart de ces produits restent accumulés dans la plante et ne sont pas métabolisés ultérieurement. Vu la toxicité de ces composés, il se peut qu'ils aient un rôle protecteur, défendant les plantes contre les insectes ou des herbivores. Etant donné l'hétérogénéité du groupe des alcaloïdes, leurs fonctions sont probablement très diverses. Evidemment, leur métabolisme est lié à l'azote et pour une raison quelconque, leur concentration dans les plantes varie d'une saison à l'autre et d'un organe à l'autre[3].

2.3 Classification des alcaloïdes d'Amaryllidaceae

Selon leur structure, les alcaloïdes d'Amaryllidaceae sont classés en 8 groupes dont les principaux représentants sont: lycorine, galanthamine, tazettine, narciclasine, montanine, lycorénine, haemanthamine, et crinine[2] (Figure 8).

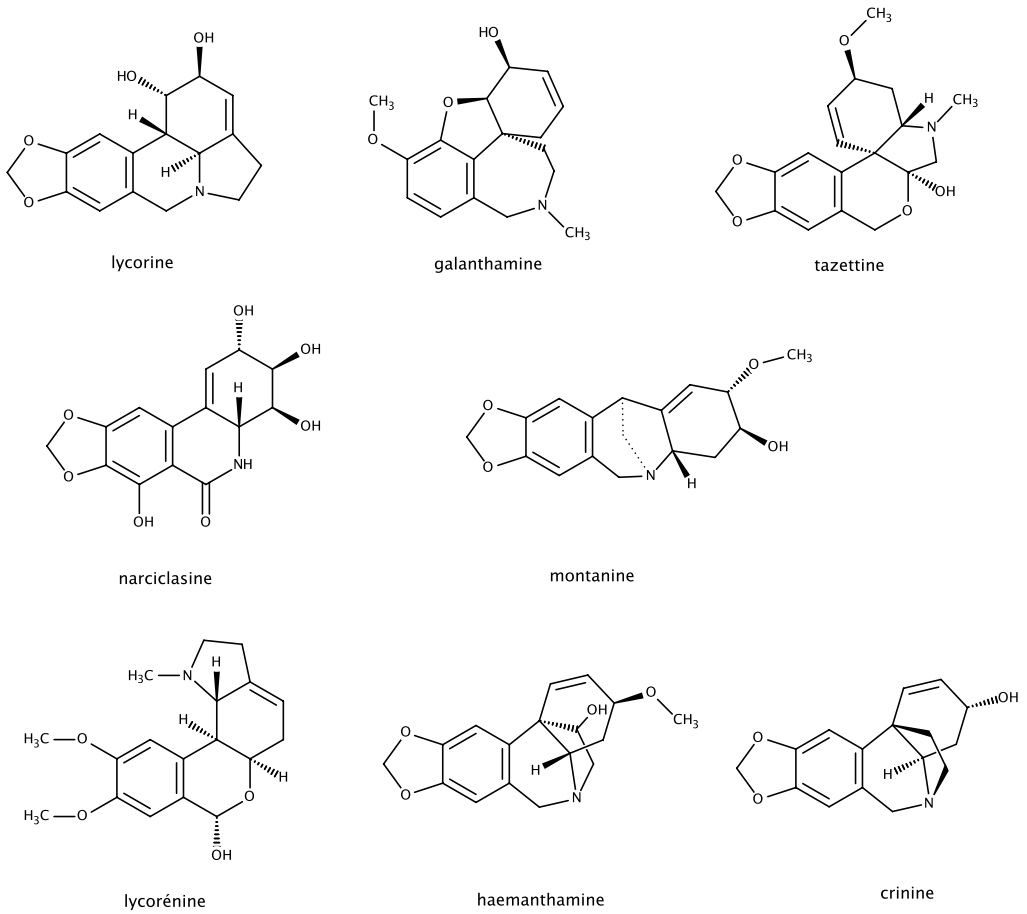


Figure 8 : Les types d'alcaloïdes d'Amaryllidaceae.

2.4 La voie de biosynthèse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae

Excepté pour la galanthamine, la majeure partie des recherches sur la biosynthèse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae a été réalisée dans les années 60 et 70[2]. Néanmoins, cette voie de biosynthèse reste mal connue au niveau biochimique et surtout au niveau moléculaire ; seulement un gène impliqué a été identifié[31]. La voie de biosynthèse présumée a été étudiée en détails et les composés intermédiaires ont été déterminés. Toute cette connaissance est basée sur des expériences de radiomarquage[31]. En 1957, Barton et Cohen[32] ont proposé que ces alcaloïdes soient le résultat de plusieurs couplages oxydatifs intramoléculaires de précurseurs dérivés de la norbelladine.

La norbelladine est formée par la combinaison du 3,4-dihydroxybenzaldéhyde avec la tyramine ; ces deux précurseurs résultant

respectivement de la L-phénylalanine (L-phe) et la L-tyrosine (L-tyr) (Figure 9). En effet, la conversion de la L-phe en l'unité C6-C1 de la norbelladine (C6-C2-N-C1-C6) requiert l'introduction de deux substituants oxygénés au niveau du cycle aromatique et la perte de deux atomes de carbones de la chaîne secondaire. Ceci est réalisé *via* les acides cinnamiques. C'est l'enzyme phénylalanine ammonia-lyase qui intervient en éliminant l'ammoniaque pour former les acides *trans*-cinnamiques[33] qui sont par la suite hydroxylés par deux cytochromes P450 ; cinnamate-4-hydroxylase et coumarate-3-hydroxylase[34] et conduisent à l'acide caféique. Le produit final est un aldéhyde protocatéchique (3,4-dihydroxybenzaldéhyde). La L-tyr est dégradée en tyramine (C6-C2-N) avant son incorporation dans le métabolisme secondaire. La jonction de l'amine et de l'aldéhyde résulte en une base de Schiff. Après réduction de la base de Schiff et méthylation de la norbelladine grâce à une 4'-*O*-méthyltransférase[31], la 4'-*O*-méthylnorbelladine (MN) est obtenue. Celle-ci est considérée comme l'intermédiaire clé dans l'élaboration de la plupart des alcaloïdes.

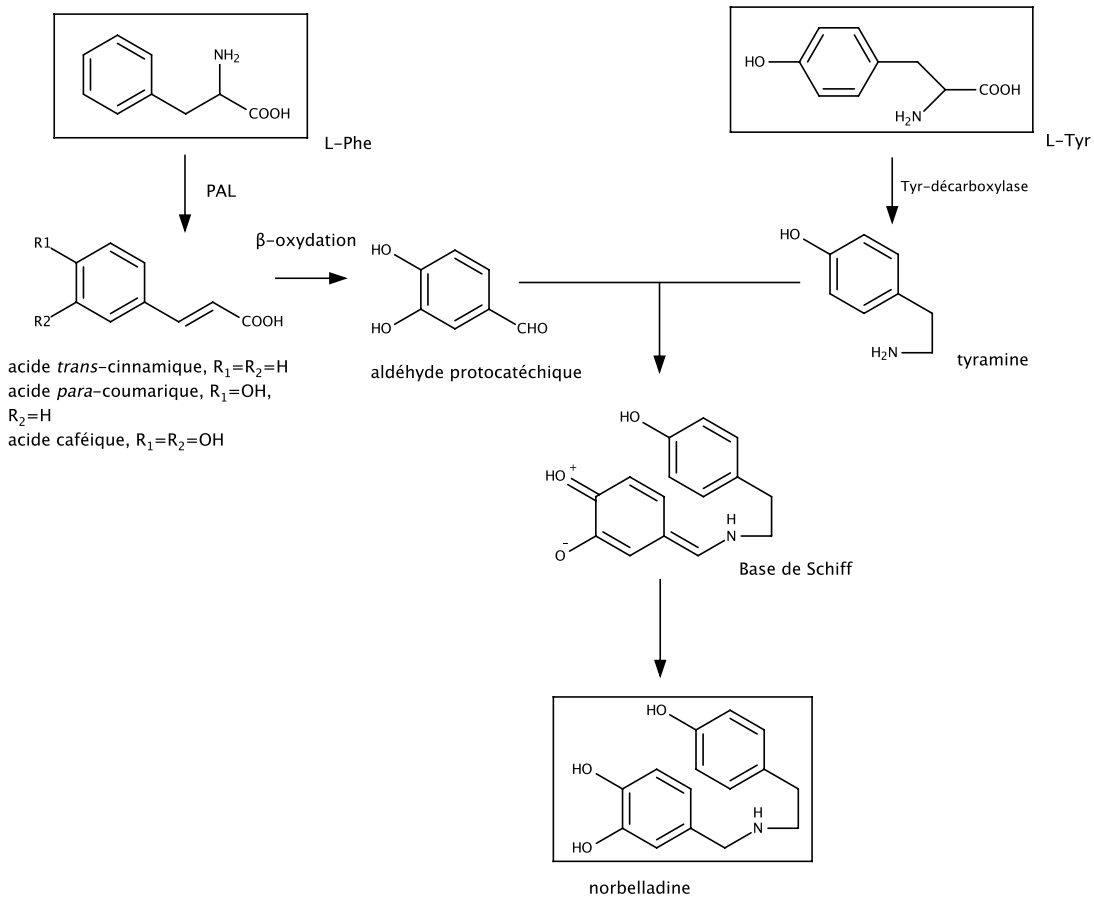


Figure 9: Voie de biosynthèse de la norbelladine.

La MN peut subir trois types de couplage oxydatifs : *ortho-para'*, *para-para'*, et *para-ortho'*. La lycorine est obtenue par le couplage *ortho-para'*, la crinine et la marithidine par le couplage *para-para'*, et la galanthamine par le couplage *para-ortho'*[32, 35](Figure 10). Un réseau complexe de réactions enzymatiques ainsi que les 3 structures de base obtenues grâce au couplage, conduisent à plus de 500 alcaloïdes différents[24].

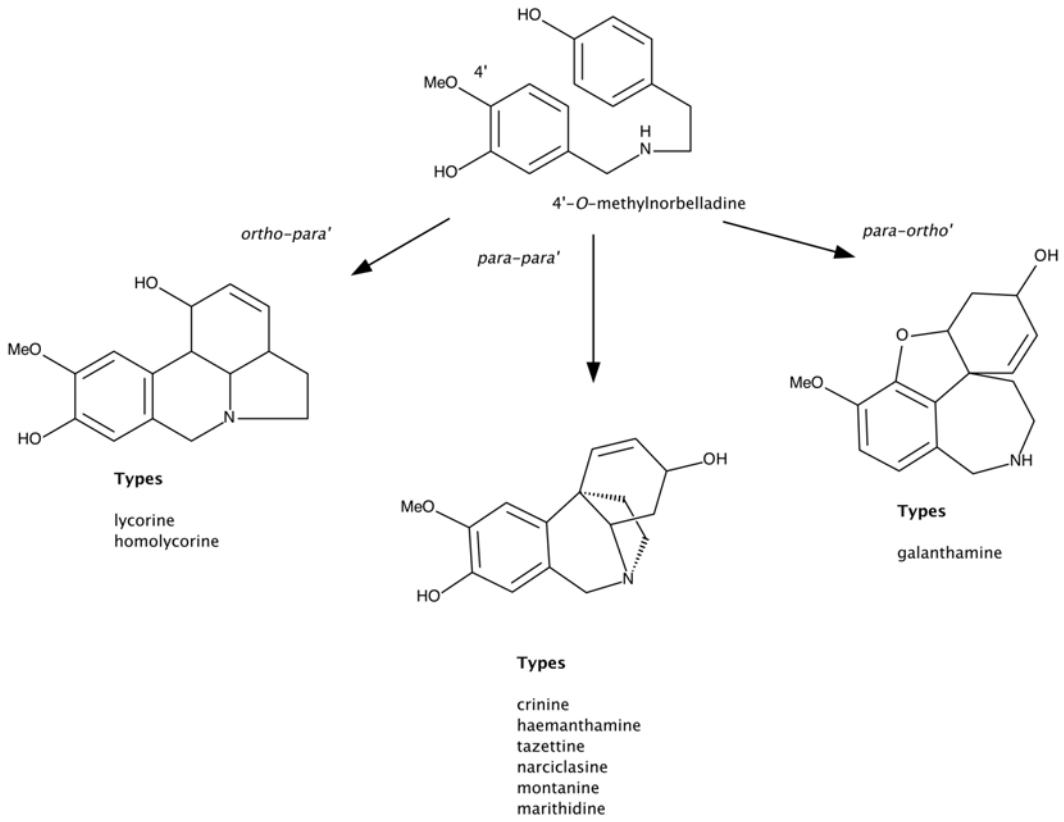


Figure 10 : Couplages oxydatifs des alcaloïdes d'Amaryllidaceae.

2.4.1 Les alcaloïdes type galanthamine

Le couplage oxydatif *para-ortho'* donne lieu à une diénone qui se cyclise spontanément en déméthylnarwedine, qui grâce à une réduction stéréosélective se transforme en déméthylgalanthamine (Figure 11). Ensuite, la galanthamine est directement obtenue par *N*-méthylation de la norgalanthamine. Selon Eichhorn et al.,[36] la narwédine ne serait pas le précurseur direct de la galanthamine. Il existerait un équilibre entre les deux formes, en raison de l'activité réversible d'une oxydoréductase.

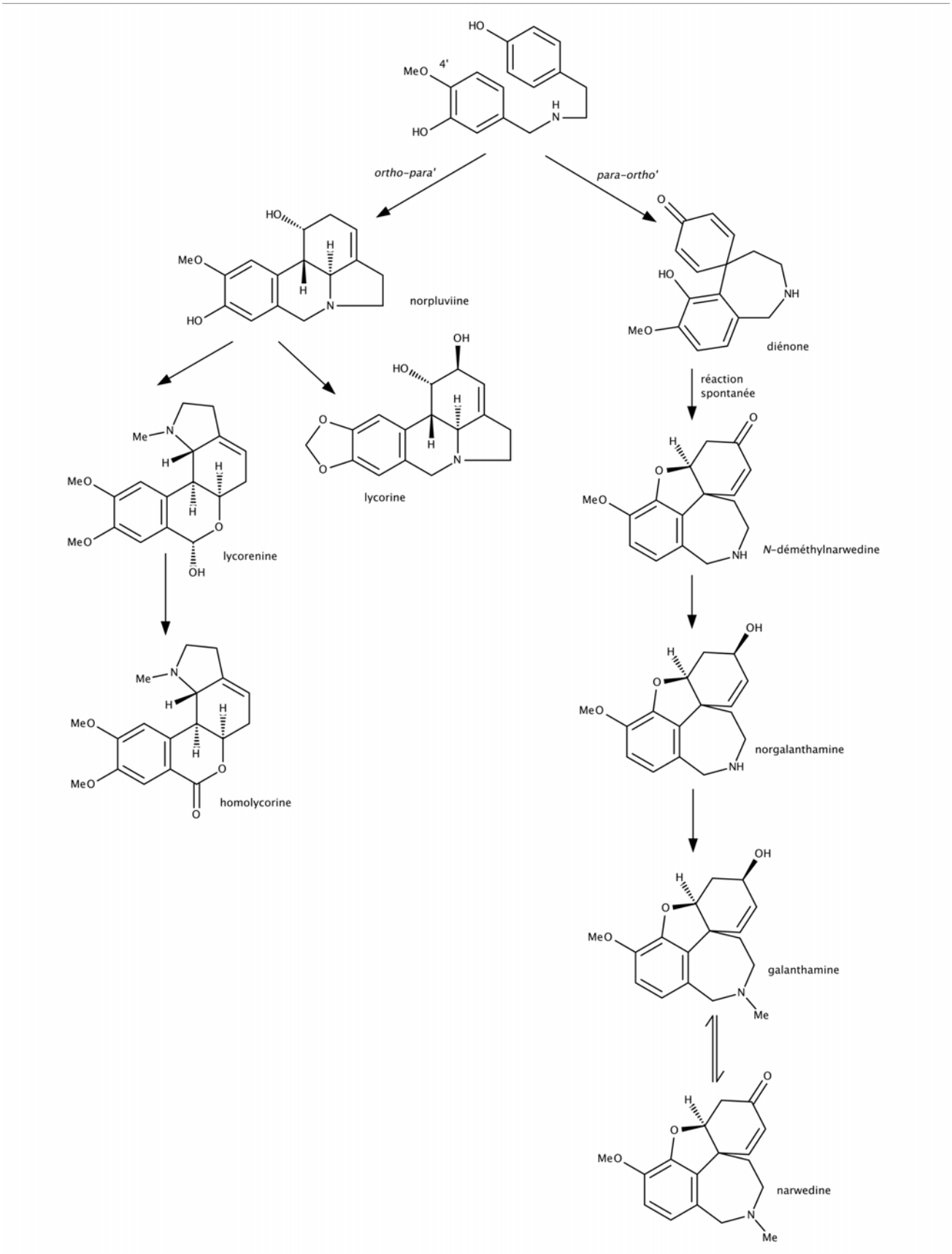


Figure 11 : Voie de biosynthèse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae après les couplages *ortho-para'* et *para-ortho'* de la 4'-*O*-méthylnorbelladine.

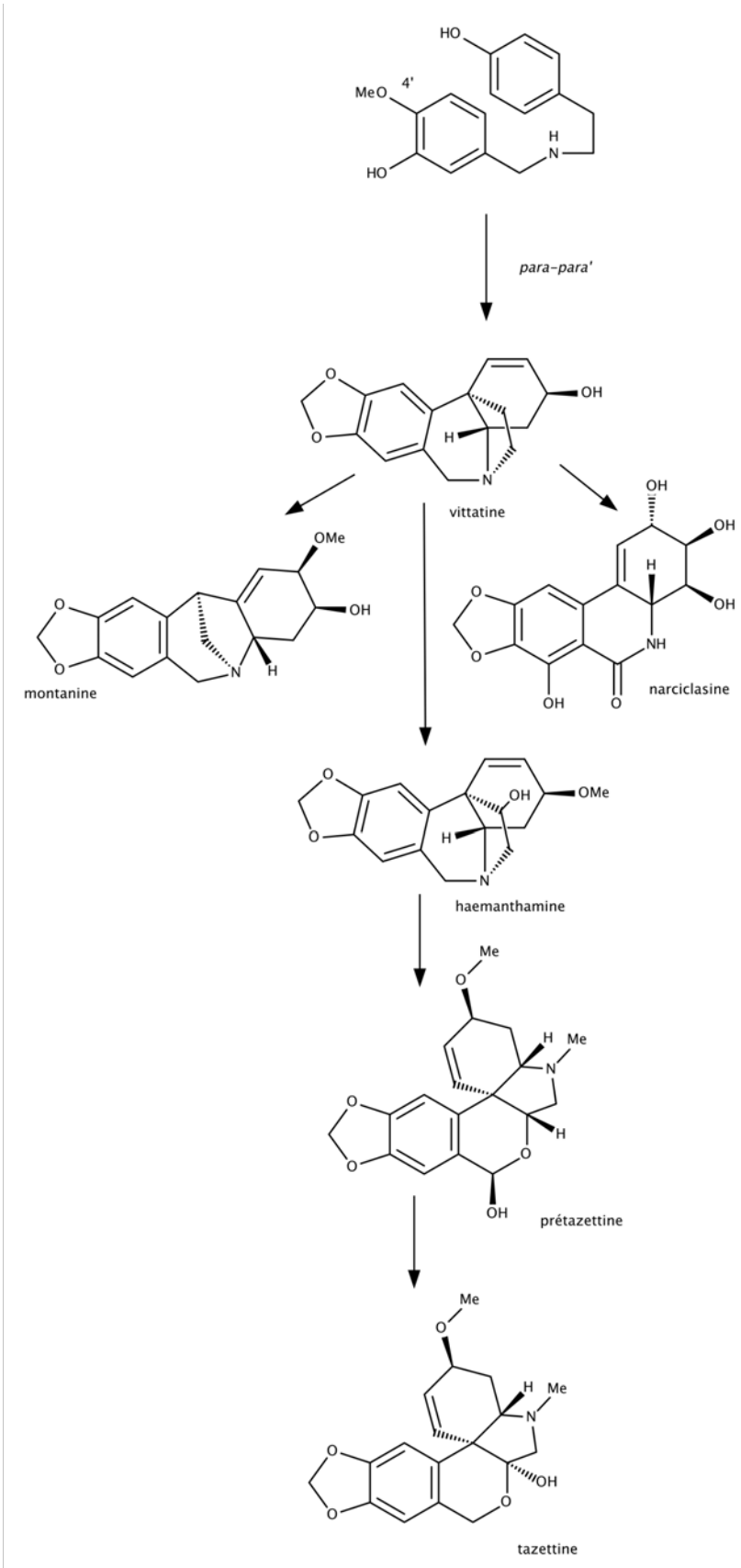


Figure 12 : Voie de biosynthèse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae, après un couplage *para-para'* de la 4'-*O*-méthylnorbelladine.

2.4.2 Les alcaloïdes type lycorine et homolycorine

La norpluviine est le précurseur de la lycorine[37]. En effet, l'hydroxylation en C2 de la norpluviine procède d'un mécanisme impliquant la formation d'un cycle époxyde s'hydrolysant en diol vicinal, les fonctions hydroxy résultantes étant de part et d'autre du plan du cycle[38]. La conversion de la MN en lycorénine se fait *via* la norpluviine. Tout d'abord, l'oxydation du carbone entre le cycle benzénique et l'azote conduit à la formation d'un gem-aminoalcool. L'alcool s'oxyde en aldéhyde, accompagné de la rupture de la liaison C-N, permettant ainsi la rotation du noyau phenyl. La cyclisation, par la réduction du carbonyle de l'aldéhyde et ensuite par l'oxydation du même atome de carbone, conduit à la lycorénine (Figure 11).

2.4.3 Les alcaloïdes type crinine, haemanthamine, tazettine, narciclasine, et montanine

La vittatine est le précurseur de la tazettine, de la montanine et de la narciclasine. Vittatine et crinine sont des énantiomères. La biosynthèse de la tazettine implique l'oxydation de l'haemanthamine en haemanthidine suivi par l'ouverture du cycle pour former le système d'équilibe amino-aldéhyde, qui après formation de l'hémiacétal et la méthylation donne la prétazettine[2]. Les voies de biosynthèse de la montanine et de la narciclasine demeurent inconnues à ce jour.

2.5 Les activités biologiques des alcaloïdes d'Amaryllidaceae

Les remèdes élaborés à partir de plantes de la famille des Amaryllidaceae ont été utilisés depuis des milliers d'années. Durant les trente dernières années, plusieurs alcaloïdes ont été isolés des plantes de cette famille, testés pour différentes activités biologiques et synthétisés par plusieurs chercheurs[34].

Les propriétés pharmacologiques et/ou biologiques des alcaloïdes d'Amaryllidaceae les plus représentatives sont résumées dans cette partie. Jusqu'à nos jours, seule la galanthamine est commercialisée, mais les activités significatives rapportées chez d'autres alcaloïdes de la même famille, pourraient entraîner leur utilisation thérapeutique dans un futur proche[34].

2.5.1 La galanthamine

La galanthamine a été isolée pour la première fois à partir de *Galanthus woronowii* Losinsk[1]. Aujourd'hui, cet alcaloïde est extrait à partir d'autres plantes de la même famille comme, *Narcissus* spp., et *Leucojum* spp., en particulier *L. aestivum*. La galanthamine est un inhibiteur sélectif de l'acétylcholinestérase (AchE), réversible, et compétitif à action prolongée. Cet alcaloïde est communément utilisé pour le traitement palliatif de la maladie d'Alzheimer. Le bromhydrate de galanthamine est commercialisé sous les noms génériques de Réminyl® et Nivalin®. Par ailleurs, la galanthamine agit comme un analeptique doux, et comme hypotenseur. Elle possède aussi une activité analgésique[39].

2.5.1.1 Un peu d'histoire…

La mise au point du médicament à base de bromhydrate de galanthamine a nécessité trois grandes étapes de développement[1] :

Le premier stade de développement a débuté en 1950 par l'indication de la galanthamine pour le traitement de la poliomyélite. Cette indication est le résultat de données prouvant que la galanthamine améliore la transmission nerveuse au niveau des synapses. Elle est disponible dans le commerce en 1954 sous la forme de sel de bromhydrate et sous le nom de Nivalin®. Après quelques années, des chercheurs ont démontré la capacité de la galanthamine à traverser la barrière hémato-encéphalique.

En 1996, le laboratoire allemand Sanochemia Pharmazeutika a obtenu le premier brevet sur un procédé de synthèse de la galanthamine. En 1997, Sanochemia a commencé une collaboration avec Janssen Pharmaceutica, un laboratoire basé en Belgique et Shire Pharmaceuticals Group, une compagnie anglaise. En 2000, la galanthamine est autorisée en France, en Islande, en Irlande, en Suède et au Royaume-Uni. De nos jours, elle est autorisée aux Etats-Unis et plusieurs pays européens et asiatiques[1].

Tableau 1: Les trois stades de développement de la galanthamine au médicament.

Stade 1	Stade de développement initial en Europe de l'Est pour le traitement de la poliomyélite **1950:** Un pharmacognoste russe découvre que les villageois, vivants aux pieds de l'Oural, utilisaient les perce-neige caucasiens sauvages pour traiter la poliomyélite[1]. **1951:** Mashkovsky et Kruglikova-Lvova mettent en évidence les propriétés antiacétylcholinestérasiques de la galanthamine. **1952:** La galanthamine est isolée à partir des bulbes de *G. woronowii*. Sa structure est publiée par Proskurnina et Yakovleva. **1956-1957:** Paskov propose l'extraction de la galanthamine à partir des feuilles de *Galanthus* et de *L. aestivum*. **1960:** La synthèse chimique de la galanthamine est publiée. Son rendement est inférieur à 1%[1].
Stade 2	Développement préclinique dans les années 80 pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.
Stade 3	Développement clinique dans les années 90 et développement d'une synthèse chimique économiquement viable.

2.5.1.2 Mécanisme d'action de la galanthamine dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative progressive associée à des troubles généraux des fonctions mentales supérieures et de la mémoire[40]. Elle conduit à la perte progressive et irréversible des neurones. Les arguments scientifiques qui justifient l'utilisation des inhibiteurs cholinestérasiques pour le traitement de cette maladie, sont basés sur l'hypothèse cholinergique. En effet, la maladie d'Alzheimer est neuropathologiquement caractérisée par la formation de plaques

d'amyloïdes et des enchevêtrements neurofibrillaires avec une dégradation des neurones et des synapses. Au stade initial de la maladie, une dégénération des noyaux mésopontins cholinergiques localisés dans le proencéphale basal, est observée. Un dysfonctionnement au niveau de ce système cholinergique, qui débute dans de larges zones du système limbique et du néocortex, se traduit par une diminution des capacités mentales des patients et par des troubles cognitifs. En termes biochimiques, la maladie d'Alzheimer s'accompagne de la perte disproportionnée des neurones cholinergiques présynaptiques dans le proencéphale basal avec une diminution marquée de l'activité de la choline acétyltransférase, l'enzyme principale de la synthèse de l'acétylcholine (ACh). L'inhibition de l'AChE, qui inhibe la dégradation enzymatique de l'ACh, résulte, par conséquence, en l'augmentation du niveau d'ACh dans le système nerveux central, ce qui allège quelques symptômes de la maladie (Figure 13).

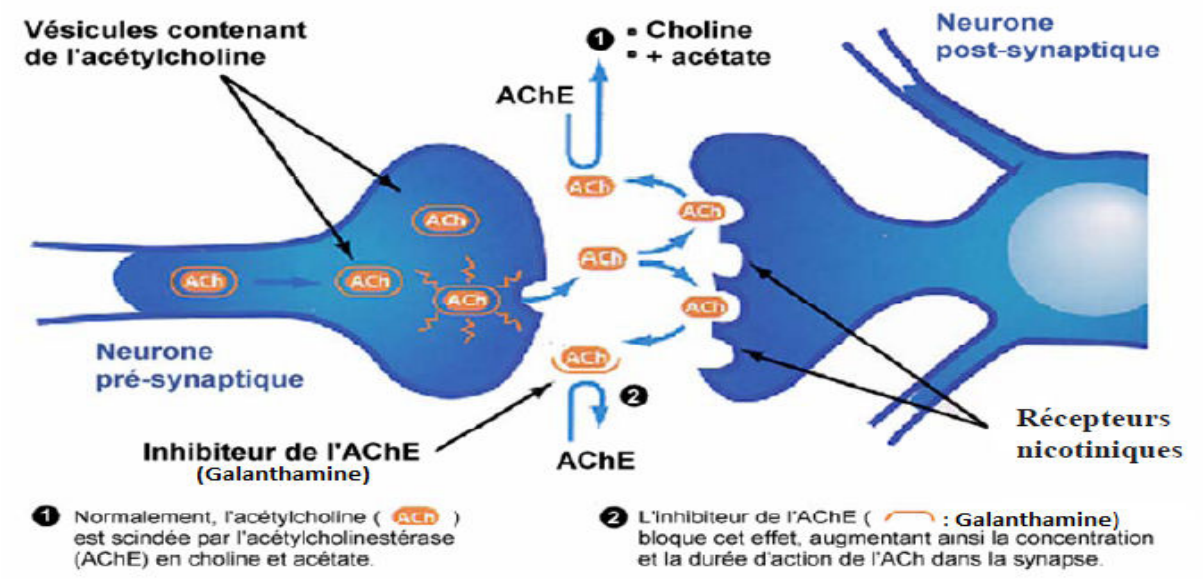


Figure 13 : Mode d'action des anticholinestérasiques (ici la galanthamine) : inhibition de l'acétylcholinestérase augmentant ainsi le taux d'acétylcholine au niveau de la fente synaptique.

De plus, la galanthamine agit comme modulateur allostérique des récepteurs nicotiniques, ce qui stimule à la fois, la libération de l'ACh du neurone présynaptique dans la fente synaptique et la réponse des récepteurs nicotiniques à l'ACh[41]. Grâce à son double mode d'action, associé aux effets secondaires réduits, la galanthamine constitue un composé intéressant pour le traitement palliatif de la maladie d'Alzheimer[42-44]. Outre la galanthamine, le donépézil et la rivastigmine sont aussi utilisés en thérapeutique comme inhibiteurs de l'AchE. La tacrine, premier inhibiteur de

l'AChE commercialisé en 1993, n'est plus utilisée à cause de son hépatotoxicité.

2.5.2 La lycorine

La lycorine est un inhibiteur puissant de la croissance cellulaire, de la division cellulaire et de l'organogenèse chez les plantes supérieures, les algues, et les levures[45-47].

L'activité antitumorale de la lycorine a été démontrée *in vivo* et *in vitro* par l'inhibition de la croissance de diverses cellules tumorales tels le mélanome BL6 chez la souris, le carcinome pulmonaire de Lewis, et les cellules HeLa[48-51]. Le mécanisme moléculaire de la lycorine contre la leucémie (souche humaine HL-60) montre qu'elle peut arrêter la croissance cellulaire et réduire la survie des cellules en saisissant le cycle cellulaire à la phase G2/M et en induisant l'apoptose des cellules tumorales. Des études menées sur les cellules KM3, montrent que la lycorine induit l'apoptose des cellules tumorales via la voie mitochondriale intrinsèque[52].

La lycorine exerce des effets antiviraux sur plusieurs virus à ARN ou ADN[5]. Ces effets ont été observés contre les flavivirus, et à un degré moindre, contre les bunyavirus. Elle possède des activités prononcées contre le poliovirus, le virus coxsackie et herpex type 1[7, 53] et des activités antirétrovirales. La relation entre la structure de la lycorine et son mécanisme d'action a été étudiée avec *Herpex simplex* type 1, suggérant que les alcaloïdes qui peuvent présenter d'éventuelles activités antivirales possèdent un cycle hexahydroindole avec deux groupes hydroxyles fonctionnels[54]. L'activité est due à l'inhibition de la multiplication du virus, et pas à l'inactivation directe des virus extracellulaires. Le mécanisme de l'effet antiviral est partiellement expliqué par le blocage de l'ADN polymérase virale[2].

La lycorine est aussi un analgésique, plus puissant que l'aspirine[2]. En outre, cet alcaloïde possède un effet inhibiteur sur le développement parasitaire (*Encephalitozoon intestinalis*)[6], une activité antifongique contre *Candida albicans*[10, 55] et une activité antimalarique (*Trypanososma brucei*, *Plasmodium falciparum*)[55]. De plus, elle possède des activités anti-inflammatoires et antiplaquettaires[56].

2.5.3 Autres alcaloïdes

Les principales activités biologiques d'autres alcaloïdes d'Amaryllidaceae sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2 : Les activités biologiques de quelques alcaloïdes d'Amaryllidaceae.

Alcaloïdes d'Amaryllidaceae	Activités biologiques
Narciclasine, pseudolycorine, haemanthamine	Activités antiprolifératives des cellules HeLa et Vero, bons inducteurs d'apoptose[57].
Ungérémine, hippeastrine, buphanisine	Inhibiteurs de croissance des cellules HeLa et Vero[57].
Homolycorine, 8-*O*-déméthylhomolycorine, dubiusine, hippeastrine, lycorénine, *O*-méthyllycorénine	Effet cytotoxique sur les fibroblastes LMTP non tumoraux[58]. Inhibiteurs de la croissance *in vivo* et *in vitro* d'une variété de cellules tumorales tels Molt 4 lymphoma, hépatome humaine HepG2, cancer de la prostate LNCaP humain[6, 58, 59].
Dubiusine, lycorénine, 8-*O*-déméthylhomolycorine	Activité de liaison à l'ADN[60]. Effet hypotensif chez la souris[39].
Homolycorine	Antirétroviral[9].
Hippeastrine, buphanisine	Suppresseurs de l'invasion cellulaire *in vitro* à des concentrations atoxiques[57].
Hippeastrine	Activité antivirale contre *Herpex simplex* type 1[54].

	Activité antifongique contre *Candida albicans*[10].
Lycorénine	Vasodilalateur, induit la bradycardie[61]. Possède une activité analgésique[7].
Crinamine, haemanthamine	Puissants inducteurs d'apoptose des cellules tumorales même à des concentrations micromolaires[62].
Vittatine	Activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*[10].
Crinamine	Activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*[63].
Prétazettine[1]	Cytotoxique pour les fibroblastes LMTK, inhibe la croissance des cellules HeLa, efficace contre la leucémie Rauscher au stade avancé, le carcinome d'Ehrlich, la leucémie lymphocytaire spontanée, et le carcinome pulmonaire de Lewis[8, 64].
Pancrastatine	Induit l'apoptose *via* la voie intrinsèque mitochondriale chez les cellules cancéreuses[65].
3,4-*O*-cyclique phosphate de pancrastatine	Retarde la croissance des tumeurs, induit la nécrose tumorale[65].

[1] Quand la prétazettine est stéréochimiquement réarrangée en tazettine, son activité biologique est largement atténuée.

3 La culture *in vitro* et les métabolites secondaires

Comme pour de nombreuses molécules naturelles à haute valeur ajoutée, l'accumulation limitée des alcaloïdes d'Amaryllidaceae dans les plantes restreint leur usage commercial[13]. Dans de nombreux cas, la synthèse chimique n'est pas possible ou n'est pas économiquement rentable. D'où l'obtention de ces composés à haute valeur ajoutée par extraction à partir de plantes de cultures (cultures en champs ou en serre, cultures hydroponiques ou aéroponiques). Il arrive que les plantes de culture dépérissent suite à une contamination par des pathogènes[15]. Dans le cas des Amaryllidaceae, différentes maladies causées par des pathogènes fongiques (*Colletotrichum*, *Fusarium*, *Botrytis*), des pathogènes viraux (virus de la mosaïque) et des pathogènes bactériens (*Serratia plymuthica*, *Stenotrophomonas maltophilia*) sont sources d'importantes pertes agricoles[66, 67]. Les métabolites secondaires ne sont extraits et commercialisés qu'à l'échelle de 1 à 100 kg mais représentent un marché de plus d'un milliard de dollars/an (par exemple le Taxol®). Ces produits sont plutôt vulnérables aux fluctuations du climat et des pathogènes sur les cultures ou encore de la situation politique des pays producteurs[68].

Les sources naturelles suffisent-elles pour la production à grande échelle d'alcaloïdes d'Amaryllidaceae ?

Prenons l'exemple de la galanthamine. Bien que sa synthèse chimique soit bien établie, une grande quantité de la galanthamine mise sur le marché provient de l'extraction de plantes cultivées, en particulier de diverses espèces de *Leucojum* et de *Narcissus*[69]. En effet, la galanthamine renferme 3 carbones asymétriques et le respect de la configuration de ces 3 centres d'asymétrie, rend la synthèse chimique complexe, coûteuse et peu rentable (R<4%). Les plantes de *L. aestivum* utilisées comme source de matière première renferme de la galanthamine à un taux moyen de 0.1% de matière sèche (MS). Sachant que la dose journalière de galanthamine prescrite varie de 30 à 50 mg en fonction du poids du patient, pour le traitement d'un million de patients, il faut 50 kg de galanthamine/jour soit 18000 kg /an. Ces besoins en galanthamine nécessitent la manipulation de 18 000 tonnes de bulbes/an[70]. Notons aussi que 24 millions de personnes souffraient de la maladie d'Alzheimer en 2001, et que ce nombre ne cesse d'augmenter en raison de l'augmentation de l'espérence de vie[71].

La production de métabolites secondaires par les plantes ne peut pas, à elle seule, pallier aux besoins sans cesse grandissants de l'industrie pharmaceutique. Les scientifiques doivent donc trouver une solution alternative pour obtenir ces composés à une échelle commerciale économiquement viable. Les cultures *in vitro*, représentent une alternative intéressante et attractive. Elles permettent de contrôler de nombreux paramètres contrairement à la culture en champs ou en serre. Les études du métabolisme secondaire des plantes deviennent facilitées et la mise au point de procédés industriels en bioréacteurs visant de hauts rendements en métabolites secondaires devient possible.

La culture *in vitro* a été appliquée avec succès pour produire la shikonine, le seul métabolite commercialisé produit par des cultures cellulaires de *Lithospermum erythrorhizon*[68] et aussi pour produire le paclitaxel à partir de *Taxus baccata*. Cette méthode a connu d'autres succès avec la production de saponosides à partir de cellules de *Panax ginseng*[15], de la berbérine à partir des cultures de *Coptis japonica*, de la sanguinarine à partir de cellules de *Papaver somniferum*[16], etc.

3.1 Principe de la culture *in vitro*

La possibilité d'isoler une cellule ou un tissu hors de l'organisme tout en leur permettant de conserver leur capacité de croissance et de différentiation est devenue, au XXème siècle, un fait d'expérience. On appelle techniques *in vitro*, un ensemble de méthodes faisant intervenir, d'une part, des éléments d'aseptie et, d'autre part, la mise en place d'un environnement parfaitement contrôlé (milieux définis en particulier). Ces méthodes s'appliquent tout autant à des plantes entières qu'à des fragments de plantes et aussi à des cellules plus ou moins isolées[72].

La culture *in vitro* a été initialement introduite en 1902 par l'allemand G. Haberlandt qui est parvenu à maintenir des amas cellulaires en vie mais sans multiplication cellulaire. En 1922, l'américain W. J. Roblins et l'allemand W. Kott débutèrent, pour la première fois, la culture *in vitro* de tissus végétaux. Ils ont réussi à les maintenir en vie et à obtenir des fragments de quelques centimètres à partir de fragments de quelques millimètres. Dans les années qui ont suivies, la culture *in vitro* a connu des progrès spectaculaires.

Il est important de noter que les cellules végétales possèdent une propriété que les cellules animales ne possèdent pas: la totipotence. La totipotence est considérée comme le fil conducteur de la naissance des biotechnologies végétales. Découverte par Haberlandt en 1902, la totipotence est la propriété qu'ont les cellules végétales de pouvoir régénérer une plante entière lorsqu'elles sont placées dans des conditions appropriées, en passant éventuellement par une étape de dédifférenciation.

3.2 La microprogation des tissus végétaux

Chez les végétaux, l'organogenèse est assurée par les méristèmes constitués de massifs de cellules non différenciées qui conservent la capacité de se diviser activement. Ce sont des cellules totipotentes qui édifient tous les organes (végétatifs et reproducteurs) ainsi que les tissus de soutien de la plante. Ces cellules subissent une différenciation dans le cadre d'une organogenèse. A l'inverse, les tissus spécialisés subissent une dédifférenciation pour produire de nouveaux massifs méristématiques. En pratique, pour l'établissement des cultures *in vitro*, les tissus méristématiques (ou les tissus différenciés) sont prélevés, après une étape de décontamination (et de dédifférenciation). Ils sont cultivés dans des conditions aseptiques sur des milieux synthétiques renfermant des régulateurs de croissance. Ces cellules peuvent, soit se développer d'une manière anarchique en formant des amas indifférenciés appelés cals, soit se développer en plantules viables par voie d'organogenèse directe. Les cals peuvent régénérer des tissus différenciés par voie d'organogenèse indirecte (Figure 14).

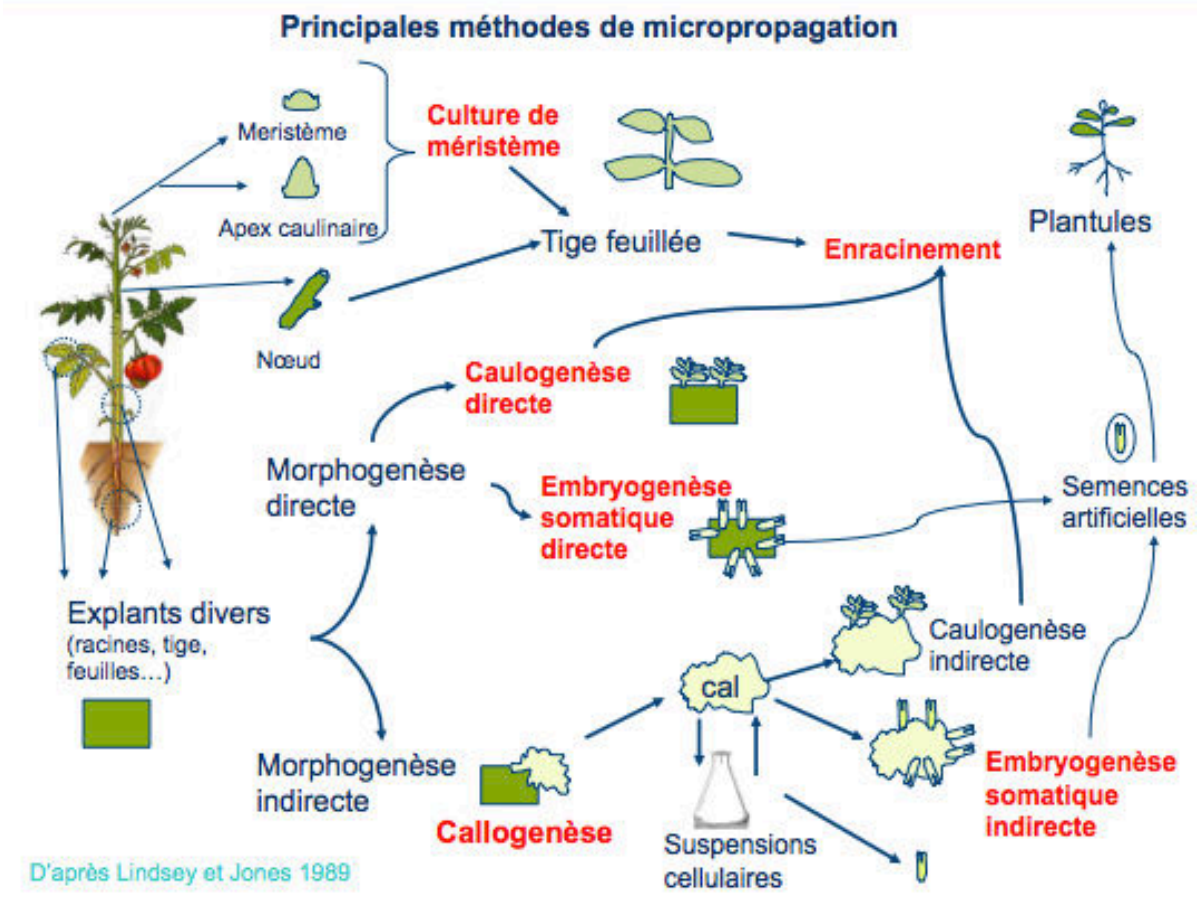


Figure 14 : Différentes méthodes de micropropagation de tissus végétaux *in vitro*[73].

3.3 Intérêts des cultures *in vitro* en phytochimie

La culture *in vitro* a rendu possible la multiplication d'espèces chez lesquelles les semences sont rares. Elle est utilisée pour une multiplication en masse des plantes génétiquement identiques. Nécessitant relativement peu d'espace et à coût réduit, elle peut être programmée indépendamment des saisons[72]. Cette technique permet aussi la conservation du matériel génétique *in vitro* sur un espace réduit, l'obtention d'hybrides entre espèces incompatibles et l'obtention de plants haploïdes, d'où la possibilité par doublement chromosomique, d'une production de lignées pures homozygotes ou par mutagenèse, de la récupération de mutations récessives. Dans des conditions *in vitro*, on pourra produire des métabolites secondaires[15]. La production de ces molécules peut être intensifiée sachant que les procédés de biosynthèses sont strictement contrôlés et optimisés[74]. La culture *in vitro* permet aux plantes d'accumuler des alcaloïdes non synthétisés *in vivo*. Les plantes sont également une source d'enzymes qui peuvent être utilisées dans la voie chimique de synthèse rendant celle-ci

moins compliquée. Les gènes codant pour ces enzymes peuvent être clonés et surexprimés dans des microorganismes afin de les traduire en quantités suffisantes pour faire la bioconversion des précurseurs en alcaloïdes biologiquement actifs.

3.4 Les facteurs influençant le métabolisme secondaire des Amaryllidaceae *in vitro*

La production *in vitro* de métabolites secondaires est une alternative attractive. Cependant l'accroissement d'échelle, afin d'aboutir à une industrialisation du procédé de bioproduction, est souvent gêné par la faible capacité biosynthétique et qui s'amenuise à long terme. Ainsi, l'élucidation de facteurs assurant une biosynthèse stable des alcaloïdes est essentielle pour l'établissement de cultures *in vitro*, en vue de produire des quantités importantes de galanthamine et aussi d'autres alcaloïdes à intérêt biologique.

3.4.1 Les facteurs biologiques

3.4.1.1 Le dépistage et la sélection des "meilleurs" individus

Les premiers efforts, dans le but d'améliorer la productivité des cultures *in vitro*, étaient dirigés vers le dépistage et la sélection des meilleurs individus producteurs d'alcaloïdes[68]. Le problème, avec cette approche, est que les individus sélectionnés sont le plus souvent instables. D'après les études de Stanilova et al. menés en 2010[3], deux facteurs cruciaux pourraient expliquer ce phénomène : le cycle physiologique de la plante et son génotype. Même après huit ans, le cycle physiologique de la plante *in situ* a une influence non négligeable *in vitro* sur le taux de propagation des cultures et sur la dynamique de l'accumulation des alcaloïdes[3, 75]. Le génotype définit la capacité des cultures *in vitro* et *in vivo* à produire les alcaloïdes[3]. La biosynthèse intensifiée d'un alcaloïde par rapport à l'autre ainsi que la localisation des alcaloïdes et leur accumulation dans les organes de la plante sont déterminés génétiquement. En revanche, leur teneur dans les tissus est influencée par les conditions environnementales : la température, la photopériode, la composition du milieu de culture, etc.

3.4.1.2 Le degré de différenciation des cellules et types de tissus

Les suspensions cellulaires de plantes médicinales ont été considérées idéales pour la production *in vitro* et à grande échelle des métabolites secondaires intéressants. Ces cultures se développent plus rapidement que les tissus ou les organes et leur manipulation est beaucoup plus facile[76]. Cependant, les rendements en métabolites recherchés sont très faibles, voire même non détectables[11]. En fait, la capacité de biosynthèse diminuerait avec la dédifférenciation des tissus et se perd avec les suspensions cellulaires[17]. Les expériences réalisées avec les suspensions cellulaires de *L. aestivum* en sont la preuve (teneur en galanthamine d'environ 0.014 mg/g de MS dans les cals, V/S 0.1 mg/g de MS dans les bulbilles)[3]. Par définition, le métabolisme secondaire est une forme de différenciation. D'où l'approche logique de culture de tissus différenciés *in vitro* : bulbilles, plantules, et racines[68]. En effet, ces cultures produisent souvent les mêmes alcaloïdes que les plantes entières et avec une optimisation du milieu de culture, des taux plus élevés de galanthamine peuvent être obtenus.

Il est à noter également que la concentration en alcaloïdes diffère entre bulbes, feuilles et racines *in vivo* comme *in vitro*. Ce qui détermine la capacité biosynthétique des différents organes *in vitro*. Les bulbes *in vivo* seraient plus riches en alcaloïdes que les feuilles durant toute l'année sauf durant la période allant de début mars jusqu'à la mi-avril[3]. Les racines, quant à elle, n'en produisent pas. Une approche, qui a particulièrement soulevé beaucoup d'intérêt, est celle de la transformation des plantes par *Agrobacterium rhizogenes*[68]. Ces bactéries telluriques sont capables d'infecter les cellules de la plante et provoquer l'apparition d'un chevelu racinaire au point d'infection par la bactérie. Diop et al.,[14] ont réussi à obtenir un chevelu racinaire de *L. aestivum* en infectant des feuilles et des racines isolées à partir de bulbilles par *A. rhizogenes*. Cependant, ces racines transgéniques ne produisaient pas de la galanthamine.

3.4.2 Les facteurs chimiques

3.4.2.1 Influence des constituants de base du milieu de culture

En 1962, Murashige et Skoog[77] ont mis au point un milieu de culture standard adapté à la culture *in vitro* des plantes. Il est constitué de

macroéléments (NH_4NO_3, KNO_3, $MgSO_4$, KH_2PO_4), microéléments (H_3BO_4, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, Na_2MoO_4, $CuSO_4$, $CaCl_2$), vitamines (inositol, acide nicotinique, pyridoxine, thiamine), fer chélaté, iodure de potassium, et de saccharose. Le milieu peut être liquide ou solidifié par l'ajout d'agar. Beaucoup de travaux rapportés dans la littérature visent l'optimisation de ce milieu de base en modifiant les différents nutriments afin d'améliorer non seulement la prolifération des cultures mais aussi la synthèse des alcaloïdes[18].

Georgiev et al.[18] ont réalisé un plan d'expérience en faisant varier les concentrations de NH_4^+, NO_3^-, KH_2PO_4 et de saccharose dans le milieu de culture MS de bulbilles de *L. aestivum*. Ils ont conclu que le taux de saccharose ainsi que le rapport C/N influencent la biosynthèse de la galanthamine. Ils ont élaboré ainsi un milieu MS modifié permettant une meilleure production de la biomasse et de la galanthamine.

Le saccharose est la source de carbone la plus utilisée dans les milieux de culture de cellules et de tissus végétaux[78]. Merillon et al.[79] ont démontré que le taux de saccharose pourrait influencer le métabolisme secondaire. Plusieurs travaux menés sur différentes espèces d'Amaryllidaceae cultivées en milieu liquide et démontrant l'influence du taux de saccharose ont été rapportés. Selon Georgiev et al.,[18] 60 g de saccharose/L de milieu de culture entraîneraient une meilleure accumulation de galanthamine dans les bulbilles de *L. aestivum*. Et d'après les travaux de l'équipe de Sellès[80], 60 , 90 et 180 g de saccharose/L de milieu ont conduit à la meilleure accumulation de galanthamine dans les bulbilles de *N. confusus*. La concentration de saccharose affecte aussi la morphologie des cultures ainsi que leur activité photosynthétique[81]. Par exemple, les cultures de *N. confusus* sur un milieu pauvre en saccharose (<9% g/V) sont de couleur vert foncé et présentent un feuillage de 5 à 6 cm de long. Tandis que les cultures menées sur un milieu riche en saccharose sont de couleur verte pâle avec une tendance à la vitrification, au développement de tâches nécrotiques et à une élongation lente des tiges. Des taux élevés de saccharose constituent un facteur de stress pour les cultures entraînant la variation de la pression osmotique du milieu[80].

3.4.2.2 Influence des régulateurs de croissance

Chez les végétaux, les processus de croissance et de développement sont contrôlés par des substances synthétisées par le végétal et efficaces à de très faibles doses. Il existe trois grandes classes de régulateurs de croissance (ou encore appelés phytorégulateurs) : les auxines, les gibbérellines et les cytokinines[72]. Ces phytorégulateurs interviennent beaucoup dans la culture *in vitro*, soit directement, soit et surtout par leurs dérivés synthétiques qui ont une activité physiologique similaire. Les auxines, agissent sur l'élongation cellulaire et exercent une activité rhizogène. Parmis les auxines le plus souvent employées, citons l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), l'acide 1-naphtalène acétique (ANA), et le picloram[72]. Les cytokinines favorisent le développement des bourgeons. Les plus utilisées sont la zéatine, la kinétine, la méta-topoline, le thidiazuron, et la 6-benzylaminopurine (BAP)[72]. Le tableau 3 résume l'effet synergique de deux facteurs : ajout du saccharose et des régulateurs de croissance sur plusieurs paramètres de la culture *in vitro* de quelques espèces d'Amaryllidaceae.

Les physiologistes ajoutent aussi souvent l'acide abscissique et l'éthylène à la famille des phytorégulateurs[72]. Le rôle physiologique de l'éthylène dans la plante n'est pas élucidé. Par contre, dans les cultures *in vitro*, il influence la formation des embryons somatiques, la morphogenèse (induction des racines et tiges) et le métabolisme secondaire[82]. L'accumulation de l'éthylène *in vitro* peut être contrôlée par l'ajout de précurseur d'éthylène (acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique, ACC), ou d'inhibiteurs d'éthylène ($AgNO_3$, thiosulfate d'argent STS, $CoCl_2$) ou encore d'absorbants d'éthylène ($KMnO_4$)[83]. Une étude menée par Ptak et al.,[82] sur des cals et des embryons somatiques de *L. aestivum*, a montré que la croissance des cals était maximale en présence de 4,5 g de $KMnO_4$. La présence de 10 µM d'$AgNO_3$ était aussi favorable. L'ajout de 10 µM d'ACC a diminué la croissance des cals d'un facteur de 1,2 par rapport au témoin. Par contre, l'ACC était favorable pour la formation des embryons somatiques. L'accumulation de la galanthamine et la diversité des alcaloïdes dans les cals étaient maximales en présence du $KMnO_4$ et du STS (10 µM). Par contre, la biosynthèse de la galanthamine par les embryons somatiques était maximale en présence de 10 µM d'ACC[82].

Tableau 3 : Effet synergique de deux facteurs : ajout du saccharose et de phytorégulateurs sur différents paramètres de la culture *in vitro* de plantes de la famille des Amaryllidaceae.

	Meilleur taux de:				
	Embryogenèse	Organogenèse	Callogenèse	Meilleure accumulation de galanthamine	Plus grande diversité d'alcaloïdes
Narcissus sp.	30 g/L de saccharose 5 à 10 µM 2,4-D[84]	—	—	—	—
N. confusus	—	180 g/L de saccharose 4,52 µM 2,4-D et 22,2 µM BAP[80]	—	—	—
N. pseudonarcissus	—	30 g/L de saccharose 5 µM BAP et 12 µM 2,4-D[78]	30 g/Lde saccharose 4 µM BAP et 10 µM 2,4-D[78]	30 ou 120 g/L de saccharose 10 µM 2,4-D et 10 µM BAP[78]	30 g/L de saccharose 10 µM ANA et 10 µM BAP[12]
L. aestivum	30 g/L de saccharose 5 µM BA et 0,5 µM ANA[85]	30 g/L de saccharose 10 µM ANA et 0.5 µM BAP[86]	30 g/L de saccharose 25 µM 2,4-D et 5 ou 10 µM piclorame[86]	60 g/L de saccharose 10 µM ANA et 5 ou 10 µM BAP[12]	30 g/L de saccharose 10 µM 2,4-D et 10 µM BAP[78]
	30 g/L de saccharose 25 µM piclorame et 0,5 µM BAP[87]				
	30 g/L de saccharose 10 µM 2,4-D et 10 µM BA[86]		30 g/L de saccharose 10 µM piclorame et 0,5 µM BA[85]	30 g/L de saccharose 50 µM 2,4-D et 0,5 µM BA[88]	
	30g/L de saccharose 50 µM 2,4-D et 0,5 µM BA[88] 30g/L de saccharose et 5µM thidiazuron[89]			30 g/L de saccharose 5 µM thidiazuron[89]	
G. elwesii	—	—	—	60 et 90 g/L de saccharose 10 µM 2,4-D et 10 µM BAP[78]	60 g/L de saccharose 10 µM ANA et 10 µM BAP[12]
P. maritimum	—	30 g/L de saccharose 1,15 mg/L ANA et 2 mg/L BAP[90]	30 g/L de saccharose 1 ou 4 mg/L 2,4-D et 2 mg/L BAP[90]	—	—

3.4.2.3 Influence des éliciteurs de la voie de biosynthèse des alcaloïdes

L'élicitation désigne l'action de mimer l'attaque d'un pathogène sur une cellule de plante. Bien que la plupart des éliciteurs utilisés soient d'origine

microbiologique, quelques sels minéraux et composés organiques sont considérés comme tel[20]. Le méthyljasmonate (MeJa) est l'éliciteur le plus souvent employé. Le nom dérive du jasmin dont le composant principal de l'huile essentielle est le MeJa. Il améliore la production d'alcaloïdes, notamment la galanthamine chez *N. confusus* et *Lycoris chinensis*[91, 92]. Chez *L. aestivum*, plusieurs éliciteurs ont été testés : le sulfate de cuivre, le nitrate d'argent, l'acide salicylique et le MeJa[20]. D'après les travaux de El Tahchy[12], le MeJa (150 µM après 10 heures d'incubation) augmenterait non seulement la biosynthèse de la galanthamine chez les bulbilles et les cals de *L. aestivum* mais aussi son relargage dans le milieu de culture. L'équipe de Schumann est arrivée à la même conclusion avec une plus grande quantité de galanthamine produite et relarguée (deux semaines de culture en présence de 25 µM de MeJa)[20].

Il est connu que le MeJa et l'acide jasmonique induisent les gènes codant pour des enzymes du métabolisme secondaire[93]. Ivanov et al.,[94] ont rapporté les effets du MeJa et de l'acide jasmonique sur les activités de la phénylalanine ammonia-lyase et de la tyrosine décarboxylase. Ces deux enzymes sont impliquées dans la voie de biosynthèse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae et conduisent respectivement à l'acide cinnamique et à la tyramine, les précurseurs de la méthylnorbelladine (MN). L'acide jasmonique ajouté au milieu liquide de bulbilles de *L. aestivum* durant leur phase exponentielle de croissance améliorerait la production de galanthamine en stimulant la tyrosine décarboxylase[94]. Quant au MeJa, il provoquerait l'accumulation des acides phénoliques en induisant principalement l'activité de la phénylalanine ammonia-lyase[94].

3.4.2.4 Influence des précurseurs de la voie de biosynthèse

L'utilisation d'un précurseur de la voie de biosynthèse a pour objectif de forcer la voie de biosynthèse en augmentant le flux global des précurseurs vers la molécule recherchée[12]. Cet aspect a été étudié par El Tahchy en ajoutant la 4'-*O*-méthylnorbelladine (MN) deutérée dans le milieu de culture liquide de cals et de bulbilles de *L. aestivum*[12, 21, 95]. Des études antérieures sont rapportées dans la littérature où d'autres précurseurs (caranine, tyrosine et phénylalanine) marqués au ^{14}C ou au $^{3}H_3C$ ont été utilisés à la place de la MN deutérée pour l'étude de la voie de biosynthèse chez *N. pseudonarcissus*[96] et *L. aestivum*[36]. Le marquage au deutérium présente plusieurs avantages, il est couramment et simplement utilisé comme traceur

isotopique stable et non radioactif. Sa présence peut être révélée par les méthodes de spectrométrie de masse. La MN deutérée, ajoutée dans le milieu de culture de bulbilles de *L. aestivum*, a été incorporée dans la voie de biosynthèse et métabolisée en trois types d'alcaloïdes d'Amaryllidaceae deutérés : galanthamine, lycorine, crinine, *N*-déméthylnarwedine, déméthylgalanthamine, narwedine, *N*-formylgalanthamine, anhydrolycorine, trisphaeridine et déméthylmaritidine[95]. L'ajout du précurseur deutéré a surtout influencé la production d'alcaloïdes natifs par les bulbilles. La voie de biosynthèse de la galanthamine et celle de la lycorine ont été intensifiées. La concentration maximale de galanthamine (0,5 mg/g de MS v/s 0,01 mg/g de MS dans les échantillons témoins cultivés en l'absence de précurseur) et la concentration maximale de lycorine (0,2 mg/g MS v/s 0,04 mg/g MS dans les témoins) ont été obtenues après 15 jours de culture en présence de 0,10 g/L de précurseur dans le milieu de culture[78].

3.4.3 Les facteurs physiques

3.4.3.1 La lumière

La lumière a un effet positif sur la croissance des cultures *in vitro* et sur la production de métabolites secondaires[97]. Dans les cultures de tissus différenciés, la lumière transforme le métabolisme cellulaire hétérotrophe en un métabolisme mixotrophe. Elle stimule aussi la biosynthèse des acides aminés qui renferment un phénol (phénylalanine et tyrosine, les précurseurs directs des alcaloïdes) en induisant les enzymes de la voie métabolique du shikimate[98]. Des études comparatives menées sur des bulbilles de *N. confusus* et *L. aestivum* cultivées à la lumière et à l'obscurité ont montré que le taux de croissance des cultures ainsi que la production de galanthamine étaient plus importants à la lumière qu'à l'obscurité (73,3 µg/g MS v/s 38,5 µg/g MS)[99].

3.4.3.2 Mileux solides v/s milieux liquides

Les nutriments ainsi que les régulateurs de croissance sont mieux puisés par les tissus végétaux en milieu liquide que sur un milieu solide. C'est pour cela d'ailleurs que le taux de croissance des cultures *in vitro* en milieu liquide est plus important qu'en milieu solide et que l'utilisation du milieu liquide est considérée idéale pour l'augmentation de la biomasse. Cependant, le principal inconvénient des cultures liquides est le taux élevé d'anomalies

physiologiques et la perte du matériel due à l'asphyxie ou à l'hyperhydricité[100]. L'asphyxie et l'hyperhydricité sont des conditions phyiologiques indésirables causées par la faible teneur en oxygène et le potentiel hydrique du milieu de culture[101, 102]. De plus, en milieu liquide et en présence d'une concentration élevée en cytokinines, les tissus végétaux sont très susceptibles à la vitrification[89]. Cependant, le milieu solide présente un support aux tissus végétaux et, par la suite, conduit à une meilleure micropropagation avec un taux d'anomalies moins élevé. Le métabolisme secondaire est aussi affecté par ce facteur. En milieu liquide la production d'alcaloïdes ainsi que leur relargage dans le milieu de culture sont plus importants[100].

3.4.3.3 Les cultures à grande échelle: différents systèmes de bioréacteurs

Les cultures de cellules et de tissus végétaux sont considérées comme un outil puissant de propagation de cultures commercialement importantes et de production de métabolites secondaires à haute valeur ajoutée. La culture à grande échelle de tissus végétaux différenciés (embryons somatiques, plantules, bulbilles, racines) et de tissus dédifférenciés (suspensions cellulaires et cals) peut être réalisée *in vitro* dans des milieux liquides, sous des conditions environnementales contrôlées dans des systèmes de bioréacteurs[100]. Le concept de base de cette approche est d'atteindre une production durable et économiquement viable de quantités maximales de biomasse végétale utilisées soit pour la propagation végétative ou encore pour l'extraction de métabolites intéressants[100].

Les bioréacteurs sont conçus pour la culture intensive en régulant plusieurs facteurs[103]. Ils sont généralement constitués d'un récipient de culture et d'un système de contrôle automatisé ou semi automatisé. Le récipient de culture est conçu de manière à accueillir les cellules et les maintenir dans un environnement aseptique afin d'assurer leur croissance maximale tout en leur fournissant un microenvironnement optimale, les nutriments et les transferts de gaz nécessaires[100]. Les conditions de culture (agitation, température, les concentrations en oxygène dissout et en dioxyde de carbone, la photopériode, le pH, la composition gazeuse et le niveau du milieu de culture) sont contrôlées[100]. Selon la nature de l'environnement dans le récipient de culture, les bioréacteurs peuvent être classés en 4 types : les bioréacteurs en phase liquide, les bioréacteurs en phase gazeuse[104, 105], les bioréacteurs à immersion temporaire et les bioréacteurs hybrides[106-108].

Dans les bioréacteurs en phase liquide, les cultures sont complètement immergées et en continu dans le milieu de culture liquide. C'est le cas des cultures « traditionnelles » en Erlenmeyer. Ce type de bioréacteurs (y compris les bioréacteurs à agitation mécanique, pneumatique, hydraulique ou encore les bioréacteurs à membrane) est le plus étudié, révélant un potentiel illimité pour les cultures de tissus non différenciés[109]. Par contre, il ne convient pas aux tissus différenciés pour les mêmes raisons que celles évoquées dans le paragraphe précédent : malformations, asphyxie et hyperhydricité[101]. La morphologie complexe des tissus différenciés et des organes requiert des bioréacteurs capables de préserver l'intégrité physiologique des cultures. C'est ainsi que les 3 autres types de bioréacteurs furent créés[100]. Nous décrirons dans la suite les bioréacteurs à immersion temporaire puisque c'est le type de bioréacteur le plus utilisé pour la culture des bulbilles d'Amaryllidaceae.

3.4.3.3.1 Les récipients à immersion temporaire (RITA®): description et principe de fonctionnement

Les bioréacteurs RITA® (récipient à immersion temporaire automatique, CIRAD, France, distribués par VITROPIC, France) ont été conçus pour les cultures *in vitro* intensives de plantes. Le système se compose d'un récipient unique autoclavable en polypropylène (500 mL) avec deux compartiments, séparés par un support en maille où seront placés les tissus végétaux, et un tuyau en plastique monté au centre. Le récipient est fermé par un large couvercle à vis, qui porte sur sa partie supérieure un orifice externe central et un autre latéral. Les deux orifices sont protégés par des filtres à membrane. Le port central est connecté à une pompe commandée par une horloge à minuterie et une électrovanne à trois voies. Le compartiment supérieur est la chambre de culture tandis que le compartiment inférieur est le réservoir du milieu de culture. Les tissus cultivés sont périodiquement immergés dans le milieu de culture puis exposés à un environnement gazeux[110](Figure 15).

Généralement, la période d'immersion est courte (quelques minutes), alors que la période d'exposition à l'air est longue (plusieurs heures). La fréquence d'immersion réduit considérablement l'hyperhydricité et l'asphyxie des tissus en créant des conditions optimales d'humidité, d'apport en nutriments, de transfert de gaz et surtout d'oxygène avec un minimum de contact avec le milieu[111, 112]. En outre, ce système à immersion pneumatique

et non mécanique assure des contraintes de cisaillement minimales préservant l'intégrité des cultures et améliorant la morphologie et la physiologie des organes[100]. Ces bioréacteurs en plastique transparent permettent l'utilisation de sources de lumière externes pour assurer la photopériode.

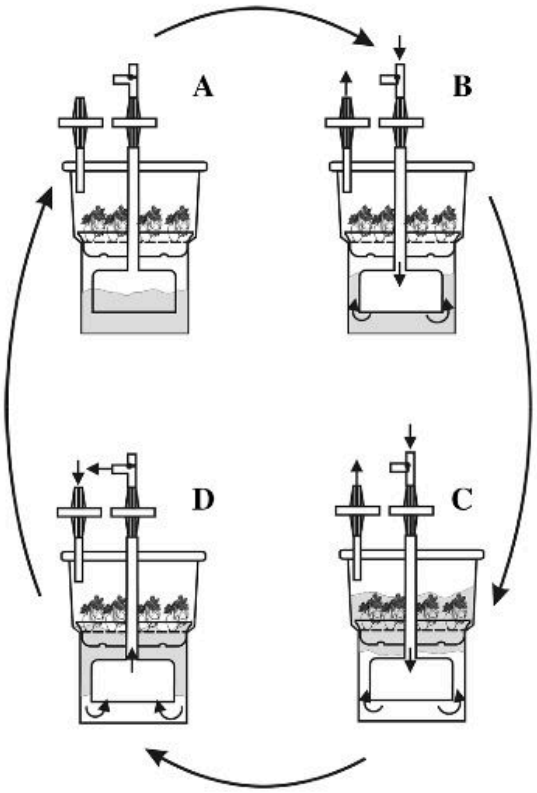


Figure 15 : Conception technologique et principe de fonctionnement du système RITA : (A) période d'exposition, (B) dislocation du milieu de culture liquide. La pression d'air est appliquée sur le compartiment inférieur à travers le tuyau central. Le milieu de culture passe dans le compartiment supérieur, (C) période d'immersion, (D) le flux d'air s'arrête et le milieu de culture revient au compartiment inférieur par gravité[100].

Les avantages du système à immersion temporaire RITA® portent sur le fonctionnement simple et fiable des récipients, leur coût raisonnable, l'espace réduit occupé par l'appareil, l'assurance d'un niveau d'humidité relative adéquat avec une séparation complète des plantules et du milieu de culture. Tous les éléments internes sont connectés et sont manipulés comme une seule pièce facilitant ainsi la manipulation de la biomasse[100]. Les principaux inconvénients du système concernent l'incapacité de renouvellement du milieu nutritif et le manque d'options pour la ventilation forcée ou l'enrichissement en CO_2.

3.4.3.3.2 Les récipients à immersion temporaire (RITA®) dans la micropropagation des Amaryllidaceae et la production d'alcaloïdes

Avec les méthodes de micropropagation manuelle, la main d'œuvre compte pour 40-60 % du prix final des plantes propagées. Les bioréacteurs à immersion temporaire ont été créés dans le but de diminuer la composante du travail et d'augmenter la production en termes de biomasse. Ainsi le coût de production pourrait être réduit. Ptak et al.,[89] ont rapporté que le nombre de plantes de *L. aestivum* régénérées à partir d'embryons somatiques est deux fois plus élevé avec les bioréacteurs RITA® comparativement à une culture sur milieu solide.

La synthèse des métabolites secondaires impliquerait la participation de plusieurs voies de biosynthèse souvent séparées par la compartimentation[100]. C'est pour cela que la culture de tissus et d'organes différenciés est recommandée. Les bioréacteurs RITA® adaptés à ce genre de culture constitue un moyen d'approvisionnement durable de métabolites précieux. Cette technique a été rapportée dans la littérature et appliquée pour la micropropagation des bulbilles de *P. maritimum*[113] et de *L. aestivum*[20, 89, 114-116]. L'effet de l'immersion temporaire sur le profil alcaloïdique des bulbilles de *P. maritimum* a été aussi étudié. Dans les conditions de culture optimales (fréquence d'immersion 15 minutes toutes les 12 heures), les bulbilles ont produit 0.90 mg/g MS d'hémanthamine et 0.79 mg/g MS de lycorine[90]. En outre, il a été démontré que la durée de la période d'exposition avait un effet significatif sur le profil alcaloïdique et sur la quantité d'alcaloïdes relargués dans le milieu[90]. Cependant, l'effet observé semble être spécifique aux cultures de bulbilles de *P. maritimum*. Une autre étude menée sur des bulbilles de *L. aestivum* a démontré que la durée de la période d'immersion n'avait pas un effet significatif sur les quantités de galanthamine intracellulaire et extracellulaire[115]. Par contre, elle avait un effet prononcé sur l'accumulation de la biomasse[115]. De plus amples recherches ont démontré l'effet significatif de la température à laquelle les cultures ont été réalisées sur le profil alcaloïdique des bulbilles de *L. aestivum* en bioréacteurs RITA® [114, 115].

Par ailleurs, la production de métabolites secondaires par les endophytes issus de plantes aromatiques et médicinales pourrait constituer une méthode alternative intéressante. Si l'endophyte produit les mêmes métabolites intéressants que la plante hôte, la culture des plantes pourrait être remplacée par la culture, moins fastidieuse et moins coûteuse, des microorganismes[117]. Ainsi, la production des métabolites rares devient économiquement viable. Le potentiel métabolique des endophytes ainsi que les possibilités de leur exploitation afin de produire une pléthore de nouveaux métabolites secondaires doués d'activités biologiques sont largement étudiés chez différentes familles de plantes. Cet aspect demeure, jusque-là, inconnu chez les Amaryllidaceae.

4 Les endophytes, source de métabolites secondaires

Les organismes vivants sont la source d'une panoplie de métabolites : plus d'un million de métabolites différents. Bien que la plupart de ces composés soient découverts chez les plantes, les microorganismes constituent aussi une source importante avec plus de 20 000 composés biologiquement actifs. Ils influencent la performance et la survie d'autres organismes[23]. Les endophytes offrent une grande variété de métabolites dont des alcaloïdes, des benzopyranones, des flavonoïdes, des acides phénoliques, des quinones, des stéroïdes, des terpenoïdes, des tetralones, des xanthones et d'autres composés[117-120].

4.1 Endophyte: définition

Les tissus végétaux ne sont pas stériles. Les espaces intercellulaires sont habités par différentes espèces de bactéries et de champignons, appelés endophytes (Figure 16). Les endophytes sont des bactéries ou des champignons qui, durant tout ou une partie de leur cycle de vie, envahissent les tissus vivants des plantes. Ils causent des infections inapparentes et asymptomatiques, entièrement à l'intérieur des tissus végétaux, mais ne causent aucun symptôme de maladie[121]. En d'autres termes, ces microorganismes ne sont pas pathogènes pour la plante. L'association entre la plante et l'endophyte est, le plus souvent, mutualiste.

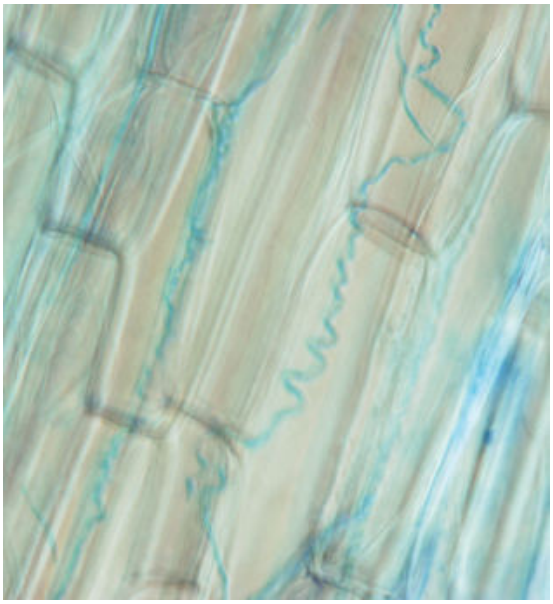


Figure 16 : Champignon endophyte (filaments bleus) vivant dans l'espace intercellulaire chez des plantes[28].

4.2 Origine, évolution et ubiquité des endophytes

La découverte des endophytes remonte à plus de 100 ans. Leur découverte dans des fossiles de tiges et de feuilles est la preuve que les associations plante-microorganisme ont évolué depuis l'apparition des plantes supérieures sur terre. Certains endophytes bactériens seraient originaires de la microflore rhizosphérique et auraient pénétré au niveau des poils absorbants et colonisé les tissus racinaires. Durant la longue coévolution des endophytes et des plantes hôtes, les endophytes se sont adaptés au microenvironnement intertissulaire. Un exemple d'adaptation des bactéries au mode de vie endophyte, est celui des *Pseudomonas*. En comparant le nombre de « genes clusters » codant pour les métabolites secondaires, on remarque que ce nombre est plus important chez les souches de *Pseudomonas* endophytes que celles vivants seules. Les endophytes adaptés à l'environnement de la plante voient leur potentiel métabolique différer de celui de leurs homologues vivants dans le sol. Comme l'environnement riche de la rhizosphère est extrêmement compétitif, et que les microorganismes doivent survivre dans un environnement riche en prédateurs et en compétiteurs, la microflore rhizosphérique produit un arsenal de métabolites antibactériens et anti nématodes. Les endophytes quant à eux, produisent moins de métabolites de défense[122] et plus de métabolites impliqués dans l'interaction endophyte-plante hôte. Cependant, de nombreux endophytes sont des coloniseurs faculatifs des plantes et

doivent survivre à la rhizosphère avant de coloniser la plante. Ils sont équipés des deux types de métabolites[123].

Il est à noter que chaque plante, parmi les 300 000 espèces de plantes existantes, est l'hôte d'un ou de plusieurs endophytes (Figure 17)[22]. Les bactéries endophytes ont été isolées à partir de nombreuses plantes parmi lesquelles on peut citer des arbres (pins, ifs), des fourrages (luzerne, trèfle et sorgho), des légumes (carotte, radis, tomates, patates douces, salade, soja), des fruits (bananes, ananas, agrumes), des céréales (maïs, riz, blé) et d'autres cultures (canne à sucre, café). Jusque-là, les plantes appartenant à la famille des Amaryllidaceae n'ont pas fait l'objet de ce genre d'étude. Les tissus d'une même plante peuvent être colonisés par différentes espèces de microorganismes appartenant à différents genres. On ne sait pas encore s'il existe une coopération entre ces différents groupes. La colonisation de la plante par les différentes espèces d'endophytes dépend de plusieurs facteurs, dont : l'âge de la plante, le génotype, l'échantillonnage des tissus végétaux, du terroir et de la saison durant laquelle l'isolement a été fait.

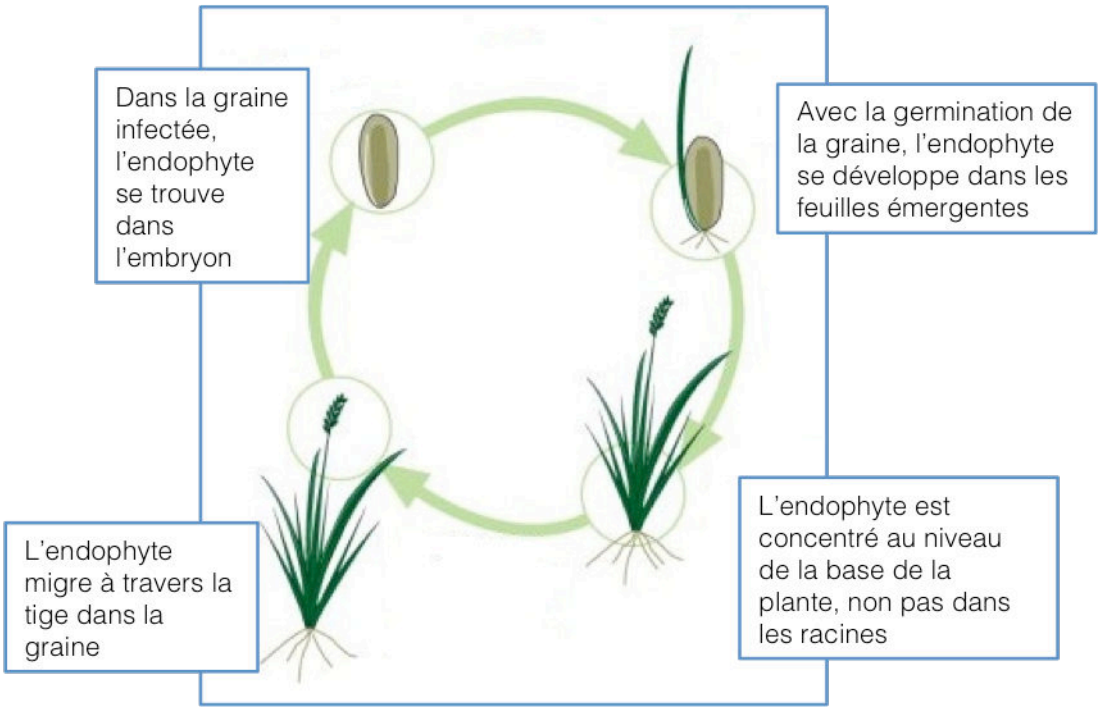


Figure 17 : Le cycle de vie d'un endophyte[120].

4.3 Interaction plante hôte-endophyte

La relation plante hôte-endophyte est complexe et varie d'un hôte à l'autre et d'un endophyte à l'autre. En effet, les deux organismes synthétisent des composés qui ne sont pas directement impliqués dans les processus de croissance : les métabolites secondaires. Le rôle des métabolites secondaires reste mal élucidé. Mais leur grande diversité reflète leur rôle biologique surtout au niveau des interactions entre les organismes et montre leur importance dans les voies de signalement et des toxines[124].

Les plantes peuvent bénéficier de la présence des endophytes de différentes manières[120]. L'endophyte produit des métabolites impliqués dans la défense de la plante contre les insectes et les herbivores (ex, les métabolites produits par *Phomopsis sp.*, un endophyte du coton qui semble dissuader les larves de se nourrir des feuilles[120]). Beaucoup de bactéries, en interaction étroite avec la plante, produisent des métabolites secondaires essentiels pour l'absorption des nutriments par la plante. Aussi, des métabolites agissent en tant qu'agent dans la formation des biofilms ou des toxines[125] ou encore jouent un rôle dans la voie de signalisation hormonale[126]. Dans les interactions bénéfiques bactéries endophytes-plante, la production et la modulation des auxines et de l'éthylène, *via* des hormones issues d'endophytes, joue un rôle essentiel dans le développement de la plante mais aussi dans la tolérance au stress (ex : l'acide abscissique et les gibbérellines produits par l'endophyte *Azospirillum lipoferum* qui atténuent les symptômes du stress causés par la sécheresse chez le maïs)[124]. Les bactéries associées aux plantes produisent non seulement des régulateurs de croissance mais aussi des molécules mimant l'effet des phytorégulateurs naturels en tant qu'analogues structuraux[124]. Il est à noter aussi que certains métabolites ne sont pas produits par un seul organisme mais par l'association de la plante et de l'endophyte. Par exemple la qualité et la quantité de furanoides, responsables de la saveur typique des fraises, sont influencés par la présence d'une méthylobactérie[127].

4.4 Les endophytes source de métabolites bioactifs

Les endophytes produisent des substances à utilisation potentielle en médecine, en agriculture ou encore en industrie[120]. Des composés ayant des activités antibiotiques, antimycosiques, antivirales, antioxydantes,

anticancéreuses et des composés suppresseurs de l'immunité ont été isolés à partir d'endophytes[118, 128]. Des exemples sont cités dans le tableau 4.

Tableau 4 : Quelques métabolites secondaires isolés à partir de bactéries et de champignons endophytes.

Endophytes	Plantes hôtes	Métabolites bioactifs	Activités biologiques
Streptomyces griseus	*Kandelia candel*	Acide p-amino acétophénonique	Antimicrobienne[129]
Streptomyces NRRL 30562	*Kennedia nigriscans*	Munumbicines Munumbicidi D	Antibactérienne Antimalariale[130]
Serratia marcescens	*Rhyncholacis penicillata*	Oocydine A	Antifongique[131]
Pseudomonas viridiflava	Herbes	Ecomycines B et C	Antimicrobienne[132]
Cryptosporiopsis quercina	*Tripterigeum wilfordii*	Cryptocandine A	Antifongique[133]
Pestalotopsis microspora	*Terminalia morobensis*	Pestacine Isopestacine	Antioxydante Antifongique[134]
Pestalotiopsis microspora	*Torreya taxifolia*	Acide ambuique Pestaloside Pestalopyrone Hydroxypestalopyrone	Antifongique Antifongique & phytotoxique[135]
Pestalotiopsis jesteri	*Frgraea bodenii*	Jestrone Hydroxyjestrone	Antifongique[135]
Colletotrichum gloeosporioides	*Artemisia mongolica*	Acide collétotrique	Antibactérienne Antifongique[136]
Fusarium sp.	*Selaginella pallescens*	Pentaketide CR377	Antifongique[137]

Streptomyces sp.	*Monstera* sp.	Coronamycine	Antimalarique[138]
Phomopsis sp.	*Erythriana crista*	Phomol	Antibiotique[139]
Muscodor vitinenus	*Paullina paullinioides*	Naphtalene	Insecticide[140]
Bacillus amyloliquefaciens	*Scutellaria baicalensis* Georgi	Surfactine Fengycine	Antibactérien[141] Antifongique
Aspergillus fumigatus CY018	*Cynodon dactylon*	Asperfumoide Aspernigrine A Asperginigerine	Antifongique & anti-tumorale[142]
Niger IFB-E003	*Cynodon dactylon*	Rubrofusarine B	Anti-tumorale[119]
Taxomyces andreanae *Pastalotiopsis microspora* *Pestalotiopsis quepini.*	*Taxus brevifolia* *Taxus wallichiana* *Wollemia nobilis*	Taxol & taxane Paclitaxel	Anticancéreuse[143, 144]
Pestalotiopsis microspora	*Taxus taxifolia*	Acide torreyanique	Anti-tumorale[145]
Fusarium oxysporum	*Catharanthus roseus*	Vincristine Vinblastine	Anticancéreuse[146]
Fusarium subglutinans	*Taxus wilfordii*	Suglutinol A & B	Immunosuppressive[118]

5 De l'endophyte à la molécule bioactive

Depuis le choix de la plante à étudier jusqu'à l'identification des activités biologiques potentielles, il y a une succession d'étapes à mener.

5.1 La sélection de la plante

Différents critères font qu'une plante est compatible avec l'isolement d'endophytes[120]:

- Les plantes provenant d'un environnement unique et douées de stratégies de survie inhabituelles.

- Les plantes utilisées en médecine traditionnelle, ethnopharmacologie.

- Les plantes endémiques.

- Les plantes poussant dans des milieux denses en termes de biodiversité.

Les Amaryllidacaee répondent à certains de ces critères puisqu'elles font partie des plantes médicinales utilisées depuis longtemps par les caucasiens.

5.2 L'isolement des endophytes

L'un des points critiques pour réussir l'isolement d'endophytes repose sur la fraîcheur du matériel végétal de départ. Il est nécessaire de prévenir la dessiccation des tissus tout en veillant à conserver une aération adéquate. Le contrôle du taux d'humidité ralentira la mort des tissus et l'apport d'air frais ralentira la croissance de champignons et de bactéries contaminants.

Tout commence par la stérilisation de la surface des tissus prélevés de la plante. Différents protocoles sont répertoriés dans la littérature en fonction de la plante, des tissus prélevés et de l'endophyte à isoler. Premièrement, dès la réception, les plantes sont lavées à l'eau claire. Puis, les tissus sont prélevés et stérilisés. Ensuite, les tissus « stériles » sont rincés avec de l'eau distillée et stérile. On procède ensuite au test de stérilité ; la dernière eau de lavage (eau distillée stérile) est dispersée sur un milieu de culture général (Nutrient Agar NA ou Potato Dextrose Agar PDA) et les tissus « stériles » sont coupés en explants de 3-5 mm de long et mis en culture sur un milieu favorisant la croissance de la plante et non pas de l'endophyte (Milieu MS par exemple). Les boîtes contenant l'eau de lavage sont incubées à 30°C

pendant 48 heures et les boîtes contenant les explants sont incubées à 24°C pendant deux semaines. Si on n'observe pas de colonies microbiennes se développant sur ces milieux, on considère que la surface de l'explant est stérile. Ensuite, les explants sont mis en culture sur un milieu favorisant la multiplication des endophytes.

5.3 Le dépistage biologique des endophytes

Plusieurs conditions de culture sont testées: milieux de culture différents, différents pH, températures variées, en présence ou en l'absence d'antibiotiques, etc. Une fois les colonies d'endophytes apparues sur un milieu de culture, chacune est prélevée et isolée sur un milieu adéquat. L'identification des souches se fait d'abord au niveau morphologique (description des colonies), ensuite au niveau biochimique (voies biochimiques spécifiques) et finalement au niveau moléculaire (ARN 16S ou 18S).

5.4 Le dépistage chimique des endophytes

L'endophyte isolé et identifié est ensuite testé pour sa capacité à proliférer en milieu liquide sous agitation. L'étape suivante est de définir les meilleures conditions de culture (température, pH) afin de procéder à la fermentation et à l'extraction des différents métabolites produits par la souche. Un screening général aura lieu afin de définir les métabolites « intéressants ». Une étape de purification (liquide-liquide, solide-liquide, précipitation) suivie d'une étape d'identification (RMN, LC-MS, GC-MS, analyse élémentaire, etc) permettront l'élucidation de la structure chimique des composés ainsi obtenus.

Il a été remarqué que de nombreux endophytes pourraient être isolés à partir d'une plante, cependant, seul un petit nombre produisent les composés bioactifs désirés[147]. Beaucoup d'incertitude existe aussi par rapport à ce que l'endophyte peut produire en culture et ce qu'il pourrait produire sous les conditions naturelles à l'intérieur de la plante. Il existe des endophytes qui produisent le même métabolite à haute valeur ajoutée que celui produit par la plante hôte, ce qui laisse croire qu'il y aurait eu une recombinaison génétique entre les deux individus au cours de leur

coévolution[148]. Cet argument a été utilisé pour expliquer la production du Taxol® par *Taxomyces andreannae*[118].

Partie 3 : Matériels et Méthodes

1 Obtention du matériel chimique

Les standards de galanthamine et de lycorine, ainsi que le picloram, la zéatine, le BAP, l'inositol, le glucose, l'agar-agar, le sulphate de magnésium heptahydraté (98%), le sulfate de manganèse, le sulphate de sodium anhydre, le nitrate de potassium, le molybdate de sodium dihydraté, l'EDTA disodique, l'acide sulfurique, l'ammoniaque, l'acétone, le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle proviennent de chez Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Stennheim, Allemagne). Le formiate d'ammonium, le sulphate de fer, le sulphate de zinc, le sulphate de cuivre (II) pentahydraté (99%), l'iodure de potassium, le chlorure de sodium, l'hydrochlorure de thiamine, le 2,4-D, l'acide orthoborique, le ANA, l'éthanol absolu et le méthanol (Hipersolv Chromanorum pour HPLC-qualité isocratique) ont été obtenus de chez Prolabo VWR international bvba/sprl. Le chlorhydrate de pyridoxine, l'acide nicotinique, dihydrogénophosphate de potassium, le chlorure de calcium dihydraté et le nitrate d'ammonium ont été obtenus de chez Merck AG (Darmstadt, Allemagne). L'acétonitrile a été acheté de chez Carlo Erba Reagenti (SDS). Le standard d'hyoscyamine, l'extrait de levure en poudre, la peptone de viande, le chloramphénicol, l'iode, l'iodure de potassium, la safranine et le cristal violet ont été obtenus chez Carl ROTH.

2 Procédures expérimentales générales

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil Reichert Kofler et ils n'ont pas été corrigés. Les spectres RMN du ^{1}H et du ^{13}C ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre AC 250 Bruker (à 250 MHz et 62,9 MHz respectivement). Les analyses MS ont été réalisées en mode ESI (electrospray ionisation) sur un micrOTOF$_Q$ (Bruker Daltonics) au Service Commun de Spectrométrie de Masse (Nancy, France). Le système LC est un U3000-Dionex microTOFLCTM – System (Bruker Daltonics). Les analyses GC ont été réalisées sur une QP2010-Shimadzu. La purification de l'alcaloïde d'origine endophytique a été réalisée avec un apppareil CombiFlash RF®. L'analyse élémentaire a été réalisée à l'aide d'un Thermofinnigan FlashEA 1112 au Service Commun de Microanalyse (Nancy, France). La synthèse de la 4'-*O*-méthylnorbelladine s'est déroulée sous atmosphère d'argon. Les solvants achetés ont été utilisés sans purification. Les analyses en CCM ont été faites sur des plaques de silice DC-Fertigfolien ALUGRAM® SIL G/UV$_{254}$

20 x 20 cm (818133.9). Les analyses HPTLC/MS ont été réalisées avec l'appareil CAMAG Linomat 5 et l'interface de couplage à la spectrométrie de masse CAMAG TLC-MS Interface sur des plaques de silice en verre HPTLC Silica gel 60 F_{254}, 20 x 10 cm (Merck). Les cartouches SPE (C18-S-500/6, SCX-100/3, 2H-500/9 et SI-1300/SC) ont été obtenues chez Interchim.

3 Obtention du matériel biologique

Les bulbes de *L. aestivum*, *G. elwesii* et *N. pseudonarcissus* 'Carlton' ont été achetés dans le commerce français (Graines Baumaux, Nancy, France). Les espèces ont été enregistrées et déposées à l'herbier du Jardin Botanique du Montet à Vandœuvre-lès-Nancy (N° 911371, N° 20100274, N° 820570 respectivement).

Les bulbes de *L. aestivum* 'Gravety Giant' proviennent du commerce polonais.



Figure 18 : Bulbes de *L. aestivum* achetés chez Graines Baumaux (Nancy, France) et utilisés pour l'établissement des cultures *in vitro*.

4 Etapes de la culture *in vitro*: de l'explant primaire jusqu'aux bulbilles

Dans ce qui suit et afin d'éviter toutes confusions, le mot bulbe signifiera bulbe *in vivo* du commerce non issu de la culture *in vitro*. Le mot bulbille désignera le bulbe établi *in vitro*.

4.1 Décontamination des explants primaires provenant des bulbes *in vivo*

Toutes les étapes de la stérilisation ainsi que toutes les étapes de la culture *in vitro* ont eu lieu dans un environnement stérile sous une hotte à flux laminaire (ADS de type U12, débit en charge environ 100 Pa). Les cultures ont été établies de manière aseptique à l'aide d'instruments et de matériels (pinces, scalpels, spatules, boîtes de pétri en verre) stérilisés dans un four à 220°C pendant 120 min et flambés avant utilisation.

La désinfection est une étape clé pour réussir les cultures *in vitro*. Les parties souterraines des plantes sont généralement les plus contaminées et pour établir les cultures *in vitro* les bulbes, renfermant des méristèmes, sont intéressants. Deux étapes sont cruciales pour minimiser le taux de contamination ainsi que le taux de survie après l'étape de stérilisation[3, 149] :

- le lavage des bubes à l'eau courante dès leur réception

- le stockage des bulbes pendant 2 à 3 mois à 4°C.

Les cultures *in vitro* ont été initiées à partir de trois genres d'Amaryllidaceae : *Leucojum aestivum*, *Leucojum aestivum* 'Gravety Giant', *Narcissus pseudonarcissus* et *Galanthus elwesii*. La partie centrale du bulbe, constituée de feuilles les moins différenciées, a été isolée du reste et a servi pour la mise en culture. Le reste du bulbe a été congelé à -20°C dans un sachet portant le même numéro que les feuilles ayant servi à la culture.

Les feuilles les moins différenciées ont été retirées et séparées les unes des autres puis trempées dans de l'eau stérile (Figure 19). Elles ont été ensuite immergées dans une solution d'éthanol à 70% pour 30 secondes puis dans une solution de Domestos® : eau (50 mL:250 mL, v : v) pendant 10 min avec agitation à 150 rpm. Les feuilles ont été ensuite rincées par trois bains successifs d'eau stérile afin d'éliminer toute trace de détergent. Elles ont été séchées à l'air sous une hotte à flux laminaire.

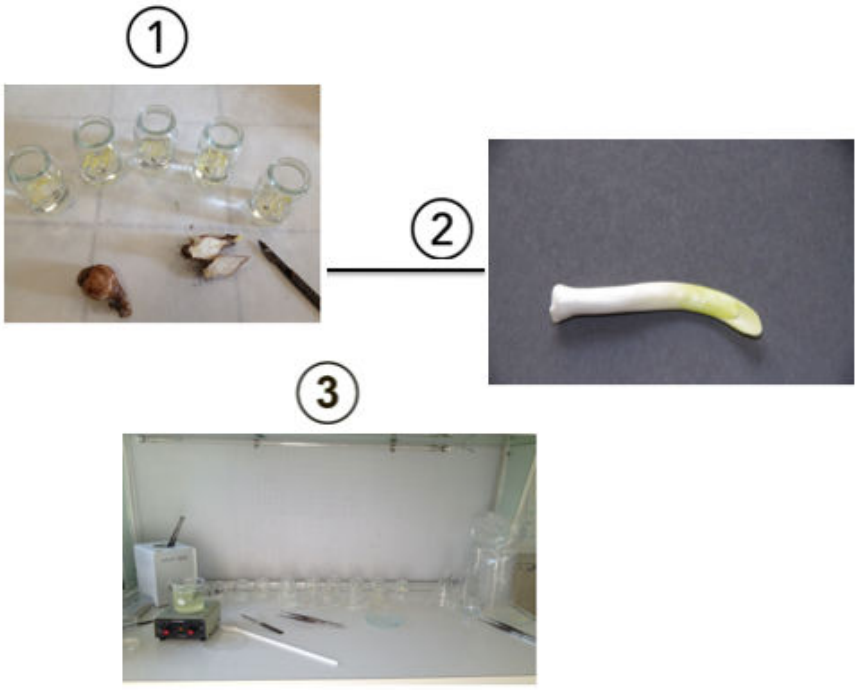


Figure 19: Prélèvement des explants (2) à partir de bulbes *in vivo* (1) et leur décontamination (3).

4.2 Mise en culture des explants décontaminés

Les feuilles décontaminées ont été découpées en explants de 3 à 5 mm de longueur et mis en culture sur un milieu MS solide (Figure 20), additionné de saccharose et de différentes concentrations de phytorégulateurs (la composition de base du milieu MS figure dans l'annexe 1). Notons que les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage à 120°C sous une pression de 1 bar et sont coulés dans des boîtes de pétri stériles de façon aseptique sous une hotte à flux laminaire.

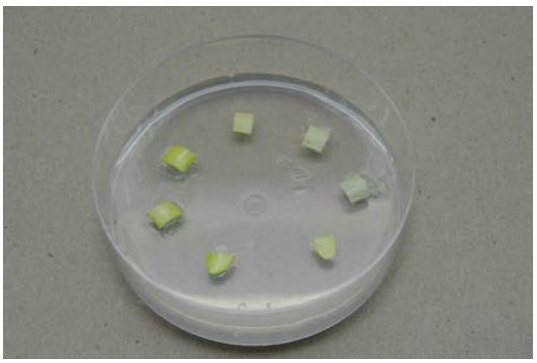


Figure 20: Mise en culture des explants primaires de *L. aestivum* sur un milieu MS solide.

4.2.1 Induction de la callogenèse et de l'organogenèse chez les explants de *N. pseudonarcissus* et de *G. elwesii*

Pour la callogenèse, les explants de *N. pseudonarcissus* et de *G. elwesii* ont été mis en culture sur un milieu MS solide contenant 30 g/L de saccharose, 4 µM de BAP et 10 µM de 2,4-D.

Pour l'organogenèse, les explants ont été mis en culture sur un milieu MS solide contenant 30 g/L de saccharose, 5 µM de BAP et 12 µM de 2,4-D (Figure 21).

Les cultures ont été maintenues à 25°C ± 2°C et à l'obscurité. Les explants ont été repiqués sur des nouveaux milieux toutes les 4 semaines.



Figure 21 : Bulbilles de *G. elwesii*.

4.2.2 Induction de l'embryogenèse somatique chez *L. aestivum* et sa variété Gravety Giant

Les cals embryogènes ont été initiés sur un milieu MS solide contenant 25 µM de picloram et 0,5 µM de BAP (Figure 22). L'induction des embryons somatiques a eu lieu sur un milieu MS solide enrichi avec 5 µM de picloram et 0,5 µM de BAP. Les cultures ont été maintenues à 25°C ± 2°C et à l'obscurité durant 20 semaines.

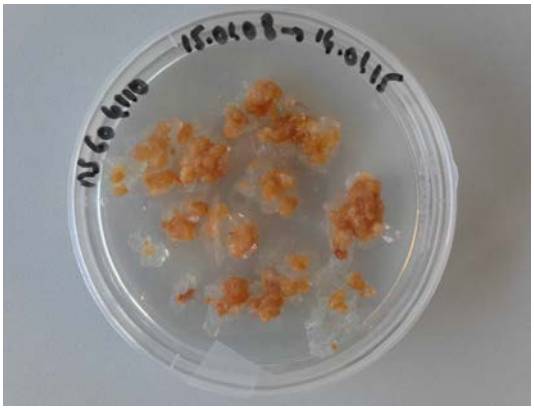


Figure 22 : Cals de *L. aestivum*.

Ensuite, les embryons somatiques ont été transférés sur un milieu MS solide additionné de 5 µM de zéatine. Les cultures ont été maintenues pendant 16 semaines à 25°C ± 2°C sous une lumière fluorescente (lampe Tungsram, 40 WF, 90 µmol. $m.^{-2}$ $s.^{-1}$) avec une photopériode de 16 h de lumière suivie de 8 h d'obscurité (Figure 23).

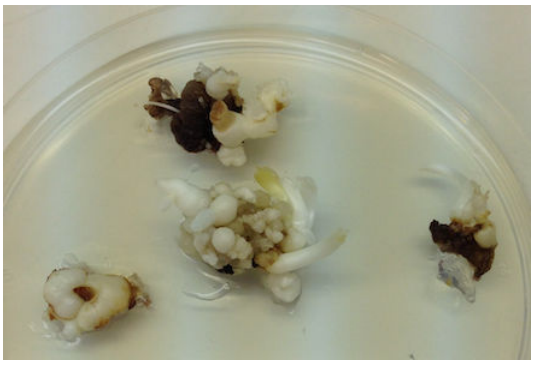


Figure 23 : Embryons somatiques de *L. aestivum*.

4.2.3 Formation des bulbilles de *L. aestivum*

Les bulbilles régénérées à partir des embryons somatiques ont été obtenues sur un milieu MS solide additionné de 60 g/L de saccharose, privé de régulateursde croissance (Figure 24 A). Les cultures ont été placées à 25°C ± 2°C sous une lumière fluorescente (lampe Tungsram, 40 WF, 90 µmol. $m.^{-2}$ $s.^{-1}$) avec une photopériode de 16 h de lumière suivie de 8 h d'obscurité. Après trois mois de culture, les bulbilles ont été transférées sur un nouveau milieu ayant la même composition. Le développement des bulbilles a continué à 5°C et à l'obscurité durant un mois (Figure 24 B).

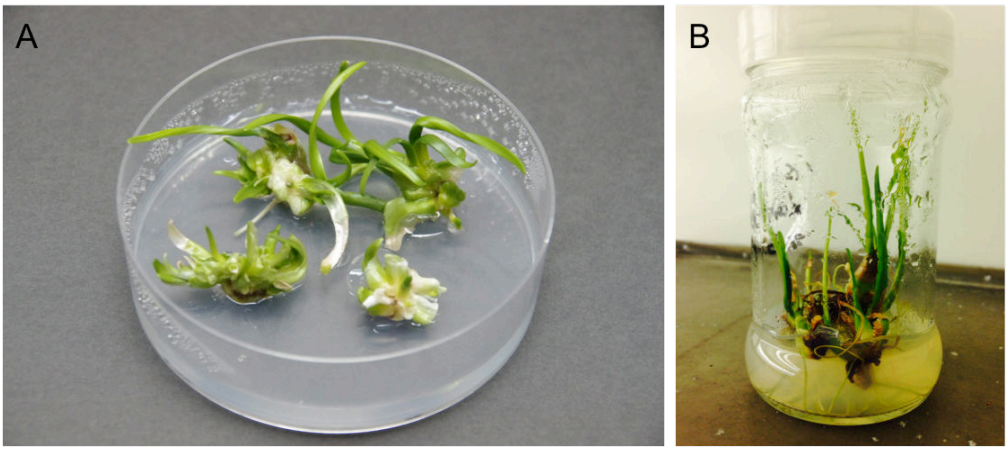


Figure 24 : Formation de bulbilles de *L. aestivum* (A), bulbilles avec des feuilles (B).

5 Expériences menées sur des bulbilles de *L. aestivum* en présence de la 4'-*O*-méthylnorbelladine

5.1 Synthèse de la 4'-*O*-méthylnorbelladine (MN)

Le protocole de synthèse de la MN (Figure 25) a été réalisé selon les travaux de Szewczyk et al.,[150] puis optimisé (cf. Résultats et Discussions Chapitre 3).

À 70 mL de MeOH anhydre 2,500 g (16,43 mmol) d'isovanilline, 2,250 g (16,43 mmol) de tyramine et 15 g de tamis moléculaire 4 Å ont été ajoutés. La suspension a été laissée pendant une nuit sous agitation à température ambiante et sous atmosphère d'argon. Le mélange a été ensuite filtré et refroidi à 0°C avant l'ajout de 1,243 g (32,86 mmol) de $NaBH_4$ par portions tout en agitant. La suspension blanche ainsi obtenue a été mise sous agitation pendant 3 heures. Le solvant a été ensuite évaporé et le résidu a été mis en suspension dans 100 mL d'un mélange d'eau distillée et d'eau saturée en sels (50 mL:50 mL, v : v), le pH a été ajusté à 8 avec de l'HCl à 3 M. La phase aqueuse a été ensuite extraite deux fois avec de l'EtOAc (200 mL x 2). Les deux phases organiques ainsi obtenues ont été récupérées, combinées et extraites deux fois avec une phase aqueuse (200 mL x 2) dont le pH a été ajusté à 3 avec de l'HCl à 3M. L'extrait acide a été récupéré. Le pH a été ajusté à 8 avec du KOH. La phase aqueuse a été ensuite extraite deux fois avec de l'EtOAc (50 mL x 2). La phase organique a été séchée avec du $MgSO_4$ et évaporée à sec. Afin d'obtenir le sel de chlorhydrate, le

produit obtenu a été tout d'abord dissout dans de l'éthanol à reflux. Ensuite la solution a été filtrée et refroidie, puis 15 mL d'HCl aqueux concentré ont été ajoutés. La solution a été laissée durant une nuit à 4°C. Des cristaux blancs sont apparus. Finalement, la solution a été filtrée et les cristaux ont été récupérés, lavés avec de l'éthanol glacé et séchés. Le rendement de la réaction est de 33%.

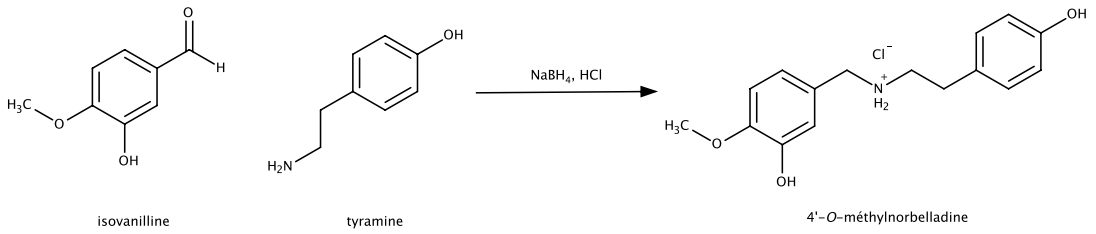


Figure 25 : Synthèse du précurseur MN.

5.2 Ajout de la MN dans le milieu de culture liquide des bulbilles de *L. aestivum*

Dans le but de stimuler la voie de biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine, le précurseur commun MN a été ajouté dans le milieu de culture liquide des bulbilles de *L. aestivum*. Premièrement, les bulbilles ont été mises en culture dans des Erlenmeyers de 100 mL. C'est la méthode de culture dite « traditionnelle », à immersion continue et avec agitation. Deuxièmement, le système de bioréacteur RITA® à immersion temporaire a été utilisé pour la culture des bulbilles.

5.2.1 Ajout de la MN dans le milieu de culture liquide en Erlenmeyer

Deux séries d'expériences *a* et *b* ont été réalisées dans des Erlenmeyers de 100 mL (Figure 26) contenant respectivement 20 et 30mL de milieu de culture MS liquide additionné de 60 g/L de saccharose, 10 µM d'ANA et 5 µM de BAP. Les deux séries d'expériences ont été réalisées avec 2 g de bulbilles de *L. aestivum* âgées de 12 mois. Dans chaque série, trois concentrations différentes de MN ont été testées, respectivement 0,05 ; 0,10 et 0,20 g/L de milieu de culture pour la série *a* et 0,10 ; 0,15 et 0,20g/L de milieu de culture pour la série *b*. Pour cela, une solution-mère de MN à 1 g/L dans de l'eau stérile a été préparée et des volumes précis ont été prélevés et

ajoutés dans les milieux de culture des bulbilles à l'instant J0 qui correspondra au premier jour de culture. La culture en Erlenmeyer a duré 40 jours pour la série *a* et 50 jours pour la série *b*. Des arrêts de culture après 15, 30, 40 et 50 jours ont été effectués. Trois répétitions pour chaque condition ainsi que des cultures témoins ont été établies. Les cultures ont été maintenues à 25°C ± 2°C sous une agitation orbitale de 150 rpm et sous une lumière fluorescente (lampe Tungsram, 40 WF, 90 µmol. $m.^{-2}$ $s.^{-1}$) en photopériode de 16 h de lumière suivies de 8 h d'obscurité.

Les Erlenmeyers et les bouchons ainsi que les milieux de cultures ont été autoclavés durant 20 min à 120°C et sous une pression de 1 bar. Les pinces et les scalpels ont été stérilisés au four à 220°C pendant 2 h. L'ajout des différents éléments s'est fait de manière aseptique sous une hotte à flux laminaire. La solution de précurseur a été stérilisée par filtration à travers un filtre de 0,45 µm avant son ajout au milieu de culture autoclavé.

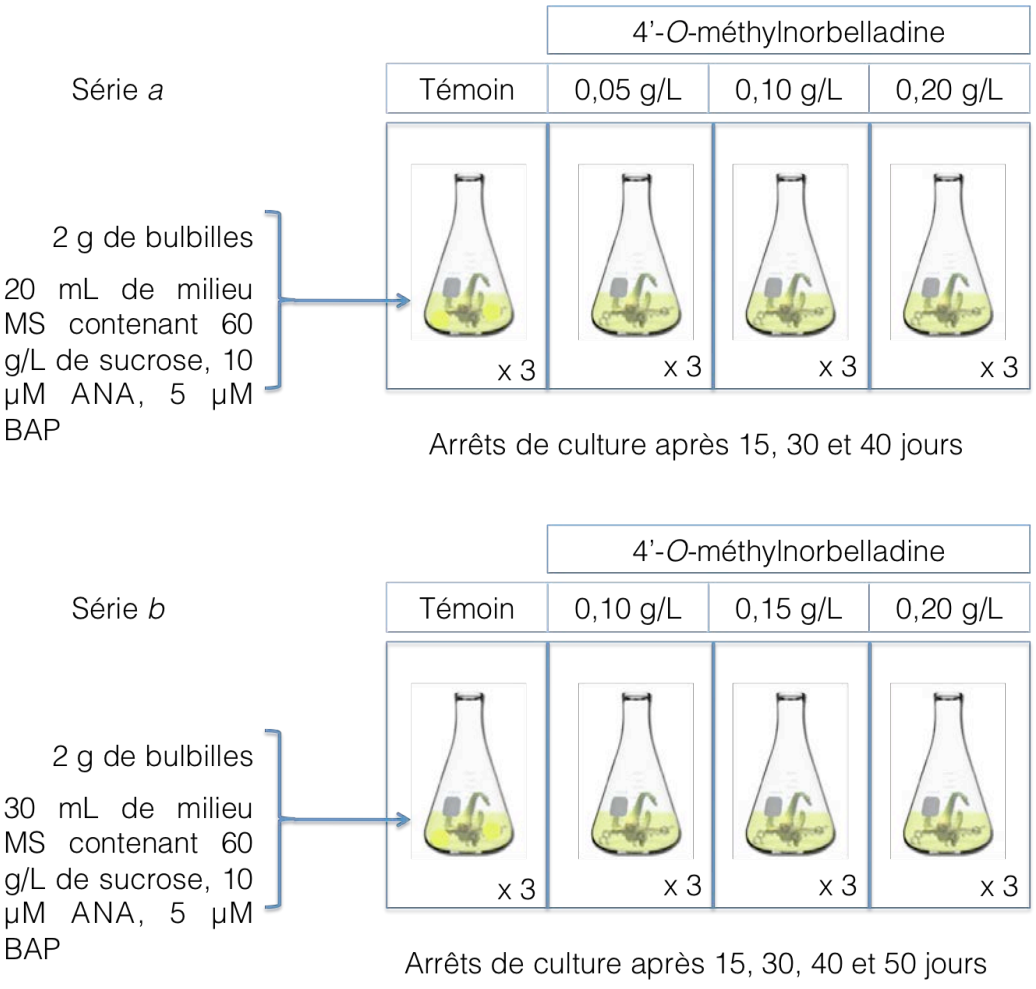


Figure 26 : Ajout de la MN dans le milieu de culture liquide des bulbilles de *L. aestivum* cultivés en Erlenmeyer.

5.2.2 Ajout de la MN dans le milieu de culture liquide en bioréacteur RITA®

Pour cette série d'expériences, le système de bioréacteurs RITA® (récipient à immersion temporaire automatique, CIRAD, France, distribués par VITROPIC, France) a été utilisé pour réaliser les cultures (Figure 27). Dans chaque récipient, 5 g de bulbilles de *L. aestivum* âgées de 12 mois ont été mis en culture dans 200 mL de milieu MS liquide additionné de 60 g/L de saccharose, 10 µM d'ANA et 5 µM de BAP. La fréquence d'immersion était de 5 minutes toutes les deux heures. Deux concentrations différentes de MN ont été testées : 0,15 et 0,30 g/L de milieu de culture. A J0, un volume précis de la solution mère MN à 1 g/L (préparée dans de l'eau stérile) a été ajouté aux différentes cultures.

La culture en bioréacteurs RITA® a duré 50 jours. Des arrêts de culture après 15, 30, 40 et 50 jours ont été effectués. Trois répétitions pour chaque condition ainsi que des cultures témoins ont été établies (39 cultures au total). Les cultures ont été maintenues à 25°C ± 2°C et sous une lumière fluorescente (lampe Tungsram, 40 WF, 90 µmol. $m.^{-2}$ $s.^{-1}$) en photopériode de 16 h de lumière suivies de 8 h d'obscurité.

Les bioréacteurs ainsi que les milieux de culture ont été autoclavés durant 20 min à 120°C et sous une pression de 1 bar. Les pinces et les scalpels ont été stérilisés au four à 220°C pendant 2 h. L'ajout des différents éléments s'est fait de manière aseptique sous une hotte à flux laminaire. La solution de précurseur a été stérilisée par filtration à travers un filtre de 0,45 µm avant son ajout aux milieux de culture autoclavés.

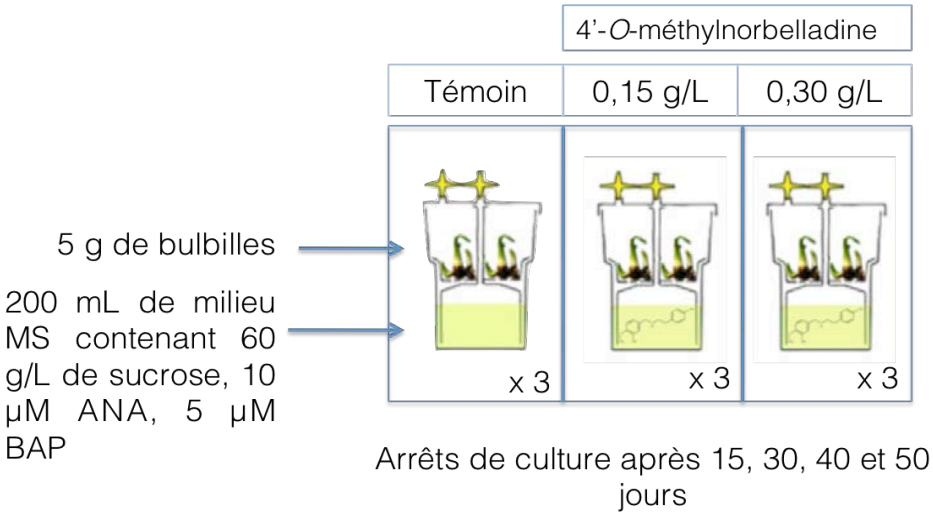


Figure 27 : Ajout de la MN dans le milieu de culture liquide des bulbilles de *L. aestivum* cultivées en bioréacteur RITA®.

5.2.3 Ajout de la MN dans le milieu de culture liquide des bulbilles de *L. aestivum* 'Gravety Giant' cultivées en bioréacteur RITA®

Dans le but de trouver des individus hautement producteurs de galanthamine et de lycorine, la variété Gravety Giant de *L. aestivum* a été étudiée. L'effet de l'ajout de la MN combiné au système de bioréacteur à immersion temporaire a été testé pour cette variété. Le protocole est le même que celui des bulbilles de *L. aestivum* (voir paragraphe précédent).

6 Expériences menées sur des bulbilles de *L. aestivum* en présence d'éliciteurs

Deux éliciteurs, le méthyljasmonate (MeJa) et l'acide salicylique (AS), ont été ajoutés au milieu de culture liquide de bulbilles de *L. aestivum*.

6.1 Bulbilles de *L. aestivum* cultivées en bioréacteur RITA®

Deux séries d'expériences *a* et *b* ont été réalisées dans des bioréacteurs RITA® de 500 mL. Dans chaque récipient, 5 g de bulbilles de *L. aestivum* âgées de 12 mois ont été mis en culture dans 200 mL de milieu MS liquide additionné de 5 µM de zéatine. La fréquence d'immersion était de 5 minutes toutes les deux heures. Les cultures ont été maintenues à 25°C ± 2°C sous une lumière fluorescente (lampe Tungsram, 40 WF, 90 µmol. $m.^{-2}$ $s.^{-1}$) en

photopériode de 16 h de lumière suivies de 8 h d'obscurité. Au bout de 21 jours de culture, le MeJa et l'AS ont été ajoutés respectivement au milieu de culture des bulbilles de la série *a* et *b* à des concentrations différentes (5, 50 et 100 µM). Une fois les éliciteurs ajoutés, les cultures ont duré 168 h. Des arrêts au bout de 10, 72 et 168 h ont été effectués. Trois répétitions pour chaque condition ainsi que des témoins ont été établis (39 cultures au total).

Les bioréacteurs ainsi que les milieux de culture ont été autoclavés durant 20 min à 120°C et sous une pression de 1 bar. Les pinces et les scalpels ont été stérilisés au four à 220°C pendant 2 h. L'ajout des différents éléments s'est fait de manière aseptique sous une hotte à flux laminaire. Les solutions d'éliciteurs ont été stérilisées par filtration à travers un filtre de 0,45 µm avant leur ajout aux milieux de culture autoclavés.

6.2 Bulbilles de *L. aestivum* 'Gravety Giant' cultivées en bioréacteur RITA®

Le même protocole que celui décrit dans le paragraphe précédent a été réalisé.

7 Expériences menées sur des bulbilles de *L. aestivum* en présence de précurseurs d'éthylène

Les effets d'un précurseur (acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique ACC) et d'un relargueur (étéphon) de l'éthylène sur les voies de biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine ont été étudiés sur des bulbilles de *L. aestivum* et de *L. aestivum* 'Gravety Giant' cultivées en bioréacteurs RITA®.

7.1 Bulbilles de *L. aestivum* cultivées en bioréacteur RITA®

Deux séries d'expériences *a* et *b* ont été réalisées dans des bioréacteurs RITA® de 500 mL. Dans chaque récipient, 5 g de bulbilles de *L. aestivum* âgées de 12 mois ont été mis en culture dans 200 mL de milieu MS liquide additionné de 5 µM de zéatine. La fréquence d'immersion était de 5 minutes toutes les deux heures. Les cultures ont été maintenues à 25°C ± 2°C sous une lumière fluorescente (lampe Tungsram, 40 WF, 90 µmol. $m.^{-2}$ $s.^{-1}$) en photopériode de 16 h de lumière suivies de 8 h d'obscurité. A J0 (premier

jour de culture), les solutions d'ACC et d'éthéphon ont été ajoutées respectivement aux milieux de culture des bulbilles de la série *a* et *b* à deux concentrations différentes (10 et 100 µM). Les cultures ont duré 4 semaines. Au bout de la période de culture, les bulbilles ont été récupérées. Trois répétitions pour chaque condition ainsi que des témoins ont été établis.

Les bioréacteurs ainsi que les milieux de culture ont été autoclavés durant 20 min à 120°C et sous une pression de 1 bar. Les pinces et les scalpels ont été stérilisés au four à 220°C pendant 2 h. L'ajout des différents éléments s'est fait de manière aseptique sous une hotte à flux laminaire. Les solutions d'ACC et d'éthéphon ont été stérilisées par filtration à travers un filtre de 0,45 µm avant leur ajout aux milieux de culture autoclavés.

7.2 Bulbilles de *L. aestivum* 'Gravety Giant' cultivées en bioréacteur RITA®

Le même protocole que celui décrit dans le paragraphe précédent a été réalisé.

8 Evaluation du taux de croissance des bulbilles *in vitro*

Après chaque arrêt de culture, les bulbilles sont récupérées, lavées et séchées sous une hotte à flux laminaire. Le taux de croissance des bulbilles est évalué en appliquant la formule ci-dessous :

(Masse de la matière fraîche finale MF_f - Masse de la matière fraîche inoculée MF_i) / MF_i

Les masses sont exprimées en g.

9 Extraction des alcaloïdes à partir des bulbilles et des milieux de culture

Après chaque arrêt de culture, les bulbilles de *L. aestivum* et de *L. aestivum* 'Gravety Giant' sont récupérées et lavées avec trois bains successifs d'eau stérile afin d'éliminer toutes traces de composés pouvant se fixer sur leur surface. Ensuite, les bulbilles ainsi que leur milieu de culture

sont congelés à -20°C (étape essentielle pour la lyophilisation). Le matériel est lyophilisé à -52°C pendant 48 heures. Aux termes de cette étape, le matériel lyophilisé est broyé et réduit en une fine poudre à l'aide d'un mortier puis pesé. Pour l'extraction d'1 g de matière sèche (MS), 10 mL de MeOH sont ajoutés. La macération dans le MeOH dure 24 h intercalées d'1 h 30' de sonication.

10 Purification des extraits méthanoliques

Les extraits méthanoliques de bulbilles et de milieux de culture de *L. aestivum* issus des cultures *in vitro* ont été analysés en LCMS ou en GCMS afin de quantifier leur contenu en alcaloïdes d'intérêt. Il s'avère donc nécessaire de purifier les échantillons préalablement à leur injection.

Une méthode de purification par SPE (extraction en phase solide) a été mise au point. Pour cela, des extraits méthanoliques de bulbes, bulbilles et milieux de culture de *L. aestivum*, auxquels on a ajouté une concentration connue d'étalon interne, ont été utilisés. L'étalon interne choisi est l'hyoscyamine, sa concentration finale théorique dans les échantillons purifiés est de 20 µg/mL. Les échantillons ont été injectés en GCMS afin de quantifier les pertes liées à l'étape de purification et de déterminer les taux de récupération de l'hyoscyamine. Finalement, la méthode a été comparée à la méthode traditionnelle de purification liquide-liquide.

Une fois la méthode SPE mise au point, les extraits issus des cultures *in vitro*, ont été purifiés et injectés en LCMS ou en GCMS. La concentration théorique finale de l'hyoscyamine est de 2 ou de 20 µg/mL respectivement.

10.1 Extraits méthanoliques bruts sans purification

Après décantation, les extraits sont filtrés à travers un filtre résistant au solvant (RC – VILIESVERSTÄRKT 1 840-13-K ; 0,45 µm). Le filtrat de chaque extrait est directement injecté en LC-MS ou en GC-MS.

10.2 Préparation de la solution-mère d'étalon interne

L'étalon interne est choisi afin de quantifier les pertes liées à l'étape de purification et de comparer ainsi les méthodes de purification, il s'agit de l'hyoscyamine. Une solution-mère d'hyoscyamine a été préparée en dissolvant 2000 µg du standard dans 10 mL de MeOH. La concentration finale est de 200 µg/mL. Pour la mise au point de la méthode de purification, 300 µL de la solution mère ont été ajoutés aux extraits méthanoliques de bulbes, bulbilles et milieux de culture de *L. aestivum*.

10.3 Purification liquide-liquide des extraits méthanoliques

Les extraits méthanoliques chlorophylliens ont été tout d'abord acidifiés avec 5 mL de H_2SO_4 à 3%. Ensuite, les composés apolaires ont été éliminés en extrayant la phase polaire deux fois avec du CH_2Cl_2 (2 x 10 mL). La fraction polaire, sans chlorophylle, a été basifiée avec du NH_4OH à 25% et extraite trois fois avec du CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). Les phases organiques ont été récupérées, séchées avec du sulphate de sodium anhydre et évaporées à sec. Le résidu a été redissout dans 3 mL de MeOH. La concentration théorique finale en hyoscyamine est de 20 µg/mL.

10.4 Purification par extraction en phase solide (SPE) des extraits méthanoliques

Pour la mise au point de la méthode SPE, différents types de cartouches ont été testés : Les cartouches C18 à phase inverse (C18-S-500/6), les cartouches à phase normale de silice, les cartouches à phase apolaire 2H (2H-500/9) et les cartouches à phase échangeuse de cations SCX (SCX-100/3). Le protocole de purification SPE suit généralement 4 étapes :

- première étape de conditionnement : la phase est conditionnée avec 3 mL de la phase mobile adéquate

- deuxième étape de dépôt de l'échantillon : l'échantillon contenu dans la phase mobile est déposé sur la phase

- troisième étape de lavage : les composés n'ayant pas d'affinité avec la phase employée sont éliminés de la cartouche

- quatrième étape : les composés purifiés sont élués et récupérés.

La concentration théorique finale en hyoscyamine est de 20 µg/mL.

11 Analyse phytochimique des extraits par LC-ESI-MS et GC-EI-MS

Dans le but de mettre au point la méthode de purification des alcaloïdes par SPE et de la comparer à la méthode liquide-liquide, les échantillons purifiés par l'une ou l'autre des méthodes ont été analysés en GCMS (chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse). La concentration théorique finale en étalon interne est de 20 µg/mL.

Cependant, afin d'identifier et de quantifier les alcaloïdes contenus dans les extraits methanoliques de bulbes, bulbilles et milieux de culture de *L. aestivum* issus des cultures en présence d'un éliciteur, les échantillons ont été injectés en LCMS (chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse) ou en GCMS. La concentration théorique finale en étalon interne est de 2 ou de 20 µg/mL respectivement.

11.1 Analyse des extraits en LC-ESI-MS

Le système LC consiste en un appareil U3000-Dionex équipé d'un injecteur comprenant une boucle de 5 µL et d'un détecteur UV à 280 nm. La colonne analytique utilisée est une Acclaim MIXED MODE HILIC-1 ID 2,1 mm (150 mm x 5 µm x 120 Å). Elle est éluée avec un débit de 200 µL/min avec un gradient de phase mobile allant de 2% du solvant B jusqu'à 25% du solvant B durant une période de 26 min et 30 sec. Le solvant A est de l'acétonitrile pur et le solvant B est une solution tampon de formiate d'ammonium à 10 µM dans de l'eau distillée avec un pH de 6,8. Les paramètres d'élution sont les suivants :

- Système: U3000-Dionex microTOFLC™ – System (Bruker Daltonics)
- Colonne: Acclaim MIXED MODE HILIC-1 ID 2,1 mm (150 mm x 5 µm x 120 Å)

- Débit: 200 µL/min

- Volume d'injection: 1 µL

- Composition de la phase mobile:

Solvant A: acétonitrile pure
Solvant B: formiate d'ammonium à 10 µM dans l'eau (pH 6,8)

- Le gradient d'élution figure dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Gradient d'élution LCMS adapté à la séparation des alcaloïdes contenus dans les extraits.

Temps (min)	t0 à t=1'30"	t=1'30" à t=21'30"	t=21'30" à t=26'30"
Durée	1'30"	20'	5'
Solvant A (%)	98	gradient linéaire de 98 à 75	98
Solvant B (%)	2	gradient linéaire de 2 à 25	2

Les spectres de masse ESI-HRMS (High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry) en mode d'ionisation positif ont été obtenus sur un Q-TOF (microTOF-Q™ Bruker Daltonics). Ce spectromètre de masse associe un quadripôle (Q) et un analyseur à temps de vol avec réflectrons (TOF-R, Time Of Flight). Le principe de l'analyseur à temps de vol repose sur la relation qui existe entre la masse m et la vitesse v des ions. L'instrument mesure le temps nécessaire aux ions pour parcourir dans le vide (10^{-5} mbar) une distance L sans champ.

La tension capillaire est fixée à 4,5 KV, la tension de source à 150 V. Le gaz de désolvatation et de nébulisation utilisé est l'azote à un débit de 4 L/min. La température de la source ESI et celle du gaz de désolvatation ont été fixées à 190°C. Le logiciel Bruker Daltonics DataAnalysis 4.0 a été utilisé pour l'acquisition et le traitement des données.

Pour l'analyse quantitative des alcaloïdes, une méthode de calibration avec étalonnage interne (hyoscyamine) a été effectuée et une courbe de calibration avec des strandards de galanthamine, lycorine et hyoscyamine a été tracée. La courbe d'étalonnage comporte huit niveaux de concentrations allant de 0,05 à 75 µg/mL avec une concentration constante en étalon interne égale à 2 µg/mL.

11.2 Analyse des extraits en GC-EI-MS

Les analyses ont été réalisées sur un appareil QP2010-Shimadzu fonctionnant en mode EI (Electronic Impact) à 70 eV. La colonne utilisée est une SLB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) qui provient de chez Sigma-Aldrich. Le programme d'élution dure 20 min avec un gradient linéaire allant de 190°C jusqu'à 280°C à raison de 5°C/min (Figure 28). La température de l'injecteur a été fixée à 280°C. Le débit de la phase mobile d'Hélium était de 0,8 mL/min. Le volume d'injection est de 1 µL et le ratio du split était de 1:50. La température de l'interface a été fixée à 300°C et celle de la source EI à 200°C. Le mode SIM a été utilisé et mis en route de 5 à 19 min.

Pour l'analyse quantitative des alcaloïdes, une méthode de calibration avec étalonnage interne a été effectuée et une courbe de calibration avec des strandards de galanthamine, lycorine et hyoscyamine a été tracée, sachant que l'étalon interne était l'hyoscyamine. La courbe comporte huit niveaux de concentration allant de 0,5 jusqu'à 150 µg/mL avec une concentration constante en hyoscyamine égale à 20 µg/mL. Les alcaloïdes ont été identifiés par comparaison aux standards obtenus chez Sigma-Aldrich et aussi par comparaison aux spectres enregistrés dans la base de données NIST08.LIB. Le logiciel GCMS Solution 2.53 a été utilisé pour le traitement des données.

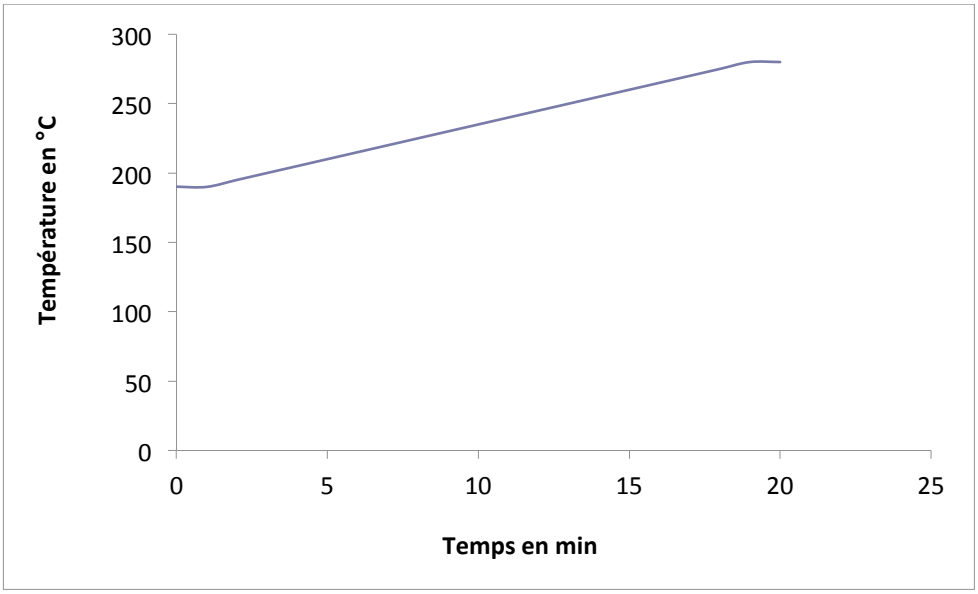


Figure 28 : Gradient d'élution de la GC-EI-MS.

11.3 Validation des méthodes d'analyse en LCMS et GCMS

La méthode d'analyse en LCMS ainsi que la méthode d'analyse en GCMS ont été validées selon les recommandations de l' « Internation Conference on Harmonisation (ICH)» portant sur la validation des méthodes analytiques[151]. Microsoft Office Excel 2010 a été utilisé pour les calculs de statistiques.

Dans le cadre de la validation, plusieurs critères ont été évalués :

11.3.1 Linéarité des courbes étalon et leur intervalle de validité

Les courbes étalon ont été obtenues en calculant les aires (A) des pics relatives (A galanthamine ou lycorine / A hyoscyamine) en fonction des concentrations (C) relatives (C galanthamine ou lycorine / C hyoscyamine):

A_i / A_H ou $H_i / H_H = f(C_i / C_H)$.

L'intervalle de linéarité est ensuite déterminé.

11.3.2 Limite de détection (LDD) et limite de quantification (LDQ)

Des solutions standard de galanthamine et de lycorine obtenues par dilutions successives, ont été injectées afin de déterminer les LDD et LDQ des méthodes d'analyse.

11.3.3 Répétabilité des méthodes d'analyse

Afin de déterminer la répétabilité des méthodes LC et GC, les étalons ont été injectés trois fois. Les moyennes et les écarts type ont été calculés pour chaque concentration.

11.3.4 Spécificité des méthodes d'analyse

Afin de vérifier la spécificité de la méthode, des quantités connues de galanthamine, de lycorine et d'hyoscyamine ont été ajoutées aux extraits de bulbilles de *L. aestivum*. La pureté des pics de galanthamine, de lycorine et d'hyoscyamine obtenus en injectant les extraits de bulbilles en LCMS et en GCMS a été vérifiée. Les spectres de masse, les temps de rétention ainsi

que les index de rétention étaient comparés à ceux obtenus à partir des standards.

11.3.5 Justesse des méthodes d'analyse

Pour estimer la justesse, des quantités connues du standard de galanthamine ont été ajoutées aux extraits méthanoliques de bulbilles de *L. aestivum* (V = 1 mL) exempts de galanthamine. Pour la méthode LC, 10, 20, 30 et 40 µg de galanthamine ont été ajoutés. Pour la méthode GC, 20, 30 et 40 µg de galanthamine ont été ajoutés. Trois échantillons par condition ont été injectés. Les moyennes ainsi que les écarts type des taux de récupération ((Valeur obtenue / Valeur réelle) x 100) ont été calculés.

12 Isolement d'endophytes à partir de bulbes et bulbilles de trois genres d'Amaryllidaceae

La recherche d'endophytes a été réalisée à partir de trois genres d'Amaryllidaceae : *G. elwesii*, *N. pseudonarcissus* et *L. aestivum*. Des explants primaires prélevés à partir de la partie centrale des bulbes *in vivo* ainsi que des explants provenant des cultures *in vitro* ont été étudiés.

Toutes les étapes de décontamination et de culture des explants ont eu lieu dans un environnement stérile sous une hotte à flux laminaire (ADS de type U12, débit en charge environ 100 Pa) d'une manière aseptique à l'aide d'instruments (pinces, scalpels, spatules, anse métallique) stérilisés dans un four à 220°C pendant 120 min et flambés avant utilisation.

12.1 Types de tissus prélevés

L'expérience a été conduite sur des explants provenant de bulbes *in vivo*, de bulbilles âgées de 24 mois et de cals issus de la culture *in vitro*. Dans le premier cas, les explants ont été prélevés à partir da la partie centrale du bulbe, ce qui correspond à la zone la moins contaminée par les microorganismes de la rhizosphère. Dans le second cas, des explants de bulbilles ont été prélevés. Cependant, pour *L. aestivum*, des explants *in vitro* provenant des racines, des bulbilles, des feuilles et des cals ont été prélevés. Par manque de matériel *in vitro*, ce genre de dépistage a pu être

réalisé pour *N. pseudonarcissus* et *G. elwesii* uniquement sur des explants provenant de bulbilles.

12.2 Décontamination de surface des explants provenant de bulbes *in vivo*

La surface des explants provenant de cultures *in vitro* est considérée stérile puisque les cultures *in vitro* n'étaient pas contaminées. Concernant les explants primaires provenant de bulbes *in vivo*, ils ont été stérilisés selon le protocole de stérilisation décrit dans le paragraphe 4.1 de ce chapitre.

12.3 Le test de stérilité

Une fois stérilisés, les tissus ont été séchés à l'air libre sous une hotte à flux laminaire puis découpés en explants de 3 à 5 mm de longueur et mis en culture sur un milieu MS convenable pour la croissance des tissus végétaux. Les cultures ont été maintenues à 25 ± 2°C et à l'obscurité pendant trois semaines. Si au bout de cette période aucune contamination n'apparaît, la surface des explants est considérée stérile.

12.4 Transfert des explants sur des milieux de culture généraux

Les explants primaires décontaminés ainsi que les explants provenant de la culture *in vitro* ont été transférés sur des milieux de culture généraux NA (Nutrient Agar) et PDA (Potato Dextrose Agar) contenant ou non des antibiotiques et permettant le développement des endophytes (Tableau 6). Le milieu NA est considéré adapté à la croissance des bactéries et le milieu PDA permet le développement des champignons.

Tableau 6 : Conditions d'isolement des endophytes

in vivo / *in vitro*	Genre-espèce	Origine des explants	Milieux de culture
Bulbes *in vivo*	*L. aestivum*	La partie centrale des bulbes	Culture sur milieux PDA et NA en présence et en l'absence de chloramphénicol
	G. elwesii		
	N. pseudonarcissus		
Bulbilles *in vitro*	*L. aestivum*	Les racines Les bulbilles Les feuilles Les cals	Culture sur milieux PDA et NA en présence et en l'absence de chloramphénicol
	G. elwesii	Les bulbilles	
	N. pseudonarcissus	Les bulbilles	

12.4.1 Préparation des milieux de culture

Afin d'inhiber la croissance de bactéries pouvant gêner la croissance d'éventuels endophytes fongiques, une série de milieux (NA et PDA) contenant du chloramphénicol à 0,5 g/L a été préparée.

Les milieux de culture ont été autoclavés à 120°C sous une pression de 1 bar et ont été coulés dans des boîtes de pétri stériles de façon aseptique sous une hotte à flux laminaire.

Tableau 7: Composition des milieux de culture NA et PDA.

	Produits	Quantités (g)
Pour 1 L de milieu NA	Peptone	5
	Extrait de levure	3
	NaCl	5
Pour un milieu solide	Agar agar	15
	pH 6,8	
Pour 1 L de milieu PDA	Pomme de terre	200
	Glucose	20
Pour un milieu solide	Agar agar	15
	pH 5,6	

13 Identification des bactéries endophytes

L'identification des bactéries dépend de plusieurs facteurs, parmi lesquels: la morphologie de la colonie et de la cellule, la composition chimique des parois cellulaires, les activités biochimiques, les besoins nutritifs et l'information génétique.

13.1 Isolement bactérien

En vue d'une bonne identification bactérienne, il faut avoir une culture pure de colonies isolées. Pour cela, la souche doit être multipliée sur un milieu gélosé de manière à l'isoler. La méthode la plus utilisée est celle des quadrants (Figure 29).

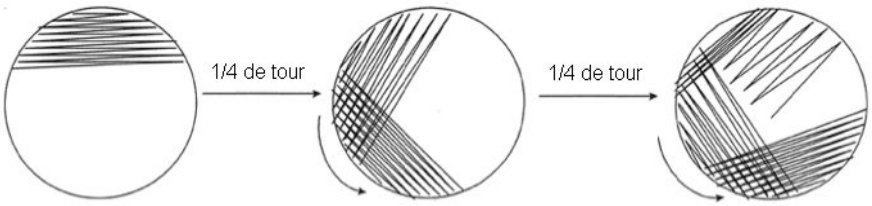


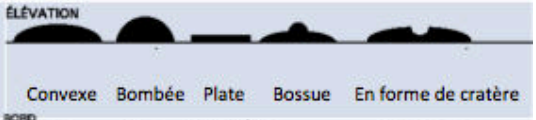
Figure 29 : Méthode d'ensemencement par quadrants[152].

13.2 Description morphologique des colonies isolées et des cellules

La première étape du diagnostic bactérien d'une souche est la description macroscopique des colonies isolées. Chaque colonie a ses caractéristiques de taille, forme, bords, degré d'opacité et couleur (Tableau 8).

Lorsqu'on observe au microscope optique des bactéries on reconnaît rapidement la forme des cellules et les arrangements ou groupements qu'elles constituent entre elles (Tableau 8).

Tableau 8 : Description morphologique des colonies et des cellules bactériennes.

Description morphologique des colonies	La forme	
	Le relief	
	Le contour	
	La surface	Lisse ou rugueuse 
	La taille	colonie punctiforme: diamètre d < 1 mm petites colonies: 1 ≤ d ≤ 2 mm colonies moyennes: 3 ≤ d ≤ 5 mm grosses colonies: d > 5 mm colonies envahissantes: taille non mesurable
Description microscopique des cellules	La forme	Cocci  Bacilles 
	L'arrangement	

13.3 Test de Gram

Dans la méthode de Gram, qui est basée sur la capacité de la cellule à retenir le cristal violet, ce sont les propriétés de la paroi bactérienne qui sont mises en évidence. Ainsi les bactéries ayant une simple paroi seront dites bactéries à gram positif (+) et les bactéries pourvues d'une membrane externe supplémentaire seront dites à gram négatif (-).

Pour des résultats précis, les bactéries doivent être jeunes (âgées de moins de 24 h). Une goutte d'eau stérile est placée sur une lame en verre et une petite quantité de la colonie bactérienne est prélevée à l'aide d'une anse stérile et bien étalée sur la lame de façon à obtenir une fine couche. Les bactéries sont ensuite fixées en passant la lame dans la flamme du bec bunsen. Les étapes de la coloration de Gam sont détaillées ci-dessous (pour la préparation des solutions de coloration cf. l'annexe 2) :

- La première étape est la coloration avec le cristal violet qui colorie le cytoplasme des bactéries en violet. La lame est couverte avec la solution de cristal violet pendant 60'' puis rincée avec un filet d'eau distillée.

- La deuxième étape consiste à fixer la coloration avec l'iodine. Celle-ci forme un complexe avec le cristal violet ce qui permettra à la coloration de résister aux rinçages au cours des prochaines étapes. La lame est couverte avec la coloration au lugol pendant 30'' et puis rincée avec un filet d'eau distillée.

- Ensuite, un rinçage à l'éthanol permet de décolorer le cytoplasme des bactéries gram (-) en dissolvant les lipides de leur membrane externe. La décoloration est arrêtée quand le filet de solvant coulant sur la lame n'est plus coloré. La lame est rincée avec de l'eau distillée.

- La dernière étape est une recoloration des bactéries gram (-) avec la safranine. La lame est couverte avec la solution de safranine pendant 20'' puis rincée avec de l'eau distillée.

La lame est ensuite séchée. Sous microscope, les bactéries gram (+) apparaitront en violet et les bactéries gram (-) en rose.

13.4 Identification biochimique: les galeries API®

Pour l'identification biochimique des bactéries, les galeries API® 20 E™ ont été utilisées. C'est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et d'autres bacilles à gram négatif. Dans le coffret acheté chez BioMérieux (réf. 20 100) on trouve les galeries, les boîtes d'incubation, les fiches de résultats, et la notice.

La galerie API® 20 E™ comporte 21 tests miniaturisés dont 5 nécessitant l'ajout de réactifs. Pour cela, un coffret de réactifs (réf. 20 120) contenant les réactifs TDA, JAMES, VP1 et VP2, NIT1 et NIT2 a aussi été obtenu chez BioMérieux.

Pour la réalisation du test, on commence par la préparation de la galerie API®. Le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation sont réunis et 5 mL

d'eau stérile sont répartis dans les alvéoles de la boîte afin de créer une atmosphère humide. La galerie est placée dans la boîte d'incubation. Deuxièmement, une colonie bactérienne de la souche à identifier est prélevée à partir d'une culture jeune (âgées de moins de 18-24 h) et mise en suspension dans 5 mL d'eau stérile. Ensuite, l'inoculation de la galerie se fait en remplissant les 20 tubes. Pour les tubes CIT, VP et GEL la cupule des tubes est aussi remplie par la suspension bactérienne. Pour les tubes ADH, LDC, ODC, H_2S et URE la cupule est remplie par de l'huile de paraffine afin de créer des conditions d'anaérobiose. Finalement, la boîte d'incubation est fermée, et incubée à 36°C ± 2°C pendant 18 à 24 h.

Une fois les tests réalisés, la lecture des résultats se fait en se référant au Tableau de Lecture fournit par le fabriquant. La lecture des résultats des réactions spontanées (ne nécessitant pas l'ajout de réactifs) se fait en premier, puis celle des autres réactions. Pour le test TDA, une goutte du réactif TDA est ajoutée dans le tube correspondant. Pour le test IND, une goutte du réactif de JAMES est ajoutée dans le tube IND. Finalement, le test VP est lu après ajout d'une goutte des réactifs VP1 et VP2.

Les résultats des tests sont inscrits sur la fiche de résultats (fournie par le fabriquant) où les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée. Un code à 7 chiffres est obtenu en additionnant les valeurs des tests positifs à l'intérieur de chaque groupe. Ce code est ensuite recherché dans le catalogue analytique API® 20 E™ (réf. 20 190). Cependant, si le code à 7 chiffres n'est pas suffisant pour l'identification, plusieurs tests complémentaires peuvent être réalisés sur la même galerie. Nous en retiendrons un : test de réduction des nitrates en nitrites et en azote. Pour la réalisation de ce test, une goutte des réactifs NIT1 et NIT2 sont ajoutées dans le tube GLU. Une coloration rouge après 2-5 min indique une réaction positive (NO_2). Une réaction négative peut être due à la production d'azote. 2 à 3 mg de poudre de zinc sont ajoutés dans le tube GLU. Le résultat est lu en se référant au Tableau de Lecture.

13.5 L'identification moléculaire: PCR du gène codant l'acide ribonucléique ribosomique (ARNr) 16S

Le séquençage du gène codant l'ARNr 16S puis la comparaison de la séquence obtenue à celles présentes dans une base de données est la

technique couramment utilisée pour l'identification moléculaire des souches bactériennes.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) mise au point en 1985 par Karry Mullis, est une technique d'amplification génétique *in vitro*. La PCR consiste en une succession de réactions de réplications d'une matrice double brin d'ADN. Dans un même tube PCR, l'ADN double brin (ou dans notre cas une suspension bactérienne), les amorces r et f (reverse et forward), les désoxyribonucléotides A, T, C, G (adénine, thymine, cytosine, guanine) et la Taq polymérase sont mélangés ensemble (Tableau 9). La Taq polymérase, le tampon, les bases azotées et les amorces r et f ont été obtenus chez MPbio. Les séquences du couple d'amorces sont les suivantes :

ardraf : GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
ardrar : CTACGGCTACCTTGTTACGA

Tableau 9 : Préparation du mélange réactionnel de la PCR (le volume de réaction final est de 25 µL).

Composants	Volume (µL)	Concentration finale
Eau ultrapure stérile	17,175	Qsp 25 µL
Tampon de la Taq polymérase (10X)	2,5	10 mM Tris HCl pH8 100 mM KCl 1,5 mM $MgCl_2$ 0,01% Triton X-100 0,2 mg/mL BSA
dNTP (25 mM)	0,2	200 µM
Amorce r (10 µM)	1,25	0,5 µM
Amorce f (10 µM)	1,25	0,5 µM
Taq polymérase	0,125	0,6 U

La préparation du mélange réactionnel pour la PCR s'est faite sous une hotte réservée uniquement à cet usage en utilisant des gants propres. Le matériel utilisé (cônes de micropipettes, tubes eppendorff) a été stérilisé par autoclavage avant utilisation.

La suspension bactérienne a été directement ajoutée dans le tube contenant le mélange réactionnel de la PCR sans extraction préalable de l'ADN. Le mélange a été homogénéisé au vortex (Vf=22,5 µL) et placé dans le tube eppendorff. Pour chaque souche à identifier, deux tubes ont été préparés (un renfermera la suspension bactérienne sans dilution et l'autre avec dilution).

Avec le bout d'un cône stérile, une petite quantité d'une colonie isolée de bactéries a été prélevée et suspendue dans 100 µL d'eau ultrapure stérile. La suspension bactérienne a été mélangée au vortex. C'est la suspension sans dilution à partir de laquelle la suspension diluée a été préparée. 10 µL de la suspension ont été prélevés et ajoutés à 90 µL d'eau stérile. La suspension bactérienne diluée est mélangée au vortex. Un volume de 2,5 µL a été prélevé de chacune des deux suspensions bactériennes préparées et ajoutés au mélange réactionnel dans les tubes PCR. Le volume final de la réaction PCR était de 25 µL.

Chaque cycle de PCR est constitué de 3 phases différentes nécessitant 3 températures différentes : la dénaturation du double brin d'ADN, l'hybridation des amorces et l'élongation :

1- La dénaturation du double brin d'ADN : A cette température, les liaisons faibles qui assuraient la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour générer deux simples brins d'ADN.
2- L'hybridation des amorces sur l'ADN : Cette étape concerne le principe de l'appariement des bases complémentaires. La température d'hybridation est calculée en fonction de la longueur et de la séquence des amorces.
3- L'élongation : Les amorces hybridées à l'ADN servent de point de départ à la polymérisation du brin d'AN néosynthétisé complémentaire à l'ADN matrice.

A la fin du premier cycle, le nombre de doubles brins d'ADN obtenus est égal au double du nombre de brins initialement présents. Au cours du deuxième cycle, chaque brin servira à son tour de matrice. Ainsi, le nombre de doubles brins obtenus au bout du deuxième cycle doublera par rapport au premier cycle et ainsi de suite. Au bout de n cycles, le nombre de doubles brins est égal à 2^n.

Les tubes ont été placés dans un thermocycleur avec le programme PCR suivant (Tableau 10):

Tableau 10 : Conditions d'amplifications PCR du gène codant pour l'ARNr 16S.

Etape	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94°C	4'	1 cycle
Dénaturation	94°C	1'	34 cycles
Fixation des amorces	55°C	1'	
Elongation	72°C	2'	
Elongation terminale	72°C	15'	1 cycle

Après amplification, les tubes ont été conservés à -20°C jusqu'à leur envoie au séquençage. Le séquençage a été fait par le laboratoire GATC Biotech (Allemagne).

14 Extraction des alcaloïdes à partir des souches endophytes

14.1 Culture liquide des souches bactériennes endophytes

Les cultures ont été conduites dans des Erlenmeyers de 250 mL. Une colonie isolée de chaque souche a été mise en culture dans 50 mL de milieu NA liquide. Les cultures ont été incubées à 32°C, à l'obscurité et avec une agitation orbitale de 120 rpm.

14.2 Extraction des alcaloïdes à partir des cultures bactériennes liquides

Aux termes de la période d'incubation (72 h), les cultures ont été arrêtées. Elles ont été centrifugées à 10°C pendant 10 min à 10 000 rpm. Les milieux de culture ont été séparés des culots bactériens et placés à -20°C. Après congélation, les milieux ont été lyophilisés à -52°C pendant 48 h. Les

culots bactériens, quant à eux, ont été extraits avec 61% d'éthanol pendant 24 h intercalées d'1 h 30 min de sonication.

15 Criblage des alcaloïdes

Après l'extraction, le macérât a été centrifugé à 10 000 rpm pendant 10 min. Le surnageant a été récupéré. L'éthanol a été retiré par évaporation rotative et l'eau par lyophilisation. Le produit sec a été redissout dans un volume précis de méthanol.

15.1 Analyse des alcaloïdes par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Les extraits ont été premièrement analysés par CCM. Les dépôts ont été réalisés sur une plaque de silice (ALURGAM® SIL G/UV_{254}) puis séchés. La plaque a été placée dans un bac pour CCM saturé en vapeurs de solvant et contenant la phase mobile : Acétate d'éthyle : acide acétique : acide formique : eau (10 mL:1,1 mL:1,1 mL:2,7 mL, v : v).

Après migration, la plaque a été examinée sous lumière UV (254 nm et 365 nm). Elle a été révélée au réactif de Dragendorff (la composition du réactif figure dans l'annexe 3).

15.2 Tests complémentaires de détection d'alcaloïdes

Pour s'assurer de la présence d'alcaloïdes, les extraits ont été dissouts dans de l'eau acide (2% H_2SO_4). Ensuite, la phase aqueuse a été divisée en deux fractions. Une goutte du réactif de Bouchardat a été ajoutée à la première fraction et une goutte du réactif de Mayer à la deuxième (les compositions de ces réactifs figurent dans l'annexe 3).

16 Identification des alcaloïdes

16.1 Analyse des alcaloïdes par chromatographie sur couche mince couplée à la spectrométrie de masse (HPTLC-ESI-MS)

Les échantillons ont été analysés par HPTLC-MS en utilisant l'appareil semi-automatique CAMAG Linomat 5 et l'interface de couplage à la spectrométrie de masse CAMAG TLC-MS Interface. Des volumes précis de chaque échantillon (10, 15 et 20 µL) et des standards (galanthamine, lycorine et hyoscyamine) ont été déposés sur les plaques (HPTLC Silica gel 60 F_{254}, 20 x 10 cm MERCK) à l'aide de l'appareil (CAMAG Linomat 5) dirigé par le logiciel WinCATS. La phase mobile utilisée avait la même composition que celle décrite dans le paragraphe précédent.

Après migration, la lecture des plaques a eu lieu sous UV (254 et 365 nm). Les tâches sélectionnées ont été ensuite analysées par spectrométrie de masse à l'aide de l'interface CAMAG-TLCMS. Le spectromètre de masse utilisé est un U3000- Dionex MicroTOFLC™- System (Bruker Daltonics), l'ionisation se fait en mode ESI dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

16.2 Purification des alcaloïdes

Dans le but d'identifier les alcaloïdes produits par les bactéries endophytes, on a procédé tout d'abord à leur purification. Pour cela, l'appareil CombiFlash RF® a été utilisé. Cet appareil permet de séparer sous pression les différents composés d'un mélange selon le principe de chromatographie flash (phase stationnaire à particules plus fines et élution sous pression). Cet appareil est muni d'un détecteur UV permettant d'identifier la présence ou non de composés dans l'éluat. La modification de l'absorbance de l'éluat entraîne automatiquement le changement de tube récepteur.

La phase stationnaire utilisée est une colonne de silice préremplie (Reveleris® Silica Flash Cartridge (40 µm) 12 g, 5146131). La phase mobile utilisée est constituée d'un mélange d'acétate d'éthyle : acide acétique : acide formique : eau (100 mL:11 mL:11 mL:27 mL, v : v). L'élution s'est faite

de manière isocratique. Elle a duré 60 minutes. Le débit d'élution était fixé à 20 mL/min. Le détecteur UV détectait à 250 et à 365 nm.

Partie 4 : Résultats et Discussions

Chapitre 1 : Mise au point et validation des méthodes chromatographiques

Dans le but de comparer deux méthodes de purification des extraits alcaloïdiques (liquide-liquide ou SPE) et de quantifier les pertes liées à l'étape de purification, les extraits purifiés ont été injectés en GCMS. Cependant, pour la quantification des alcaloïdes (notamment la galanthamine et la lycorine) contenus dans les extraits purifiés de bulbes, bulbilles et milieux de culture de *L. aestivum* et *L. aestivum* 'Gravety Giant' issus des cultures *in vitro*, les échantillons ont été analysés par LCMS et GCMS. Un étalon interne, l'hyoscyamine, a été employé. Sa concentration dans les échantillons injectés en GCMS était de 20 µg/mL, tandis que dans les échantillons injectés en LCMS, elle était de 2 µg/mL.

La spectrométrie de masse (MS) est la technique d'analyse choisie pour nos échantillons. L'intérêt de cette technique est la détermination des masses des molécules présentes dans l'échantillon à étudier. Pour cela, les composés à analyser sont transformés en ions (mono- ou poly-chargés), qui sont soumis à l'action d'un champ électrique sous vide. Les rapports masse/charges (m/z) des ions, et par conséquent leur nature, sont déterminés. Le concept de la MS repose sur la succession de 4 étapes majeures : L'ionisation des molécules et passage en phase gazeuse, l'accélération des ions formés, leur séparation et leur détection[153] (Figure 30).

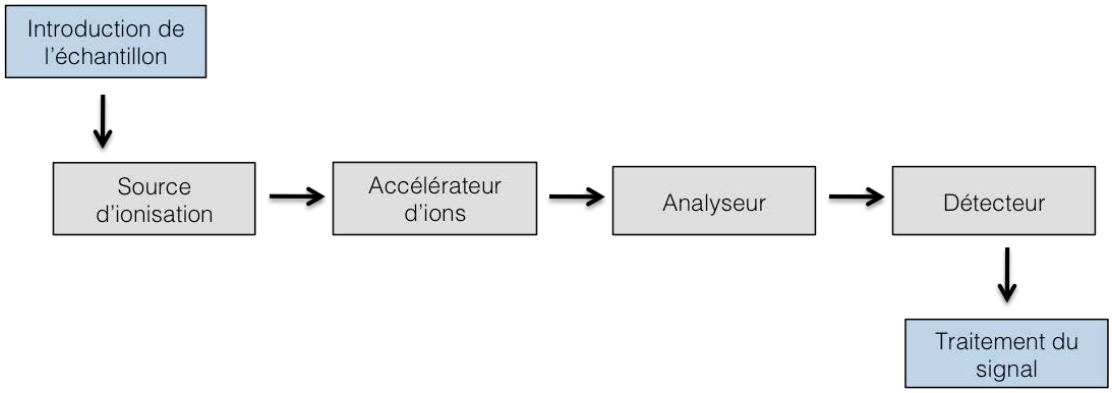


Figure 30 : Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse.

L'échantillon sous forme liquide (en sortie de LC) ou sous forme gazeuse (en sortie de GC) arrive au niveau de l'interface chromatographe/spectromètre de masse. Au niveau de la source d'ionisation, et dans le cas d'un échantillon liquide, la phase liquide est transformée en une phase gazeuse ou en vapeur. A ce niveau, les molécules seront ionisées et/ou fragmentées en ions[153]. Les sources d'ionisation utilisées sont l'ionisation par l'intermédiaire de spray (ESI) dans le cas de la LCMS et l'ionisation par impact électronique (EI) dans le cas de la GCMS. Les ions formés chargés positivement, dans notre cas, sont transférés grâce à des champs électriques au niveau de la zone de transfert des ions. Les ions sont focalisés et accélérés par des lentilles électroniques et arrivent dans l'analyseur. A ce stade, ils sont séparés suivant leur rapport m/z. Finalement, les ions frappent le capteur du détecteur dont le signal est proportionnel aux charges des ions reçus.

1 La méthode LC-ESI-MS

Les analyses en LCMS ont été réalisées à l'aide d'un appareil U3000-Dionex équipé d'une colonne Acclaim MIXED MODE HILIC-1 ID 2,1 mm (150 mm x 5 µm x 120 Å). Ce type de colonne est constituée d'une phase stationnaire à base de silice greffée qui combine à la fois les avantages des phases inverses RP et des phases à interaction hydrophile HILIC. En effet, le greffon consiste en une chaîne alkyle hydrophobe avec un groupement diol en sa terminaison (Figure 31). La chaîne hydrophobe assure une rétention en phase inverse et le groupement hydrophile facilite les interactions hydrophiles. La colonne fonctionnant ainsi en mode mixte, assure une meilleure sélectivité que les colonnes à phase inverse traditionnelles, une meilleure performance que les colonnes à base de diols conventionnelles et une meilleure séparation.

El Tahchy et al.,[12] utilisaient une colonne C18 pour l'analyse en LCMS des extraits méthanoliques bruts de bulbes d'Amaryllidaceae (non purifiés). Le programme d'élution était long (45 min) et les alcaloïdes étaient élués entre 25 et 33 minutes. Un nouveau programme d'élution a été utilisé. Il est décrit dans le paragraphe 11.1 du chapitre Matériels et Méthodes.

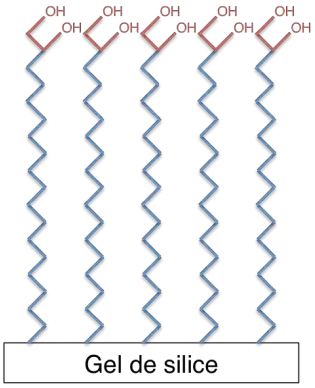


Figure 31 : Phase stationnaire d'une colonne Mixed Mode HILIC. Le greffon comporte une chaîne alkyle et un groupement diol.

Le type d'ionisation utilisé est l'ionisation par elctrospray ou ionspray (ESI). C'est le type d'ionisation à pression atmosphérique le plus communément utilisé (Figure 32). La source est placée en sortie de LC et transforme la phase mobile en un fin brouillard aqueux contenant les composés à analyser. Des gouttelettes se forment à l'extrémité d'un fin capillaire de silice, métallisé en surface et porté à un potentiel élevé positif de 4,5 KV puisque nous étudions des ions positifs. La phase mobile rencontre ensuite le gaz de nébulisation N_2 (ayant un débit de 4L/min) et se transforme en spray. Les analytes contenus dans la phase mobile acquièrent à ce stade une charge. Les ions ainsi formés sont porteurs d'un nombre de charges variables. La phase mobile contient des ions H^+ et des cations tels le Na^+. Ainsi on obtiendra des ions de masse M (correspondant à la masse moléculaire du composé initial) porteurs de H^+ ou de Na^+ ($[M+H]^+$ ou $[M+Na]^+$). Ce type d'ionisation permet de générer une ionisation « douce », permettant d'éviter une fragmentation de nos espèces lors de l'analyse.

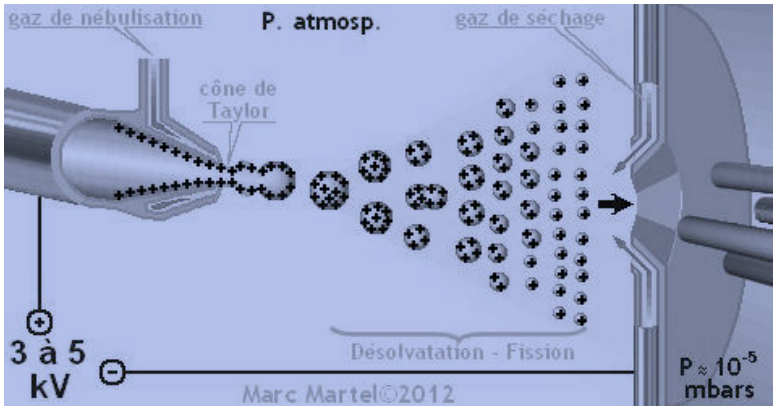


Figure 32 : Ionisation par electrospray (ESI) : à pression atmosphérique, la phase mobile est nébulisée. Les molécules sont ionisées et des ions moléculaires sont majoritairement obtenus[154].

Les ions produits sont transmis vers l'analyseur *via* une interface qui a trois rôles : premièrement, elle assure le transfert des ions d'une pression atmosphérique (au niveau de la source) vers un vide poussé (au niveau de l'analyseur). Elle permet aussi de focaliser le faisceau d'ions en les accélérant sous l'effet d'une différence de potentiel et de terminer le processus de désolvatation. Sous l'effet du gaz de désolvatation N_2 (toujours à un débit de 4L/min) les gouttelettes s'évaporent progressivement en perdant des molécules de solvant. Leur densité de charge devenant importante, les gouttelettes explosent en libérant les ions. Seuls les ions positifs, dans le cadre de nos études, passent dans l'analyseur maintenu sous un vide poussé[153] (<10^{-5} mBars).

Le spectre de masse utilisé est un micrOTOF-Q ™ (Bruker) qui associe, à la fois, un premier analyseur quadripôle, une chambre de collision et un deuxième analyseur à temps de vol TOF (Time of Flight) montés en série. Outre la précision sur la masse moléculaire qu'apporte cette succession d'analyseurs, elle nous permet une détermination structurelle des espèces observées (MS^n).

Le quadripôle soumet les ions chargés sous un champ électrique et utilise des filtres quadripolaires pour trier les ions. Un quadripôle est formé de quatre barres métalliques parallèles. Les barres opposées sont portées au même potentiel électrique tandis que les potentiels électriques entre deux barres voisines sont opposés. Le quadripôle laisse passer seulement les ions ayant un rapport m/z qui correspond aux rapports m/z sélectionnés. Ainsi, certains ions entreront en contact avec les barres (« non résonant ion ») et d'autres auront une trajectoire leur permettant de passer entre les barres (« résonant ion ») et seront détectés[153] (Figure 33).

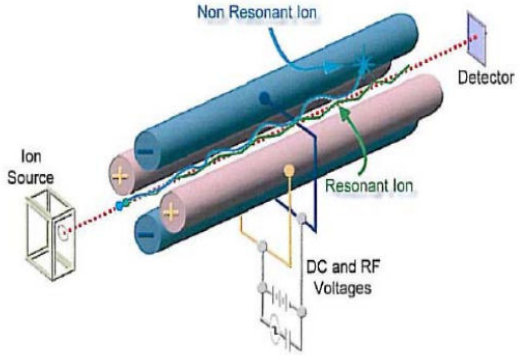


Figure 33 : Représentation d'un analyseur de type quadripôle[155].

Les ions de différentes tailles arrivent au même moment au niveau du TOF où la séparation se fait, au moyen d'un accélérateur orthogonal, par rapport au temps. Ainsi, le temps mis par les ions pour traverser dans le vide une distance L sans champ est lié à leur massr molaire et à leur charge. Le principe de cet analyseur repose sur la relation qui existe entre la masse et la vitesse des ions. Les ions ayant la masse la moins importante seront détectés en premier[153].

Un des paramètres importants définissant la performance d'un spectromètre de masse est le pouvoir de résolution (R). Ce paramètre représente la capacité de l'analyseur à séparer deux rapports m/z voisins. Il est calculé en divisant m qui est la masse du pic choisi par Δm qui désigne la plus petite différence de masse pour laquelle il est encore possible de séparer le pic m du pic m + Δm. Ainsi, plus les pics du spectre sont étroits, plus des masses voisines pourront être distinguées. Avec les appareils dits « basse résolution », le spectre obtenu à une résolution (et non un pouvoir de résolution) qui vaut exactement 1 u (on distingue le pic 30 du pic 31). Par contre, avec les appareils « haute résolution », la résolution est de 5 mDa.

Dans notre cas, on cherche à identifier et à quantifier deux composés de masses moléculaires très proches (287,36 g/mol et 287,32 g/mol pour la galanthamine et la lycorine respectivement), d'où l'importance de travailler avec un appareil haute résolution (HRMS).

1.1 Validation de la méthode LC-ESI-MS

La validation de la méthode a été faite selon les recommandation de l' "International Conference on Harmonisation (ICH) » portant sur la validation des méthodes analytiques[151]. Microsoft Office Excel 2010 a été utilisé pour les calculs de statistiques.

1.1.1 Etalonnage interne

Dans le but de doser les quantités « exactes » de galanthamine et de lycorine présentes dans les extraits, une méthode d'étalonnage en interne a été mise au point. Cette méthode permet aussi de s'affranchir des problèmes liés à l'instrument d'analyse (imprécision sur les volumes injectés, dilutions, détection, etc.) puisque l'étalon interne et le composé à doser sont détectés de la même façon.

Le dosage par étalonnage interne repose sur l'ajout d'une concentration connue d'un composé de référence (appelé étalon interne) dans toutes les solutions étalons et dans tous les échantillons. L'étalon interne doit donc présenter les propriétés suivantes :

- il ne doit pas se trouver initialement dans l'échantillon,
- son pic d'élution doit être bien résolu par rapport aux pics des composés présents dans l'échantillon,
- son temps de rétention doit être proche de ceux des échantillons,
- sa concentration doit être proche de celle des analytes,
- il doit être inerte vis-à-vis des composés de l'échantillon.

L'hyoscyamine, un alcaloïde tropanique (Figure 34), est le composé choisi comme étalon interne. Il présente toutes les propriétés d'un étalon interne et possède des propriétés physico-chimiques proches des alcaloïdes doser.

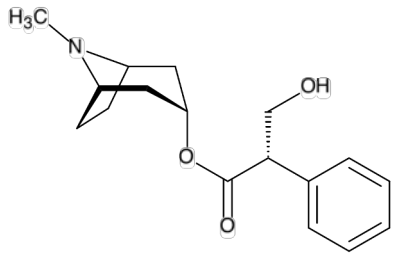


Figure 34 : Structure de l'étalon interne, hyoscyamine.

Une gamme étalon renfermant les standards de galanthamine et de lycorine à huit niveaux de concentration allant de 0,05 µg/mL jusqu'à 75 µg/mL ainsi que le standard d'hyoscyamine à une concentration constante de 2 µg/mL a été préparée et injectée en LCMS (figure 35). Cette méthode d'étalonnage repose sur l'utilisation du coefficient de réponse relatif K de chaque composé à doser vis-à-vis de l'étalon. Le logiciel trace ainsi les courbes étalon des deux composés en calculant l'aire ou la hauteur des pics relative en fonction des concentrations relatives:

Aire ou hauteur du pic relative = f (Concentration relative). Avec la méthode LC, l'aire des pics a été calculée: $A_i/A_E = K_{i/E} (C_i/C_E)$, où :

A_i correspond à l'aire du pic du composé à doser, A_E correspond à l'aire du pic de l'étalon, C_i la concentration du composé à doser et C_E la concentration de l'étalon.

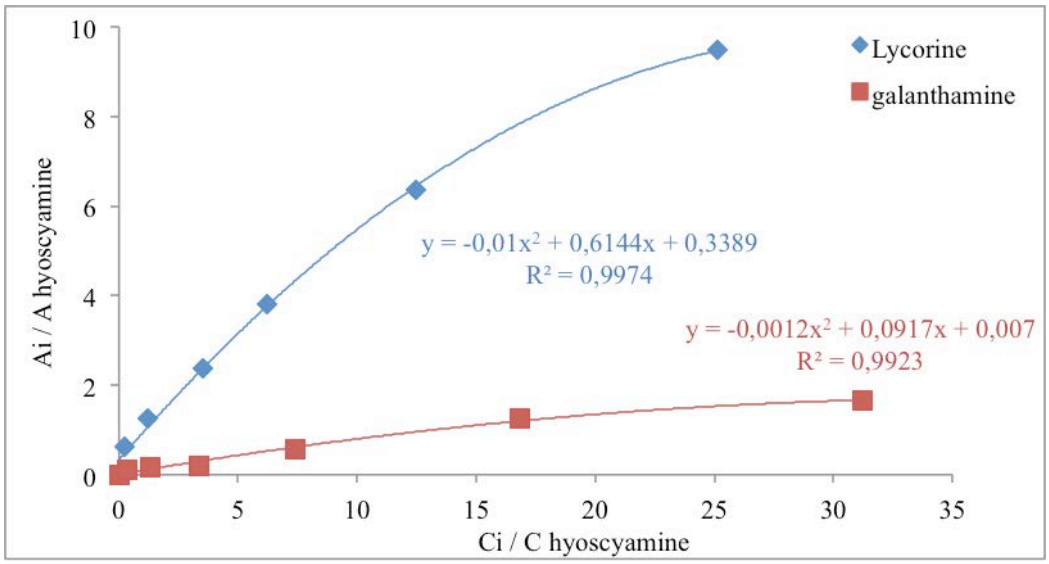


Figure 35 : Courbes étalons de la galanthamine et de la lycorine obtenues en LCMS avec l'hyoscyamine comme étalon interne.

Les courbes obtenues sont des courbes polynomiales du 2nd ordre. Or, une méthode est validée en fonction de la linéarité des courbes étalon. En effet, la linéarité est la capacité d'une méthode à fournir, dans un intervalle donné, des résultats de dosage directement proportionnels à la concentration d'analytes dans un échantillon. Les domaines de linéarité des courbes étalon ont été définis (Figure 36).

Les coefficients de détermination sont satisfaisants et compris entre 0,98 et 0,99. Pour le dosage des alcaloïdes dans les extraits, l'intervalle de validité est compris entre 0,73 et 36,53 µg/mL pour la galanthamine et entre 0,65 et 32,55 µg/mL pour la lycorine.

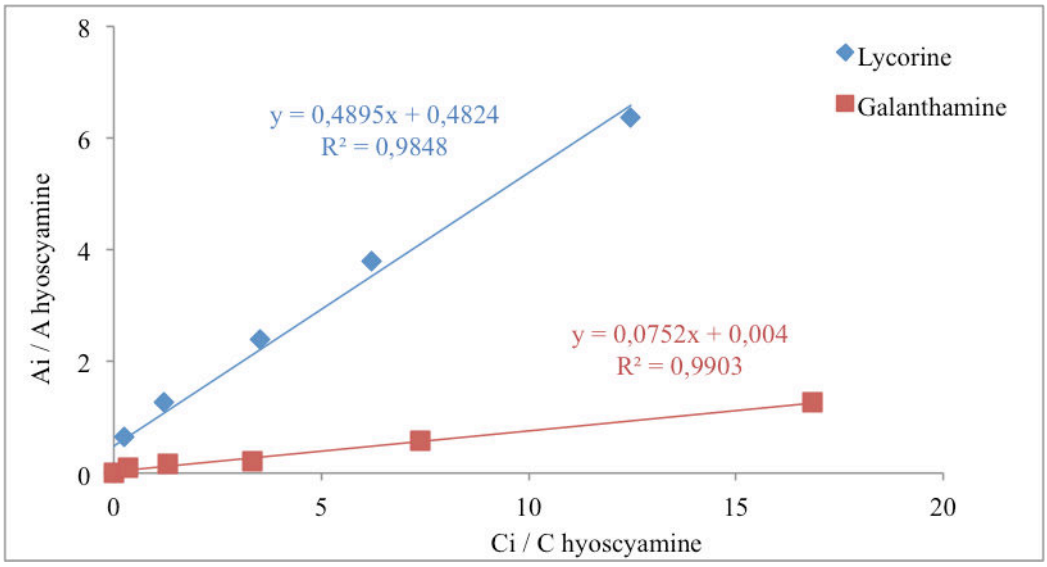


Figure 36 : Domaine de linéarité des courbes étalons obtenues en LCMS.

1.1.2 Limite de détection et de quantification

La limite de détection (LDD) est définie comme la plus petite concentration de substance pouvant être détectée mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la méthode. La limite de quantification (LDQ) est la plus petite concentration pouvant être quantifiée avec une fidélité et une exactitude appropriées dans les mêmes conditions expérimentales. La méthode LCMS possède une LDD de 0,02 µg/mL et une LDQ correspondant à 0,03 µg/mL.

1.1.3 Répétabilité de la méthode

La répétabilité exprime la fidélité de la méthode en injectant le même échantillon dans des conditions opératoires identiques (même expérimentateur, même équipement, etc.), dans un court intervalle de temps et ce de façon répétée.

Afin de déterminer la répétabilité de la méthode LC, les étalons ont été injectés trois fois. La moyenne et l'écart type ont été calculés pour chaque concentration. Un exemple d'analyse figure dans le Tableau 11. Les concentrations en galanthamine, lycorine et hyoscyamine ont été relevées pour l'étalon qui correspond au deuxième point de la courbe étalon ([galanthamine] = 2,47 µg/mL, [lycorine] = 2,33 µg/mL et [hyoscyamine] = 2

µg/mL). D'après les valeurs obtenues, on constate que les écarts type sont faibles. La méthode est donc répétable.

Tableau 11 : Vérification de la répétabilité de la méthode LCMS. L'échantillon injecté renferme la galanthamine, la lycorine et l'hyoscyamine à des concentrations théoriques respectives de 2,47 ; 2,33 et 2 µg/mL.

	Galanthamine (µg/mL)	Lycorine (µg/mL)	Hyoscyamine (µg/mL)
1ère injection	2,474508	2,331081	1,927642
2ème injection	2,493829	2,367481	1,910220
3ème injection	2,244717	2,133916	1,924142
Moyenne	2,4	2,28	1,92
Écart type	0,14	0,12	0,01

1.1.4 Chromatogrammes et spectres de masse en LCMS

Les alcaloïdes contenus dans les extraits ont été identifiés, en se référant à leur standard obtenus chez Sigma-Aldrich, selon deux critères : leur temps de rétention et leur spectre de masse. La lycorine a été éluée à 10,1 ± 0,2 min, la galanthamine à 14,5 ± 0,2 min et l'hyoscyamine à 17,9 ± 0,2 min (Figure 37). La galanthamine a été identifiée grâce à son ion moléculaire $[M+H]^+$ à m/z égal à 288,159 Da. La lycorine et l'hyoscyamine ont montré un ion moléculaire $[M+H]^+$ à m/z égal à 288,124 Da et 290,175 Da respectivement (Figure 38).

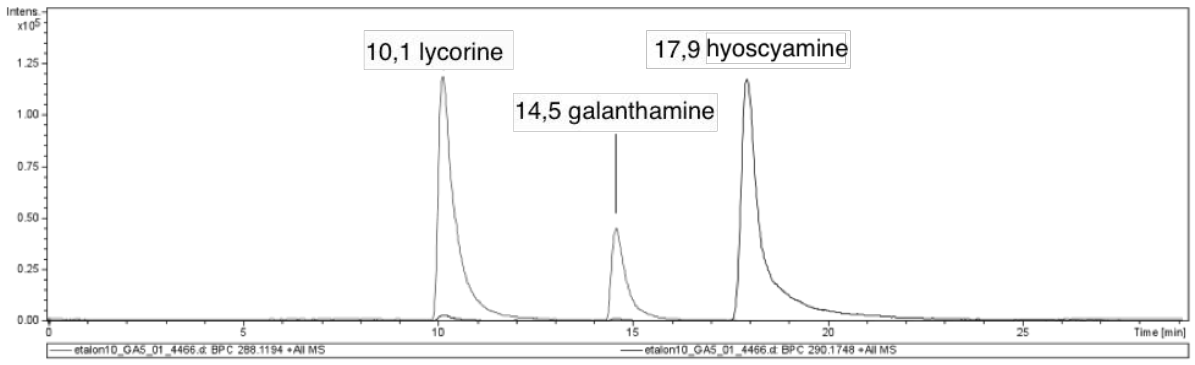


Figure 37 : Chromatogramme LCMS des standards de lycorine (10,1 min), de galanthamine (14,5 min) et d'hyoscyamine (17,9 min).

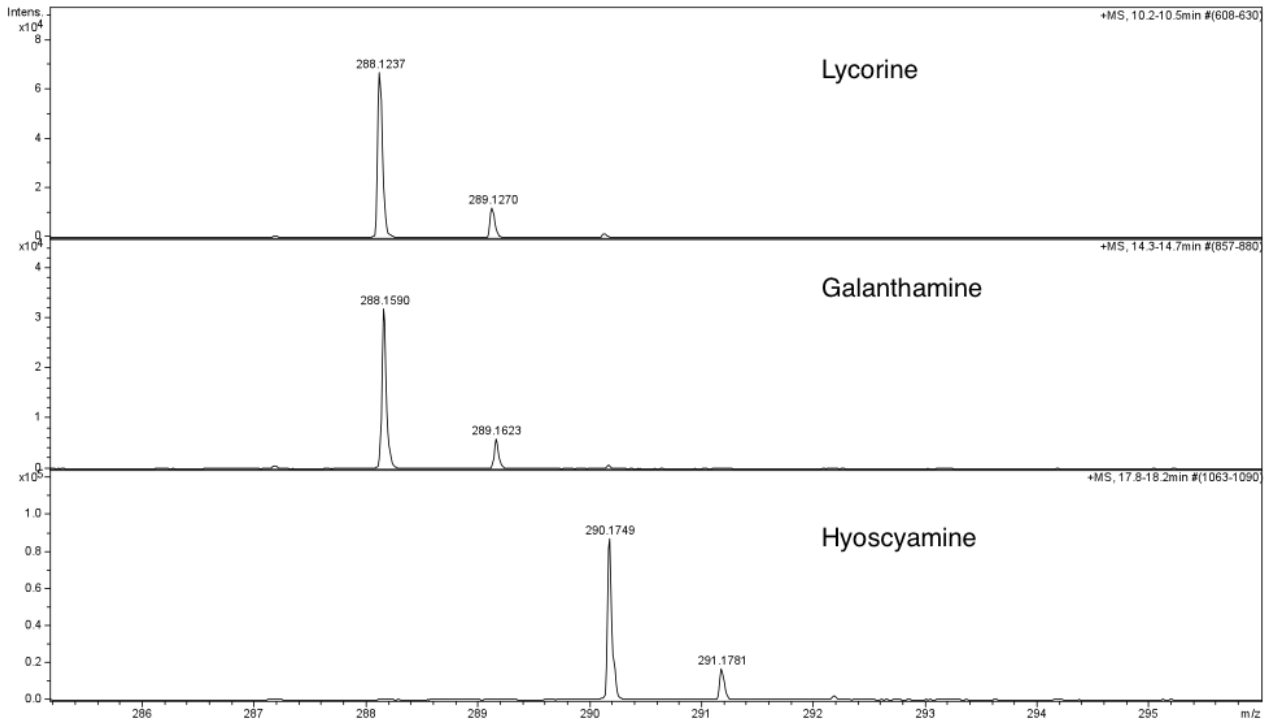


Figure 38 : Spectres de masse des standards de lycorine (adduit proton détécté à 288,124 Da), de galanthamine ($[M+H]^+$ 288,159) et d'hyoscyamine ($[M+H]^+$ 290,175) en LC-ESI-MS.

1.1.5 Spécificité de la méthode

Afin de vérifier la spécificité de la méthode, des quantités connues de galanthamine, de lycorine et d'hyoscyamine ont été ajoutées aux extraits de bulbilles de *L. aestivum*. La pureté des pics de galanthamine, lycorine et d'hyoscyamine obtenus a été vérifiée en injectant les extraits de bulbilles en LCMS. Les spectres de masse, les temps de rétention ainsi que les index de rétention étaient identiques à ceux obtenus à partir des standards. La méthode est alors spécifique, en d'autres termes, elle permet une évaluation non équivoque de l'analyte en présence d'autres composés interférents.

1.1.6 Justesse de la méthode

La justesse est l'étroitesse d'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une série d'essais et une valeur de référence acceptée. Pour estimer la justesse, des quantités connues du standard de galanthamine (10, 20, 30 et 40 µg) ont été ajoutées aux extraits méthanoliques de bulbilles de *L. aestivum* (V = 1 mL) exempts de galanthamine. Trois échantillons par condition ont été injectés. Les moyennes ainsi que les écarts type des taux

de récupération ((Valeur obtenue / Valeur réelle) x 100) ont été calculés. Les résultats sont présentés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Evaluation de la justesse de la méthode LCMS : calcul de la moyenne et de l'écart-type du taux de récupération de la galanthamine. N = 3.

Quantité de galanthamine ajoutée (µg)	Concentration calculée (µg/mL)	taux de récupération (%)	Moyenne	Ecart type
10	9,269981 9,697862 9,453523	92,69981 96,97862 94,53523	94,74	2,15
20	20,429515 20,500094 20,173648	102,147575 102,50047 100,86824	101,84	0,86
30	30,786635 31,526807 29,73054	102,6221167 105,0893567 99,1018	102,27	3,01
40	40,687128 40,973846 39,545607	101,71782 102,434615 98,8640175	101,01	1,89

Les valeurs expérimentales trouvées par l'appareil sont identiques ou très proches des valeurs de référence. La méthode LCMS utilisée permet donc la mesure exacte des quantités d'analytes présents dans les échantillons.

2 La méthode GC-EI-MS

Les alcaloïdes d'Amaryllidaceae ainsi que les alcaloïdes tropaniques peuvent être injectés directement en GC sans une étape de dérivatisation préalable. En effet, ils conservent leur fragmentation caractéristique en EI/MS sous les conditions de GC[156]. Les propriétés physico-chimiques de ces espèces vis-à-vis de la technique d'analyse utilisée, permettent leur étude sans un traitement préalable des échantillons.

L'appareil utilisé est un QP 2010-Shimadzu équipé d'une colonne capillaire SLB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). L'analyse en GC débute à l'instant où une petite quantité de l'échantillon est introduite dans l'injecteur qui a la double fonction de le vaporiser et de l'amener dans le flux gazeux en tête de colonne. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium avec un débit de 0,8 mL/min. Afin d'éviter de saturer la colonne, un injecteur en mode « split » a été utilisé. Avec ce type d'injecteur, un débit de gaz vecteur arrive dans l'insert où il se mélange à l'échantillon. Une vanne de fuite permet de diviser

ce débit en deux fractions dont la plus importante est éliminée de l'injecteur en entraînant une grande partie de l'échantillon. Dans notre cas, le split ratio a été fixé à 1:50. Seule la petite fraction pénètre dans la colonne.

Nous nous sommes basés sur le programme d'élution établi par El Tahchy et al.,[87, 95] auquel on a apporté quelques modifications. Nous avons chercher à réduire le temps d'analyse tout en séparant bien les pics correspondants aux trois composés recherchés : la galanthamine, la lycorine et l'hyoscyamine qui est l'étalon interne nécessaire pour le calcul des taux de récupération. Le programme d'élution figure dans le paragraphe 11.2 du chapitre Matériels et Méthodes.

Le type d'ionisation utilisé est l'impact électronique (EI) qui consiste à provoquer des collisions entre les molécules à analyser (initialement neutres) et des électrons (Figure 39). Lors du choc électronique, les électrons les moins retenus par une molécule M sont arrachés, ce qui conduit à un ion porteur d'une charge élémentaire positive M^+ appelé l'ion moléculaire. Si l'ion moléculaire généré n'est pas stable, il se fragmente en d'autres ions[153]. Ce phénomène est reproductible, c'est pour cela qu'avec ce genre d'analyse, les composés peuvent être identifiés en comparant leur spectre de masse à ceux enregistrés dans une spectrothèque (dans notre cas c'est la librairie NIST08.LIB). L'énergie standard d'ionisation est de 70 eV.

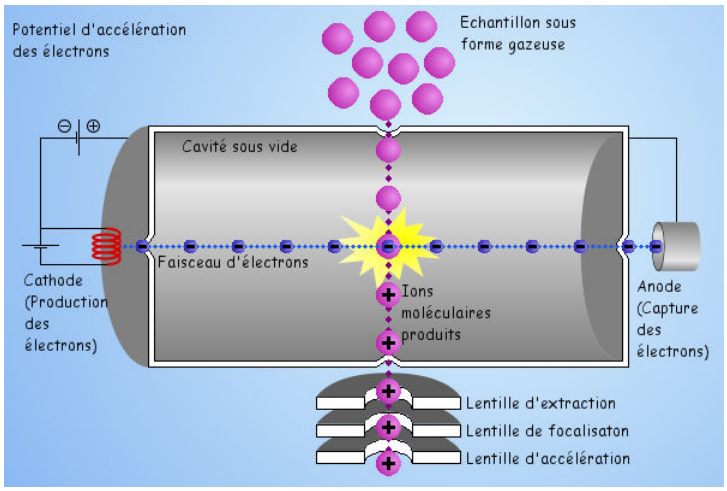


Figure 39 : Ionisation par impact électronique (EI). Les molécules rentrent en collision avec un faisceau électronique et se fragmentent. Les ions moléculaires ainsi que les autres produits de fragmentation passent ensuite dans l'accélérateur[157].

L'analyseur utilisé est un quadripôle. Il soumet les ions chargés à un champ électrique et utilise des filtres quadripolaires pour séparer les ions.

Un quadripôle est formé de quatre barres métalliques parallèles. Les barres opposées sont portées au même potentiel électrique tandis que les potentiels électriques entre deux barres voisines sont opposés. Le quadripôle laisse passer seulement les ions ayant un rapport m/z qui correspond aux rapports m/z sélectionnés[153].

Les analyses quantitatives ont été réalisées avec un mode SIM (Selected ion Monitoring) qui détecte les m/z correspondants aux ions à quantifier. En fait, ce mode est plus sensible que le mode Scan qui sert plutôt dans l'analyse qualitative en couvrant un grand intervalle de m/z.

2.1 Validation de la méthode GCMS

La validation de la méthode a été faite selon les recommandation de l' "International Conference on Harmonisation (ICH) » portant sur la validation des méthodes analytiques[151]. Microsoft Office Excel 2010 a été utilisé pour les calculs de statistiques.

2.1.1 Etalonnage en interne

Une gamme étalon, renfermant les standards de galanthamine et de lycorine à huit niveaux de concentration allant de 0,5 µg/mL jusqu'à 150 µg/mL ainsi que le standard d'hyoscyamine à une concentration constante de 20 µg/mL, a été préparée et injectée en GCMS en mode SIM. La Figure 40 montre les courbes étalons tracées par le logiciel GCMS Solution 2.53. Comme déjà expliqué dans le paragraphe 1.1.1 de ce chapitre, on peut choisir de calculer l'aire des pics relatifs ou leur hauteur. Pour la méthode GCMS, la hauteur des pics a été calculée.

Chaque étalon a été injecté trois fois. Les concentrations et les temps de rétention sont le résultat des moyennes des trois reprises. Les coefficients de détermination sont de 0,99 pour la galanthamine et la lycorine.

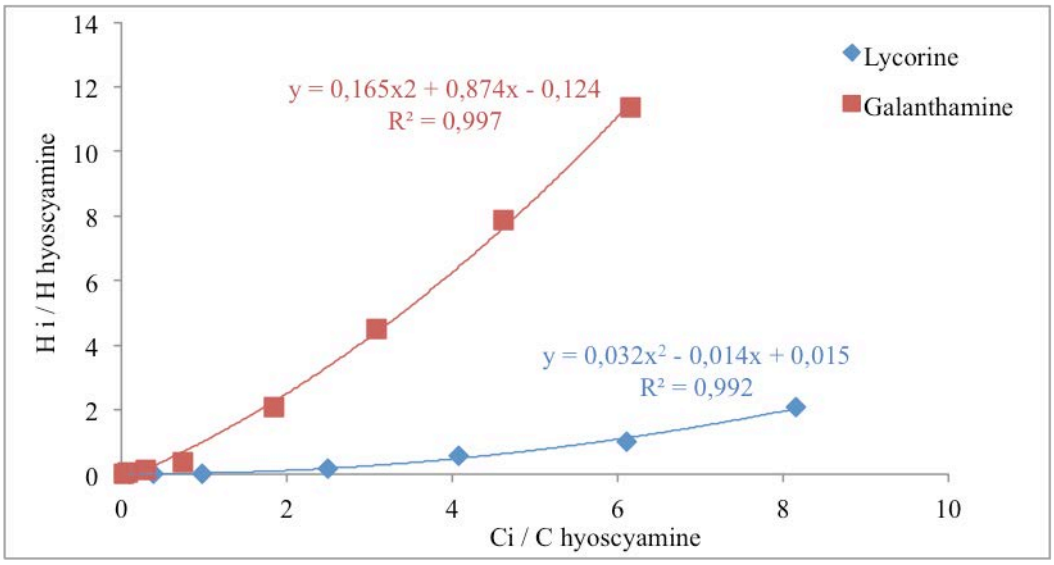


Figure 40 : Courbes étalons de la galanthamine et de la lycorine obtenues en GCMS avec l'hyoscyamine comme étalon interne.

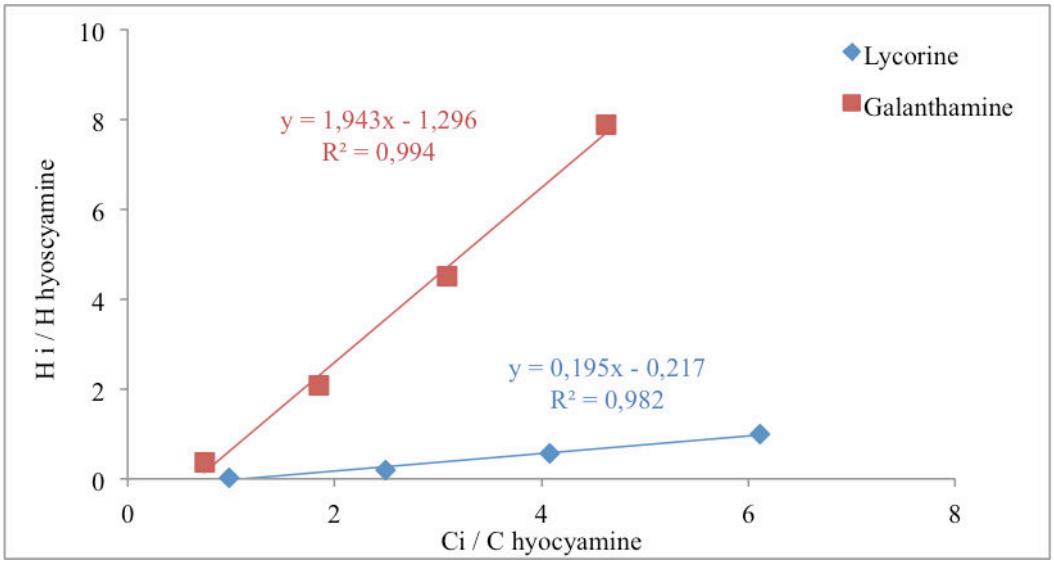


Figure 41 : Domaine de linéarité des courbes étalon obtenues en GCMS.

Les courbes obtenues sont des courbes polynomiales du 2nd ordre. Or, une méthode est validée en fonction de la linéarité des courbes étalon. Les domaines de linéarité des courbes étalon ont été définis (Figure 41). Les coefficients de détermination sont satisfaisants et compris entre 0,98 et 0,99. Pour le dosage des alcaloïdes dans les extraits, l'intervalle de validité est compris entre 14 et 92,5 µg/mL pour la galanthamine et entre 19 et 122,25 µg/mL pour la lycorine.

2.1.2 Limite de détection et de quantification

La limite de détection (LDD) est définie comme la plus petite concentration de substance pouvant être détectée mais non quantifiée comme une valeur exacte dans les conditions expérimentales décrites de la méthode. La limite de quantification (LDQ) est la plus petite concentration pouvant être déterminée quantitativement avec une fidélité et une exactitude appropriées dans les mêmes conditions expérimentales. La méthode GCMS possède une LDD à 0,5 µg/mL et une LDQ correspondant à 0,8 µg/mL.

2.1.3 Répétabilité de la méthode

Afin de déterminer la répétabilité de la méthode GC, les étalons ont été injectés trois fois. La moyenne et l'écart type ont été calculés pour chaque concentration. Un exemple d'échantillon figure dans le Tableau 13. Les concentrations en galanthamine, lycorine et hyoscyamine ont été relevées pour l'étalon qui correspond au quatrième point de la courbe étalon ([galanthamine] = 14,78 µg/mL, [lycorine] = 19,56 µg/mL et [hyoscyamine] = 20 µg/mL. D'après les valeurs obtenues, la méthode est répétable.

Tableau 13 : Vérification de la répétabilité de la méthode GCMS. L'échantillon injecté renferme la galanthamine, la lycorine et l'hyoscyamine à des concentrations théoriques respectives de 14,78 ; 19,56 et 20 µg/mL.

	Galanthamine (µg/mL)	Lycorine (µg/mL)	Hyoscyamine (µg/mL)
1ère injection	14,786	19,607	19,78
2ème injection	14,782	19,574	19,68
3ème injection	14,331	19,508	19,71
moyenne	14,633	19,563	19,72
Ecart type	0,214	0,041	0,042

2.1.4 Chromatogrammes et spectres de masse en GCMS

Les alcaloïdes contenus dans les extraits ont été identifiés, en se référant à leur standard authentique obtenus chez Sigma-Aldrich, selon deux

critères : leur temps de rétention et leur spectre de masse. De plus, les spectres obtenus ont été comparés aux spectres enregistrés dans la base de données NIST08.LIB.

La galanthamine est éluée à 11,6 ± 0,2 min, la lycorine à 16,5 ± 0,2 min et l'hyoscyamine à 9,5 ± 0,2 min (Figure 42). Les spectres de masse obtenus avec la GCMS en mode SIM ainsi que les spectres de la librairie NIST08.LIB pour les standards de galanthamine, lycorine et hyoscyamine apparaissent dans les Figures 43, 44 et 45 respectivement. La galanthamine est identifiée grâce à un pic majoritaire à m/z 286 (ayant une intensité de 100%), un pic correspondant à l'ion moléculaire à m/z 287 (ayant une intensité de 89%) et à un pic à m/z 216 (d'intensité de 38%). La lycorine est identifiée grâce à son fragment d'ion majoritaire à m/z 225,85 (ayant une intensité de 100%), à son ion moléculaire à m/z 287 (ayant une intensité de 28%) et au pic à m/z 227 (d'intensité 76%). L'hyoscyamine est caractérisée grâce à son ion majoritaire à m/z 124 (ayant une intensité de 100%), à son pic moléculaire à m/z 289 (d'intensité 4%) et au pic à m/z 82 (d'intensité 48%).

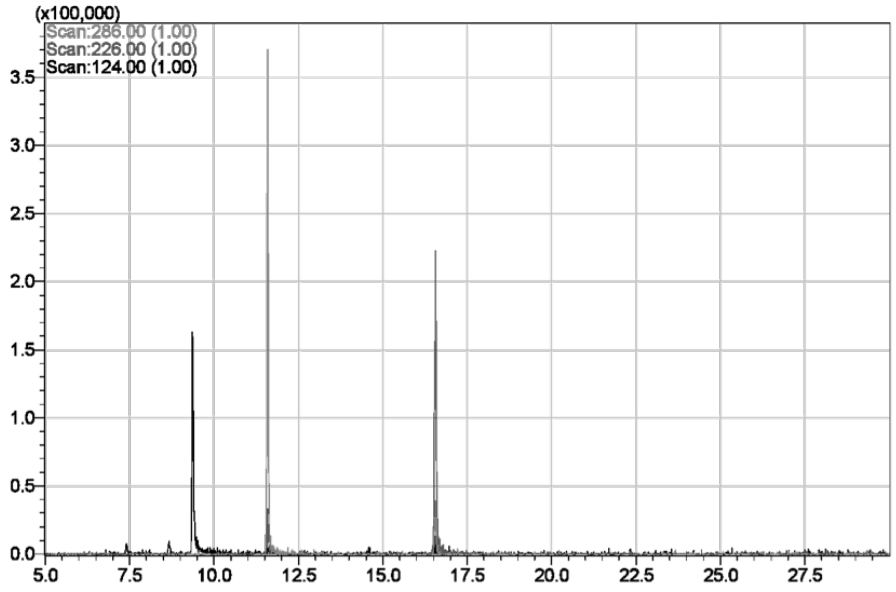


Figure 42 : Chromatogramme GCMS des standards d'hyoscyamine (9,5 min), de galanthamine (11,6 min) et de lycorine (16,5 min).

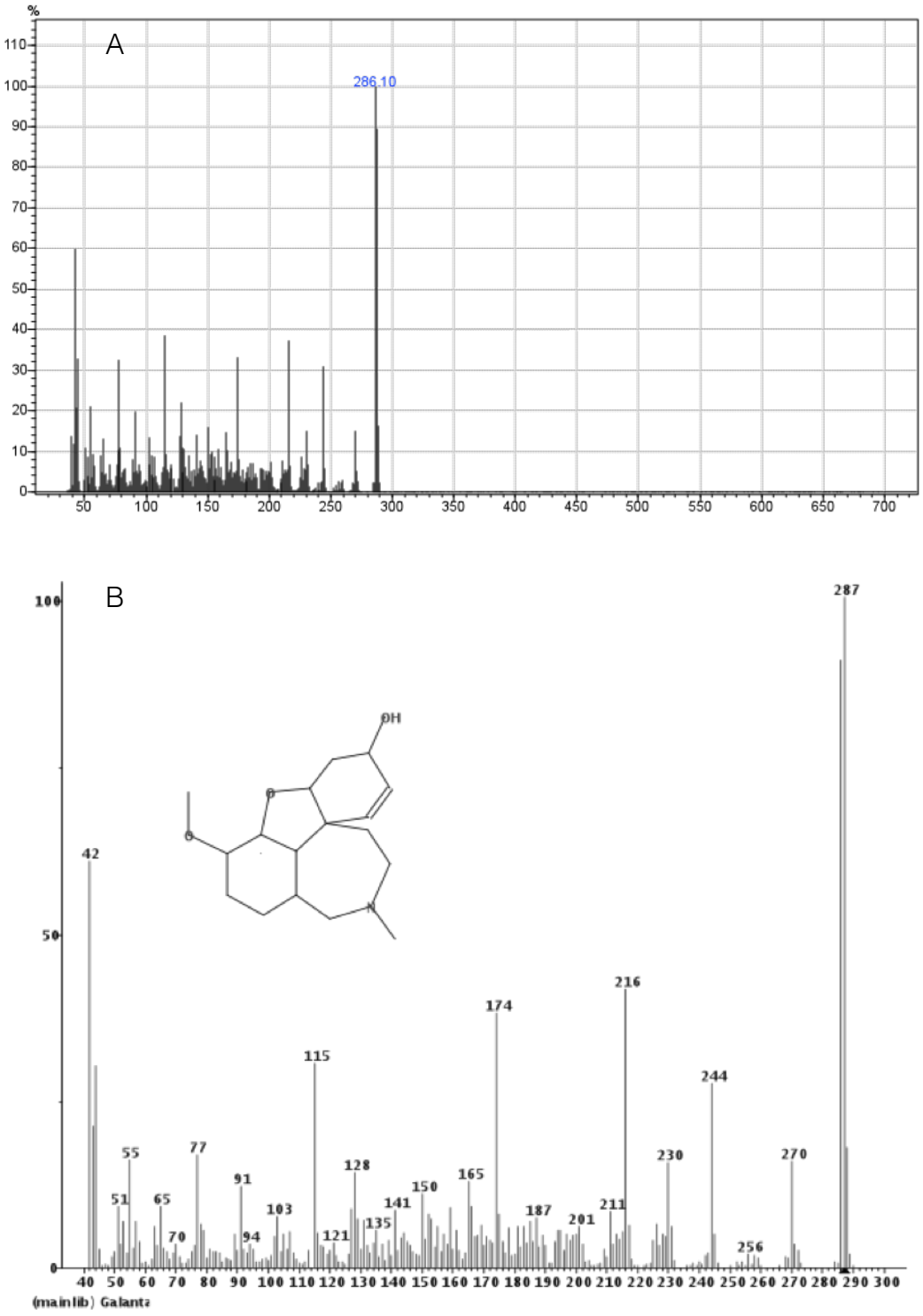


Figure 43 : Spectre de masse du standard de galanthamine (286 (100) ; 287 (89) ; 216 (38)) obtenu en GCMS (A) et identifié dans la librairie NIST08.LIB (B).

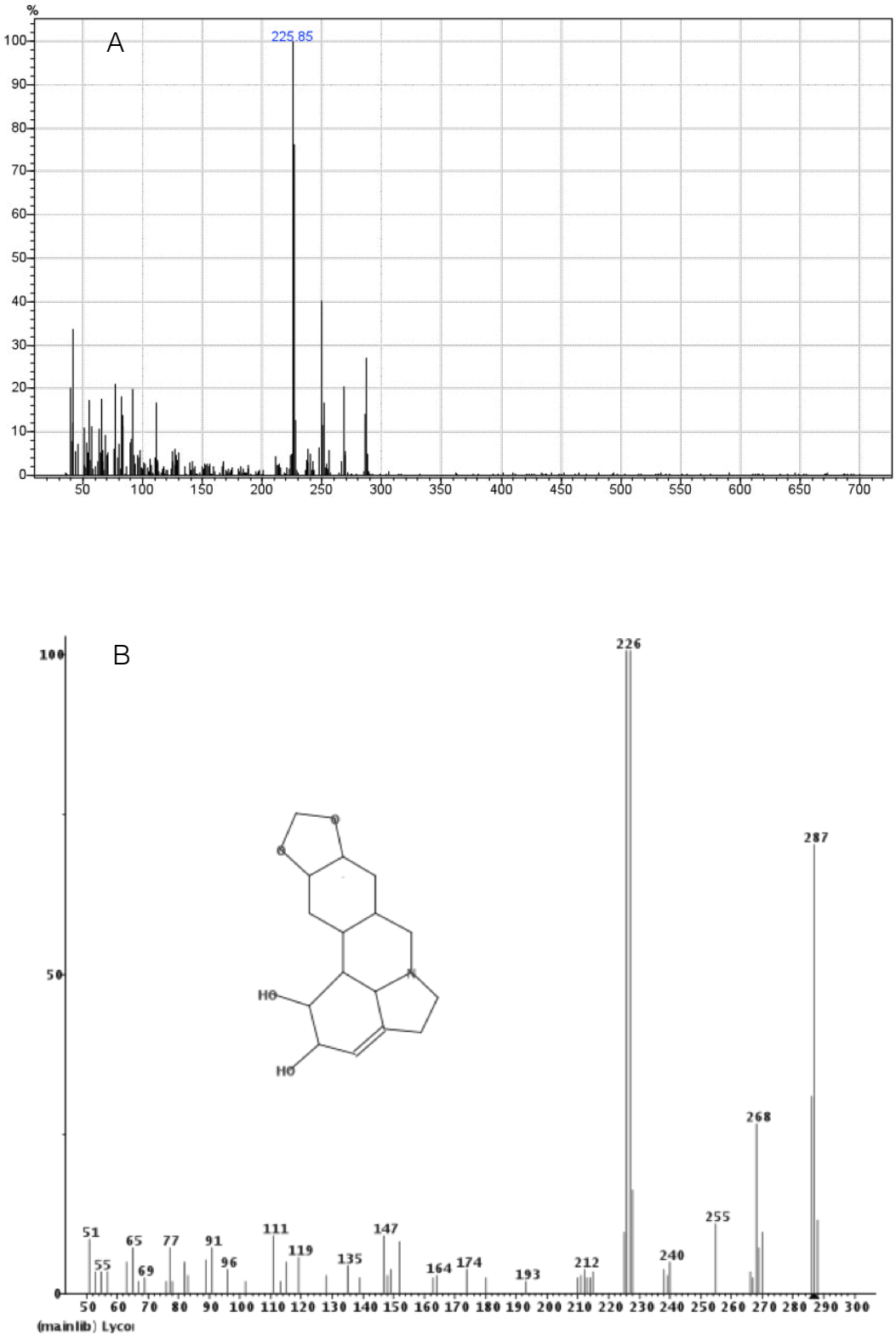


Figure 44 : Spectre de masse du standard de lycorine (225,85 (100) ; 287 (28) ; 227 (76)) obtenu en GCMS (A) et identifié dans la librairie NIST08.LIB (B).

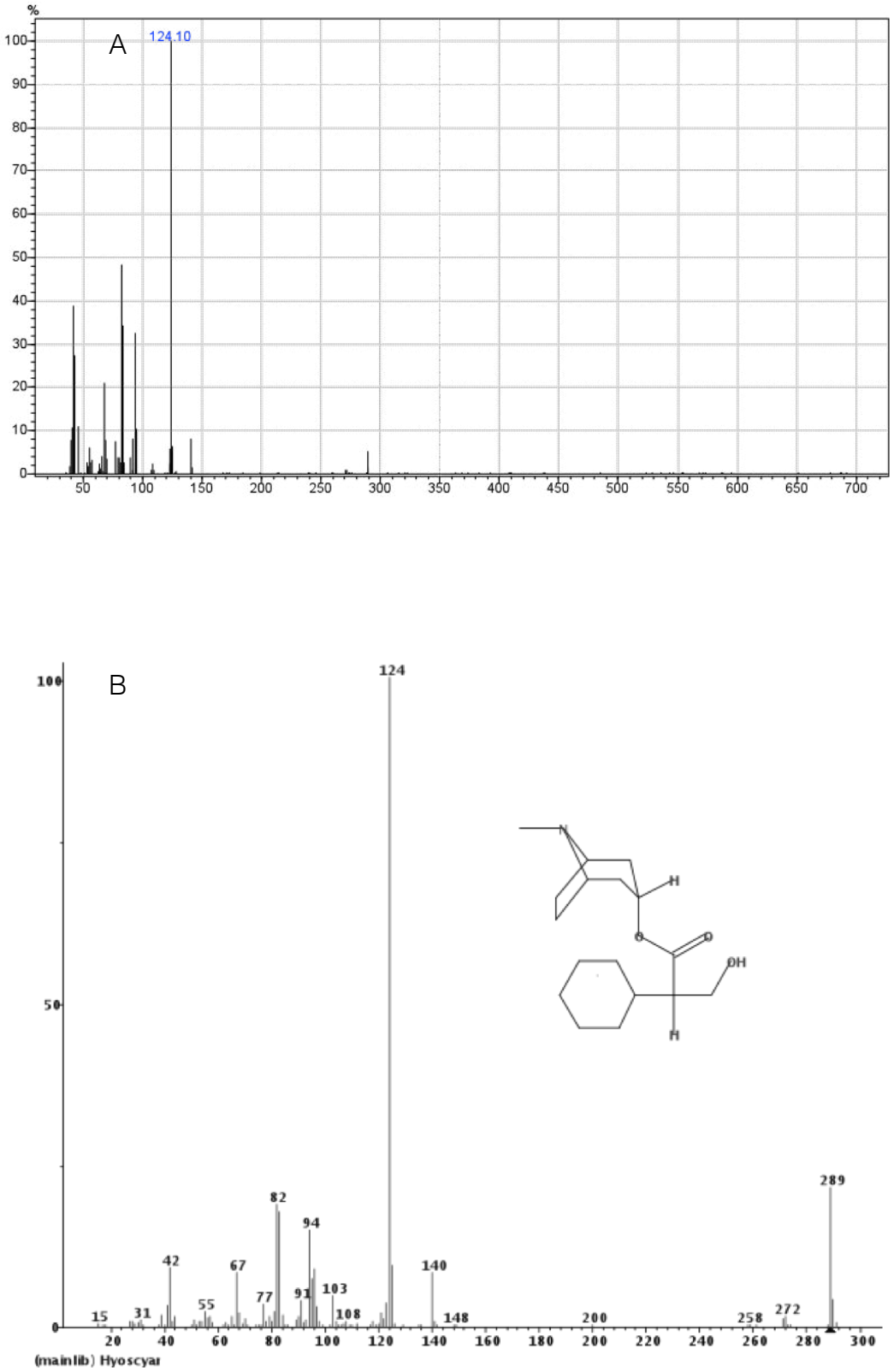


Figure 45 : Spectre de masse du standard d'hyoscyamine (124 (100) ; 289 (4) ; 82 (48)) obtenu en GCMS (A) et identifiés dans la librairie NIST08.LIB (B).

2.1.5 Spécificité de la méthode

Afin de vérifier la spécificité de la méthode, des quantités connues de galanthamine, de lycorine et d'hyoscyamine ont été ajoutées aux extraits de bulbilles de *L. aestivum*. La pureté des pics de galanthamine, lycorine et d'hyoscyamine obtenus en injectant les extraits de bulbilles en GCMS a été vérifiée. Les spectres de masse, les temps de rétention ainsi que les index de rétention étaient identiques à ceux obtenus à partir des standards.

2.1.6 Justesse de la méthode

Pour estimer la justesse, des quantités connues du standard de galanthamine (20, 30 et 40 µg) ont été ajoutées aux extraits méthanoliques de bulbilles de *L. aestivum* (V = 1 mL) exempts de galanthamine. Trois échantillons par condition ont été injectés. Les moyennes ainsi que les écarts type des taux de récupération ((Valeur obtenue / Valeur réelle) x 100) ont été calculés. Les résultats sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Evaluation de la justesse de la méthode GCMS : calcul de la moyenne et de l'écart-type du taux de récupération. N = 3.

Quantité de galanthamine ajoutée (µg)	Concentration calculée (µg/mL)	taux de récupération (%)	Moyenne	Ecart type
20	19,897 19,864 20,657	99,485 99,320 103,285	100,70	2,24
30	30,008 30,054 29,98	100,027 100,180 99,933	100,05	0,12
40	39,723 39,439 40,003	99,308 98,598 100,008	99,30	0,71

Les valeurs expérimentales trouvées par l'appareil sont identiques ou très proches des valeurs de référence. La méthode GCMS utilisée permet donc la mesure exacte des quantités d'analytes présents dans les échantillons.

3 Conclusion du chapitre 1

Les méthodes d'analyses des alcaloïdes d'Amaryllidaceae par LCMS ainsi que par GCMS ont été validées. La première sera utilisée pour quantifier le contenu en galanthamine et en lycorine dans les extraits de

bulbilles et de milieux de culture issus des cultures *in vitro*. Les échantillons purifiés ainsi que la gamme étalon renferment une concentration théorique finale d'hyocyamine égale à 2 µg/mL. La GCMS sera utilisée non seulement pour la quantification du contenu en galanthamine et en lycorine des extraits de bulbilles issus de la culture *in vitro* mais aussi pour la mise au point de la méthode de purification SPE et pour la comparaison de cette dernière avec la méthode de purification liquide-liquide. Les échantillons et la gamme étalon renferment une concentration théorique finale d'hyoscyamine égale à 20 µg/mL.

D'après les résultats de linéarité des courbes étalon, l'intervalle de validité de la méthode LCMS couvre des concentrations allant de 0,65 jusqu'à 36,5 µg/mL. Celui de la méthode GCMS, couvre des valeurs allant de 14 jusqu'à 122,25 µg/mL. La méthode LCMS est donc recommandée pour le dosage de faibles teneurs en galanthamine et en lycorine. Par contre, pour des teneurs relativement élevées (> 35 µg/mL), la méthode GCMS est la plus adéquate.

Ainsi, nous avons validé deux techniques d'analyse spécifiques des espèces étudiées. La robustesse de ces techniques nous permet d'envisager des études tant qualitatives que quantitatives, et ce dans des gammes de concentrations variées.

Chapitre 2 : Traitement des échantillons préalablement à leur injection en LCMS et GCMS

1 La nécessité d'un traitement préalable à l'analyse analytique

Le traitement des échantillons est une partie extrêmement importante de l'analyse phytochimique globale. C'est aussi l'étape la plus longue et la plus fastidieuse[153]. Elle représente bien souvent un facteur limitant en termes de rapidité et d'automatisation. Les trois principaux objectifs de cette étape sont : l'élimination des composés interférents, l'augmentation de la sensibilité de la méthode d'analyse vis-à-vis des composés d'intérêt et l'augmentation de la concentration de ces derniers dans l'échantillon. Ces objectifs doivent être atteints en minimisant au plus la durée de cette étape.

En chimie analytique, l'échantillon est constitué de deux parties : le ou les analytes d'une part et la matrice d'autre part. Les analytes sont les composés à doser alors que la matrice représente l'ensemble des autres constituants.

1.1 Importance de la concentration en alcaloides dans les extraits à injecter

Les alcaloïdes sont souvent présents à l'état de traces dans les extraits de plantes. Pour l'analyse quantitative, il est important que les concentrations des analytes se situent dans le domaine de validité de la méthode. Dans notre cas, et comme nous l'avons vu au premier chapitre Résultats et Discussions, pour une analyse en LCMS, les alcaloïdes doivent être présents à une concentration minimale de 0,65 µg/mL. Par contre, pour une analyse en GCMS, leur concentration minimale doit être de 14 µg/mL.

1.2 Importance de la purification des échantillons

Les extraits de plantes, de composition très complexe, nécessitent une purification préalable à leur injection en LCMS ou en GCMS[158]. Sans purification, les chromatogrammes obtenus sont complexes et l'identification des composés d'intérêt devient difficile et longue. Ceci est surtout vrai si les analytes sont présents à des concentrations beaucoup plus faibles que celles des composés interférants[159]. De plus, quand il s'agit de doser des traces parmi d'autres composés beaucoup plus abondants, les résultats sont souvent influencés par la matrice.

Jusque-là, au laboratoire, les extraits de bulbes, de bulbilles et de milieux de culture ont toujours été injectés en LCMS ou en GCMS sans aucun traitement préalable. El Tahchy et al.[12] injectaient les échantillons méthanoliques bruts filtrés à travers des filtres de 0,45 µm résistants aux solvants. Un exemple de chromatogramme obtenu est montré dans la Figure 46. On remarque que tous ces chromatogrammes comportent un nombre important de pics correspondants à des composés interférents. En pratique, ceci se traduit par :

- Une interprétation longue, difficile et fastidieuse des chromatogrammes et des spectres.

- L'endommagement de l'appareil d'analyse et des colonnes analytiques. En effet, la grande quantité d'espèces non volatiles entraîne l'encrassement des différentes parties de l'appareil.

- Enfin, cet encrassement peut entraîner une perturbation voire la disparition du signal mesuré.

- La nécessité de nettoyer les sources après l'analyse de seulement 6 échantillons : en moyenne, les batchs comptent 40 échantillons. Il faut donc arrêter régulièrement l'analyse, nettoyer la source et relancer, ce qui implique un temps d'analyse long.

L'analyse devient alors longue, fastidieuse et coûteuse, d'où la nécessité de purifier nos extraits.

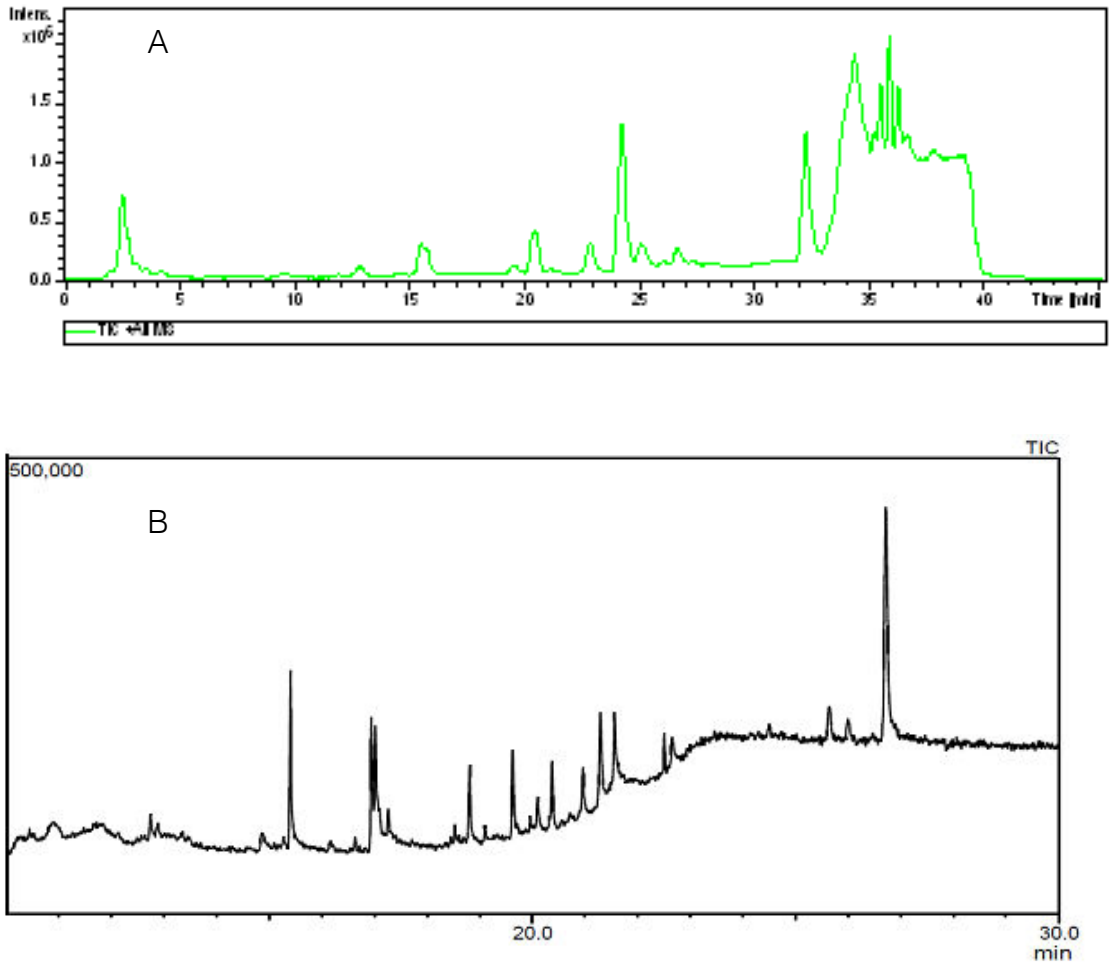


Figure 46 : Chromatogrammes obtenus en LCMS (A) et en GCMS (B) en injectant des extraits méthanoliques bruts (sans purification préalable) de bulbilles[12].

2 Principe du calcul du taux de récupération de l'hyoscyamine

Une quantité connue d'une solution-mère d'hyoscyamine a été ajoutée aux extraits juste après l'étape d'extraction et avant l'étape de purification. Comme déjà évoqué dans les chapitres précédents, le dosage par étalonnage interne repose sur l'ajout d'une quantité connue dans toutes les solutions étalon et dans tous les échantillons, d'une molécule qui sert de référence durant les phases de l'analyse. Le dosage, plutôt que d'être fait de façon absolue à partir d'une droite d'étalonnage de l'analyte (étalonnage externe), se fait de façon relative par rapport à l'étalon interne (ei). L'étalon interne permet en outre de s'affranchir des erreurs de volumes d'injection, de dilution, de détection, etc. En effet, il est détecté de la même façon que l'analyte puisque ces molécules se comportent de la même façon. De plus,

si l'échantillon subi un traitement préalable à l'analyse (ex, purification), les pertes en analyte et en ei sont également les mêmes. Il est alors possible de déterminer la concentration en analyte dans l'échantillon brut, c'est-à-dire avant le traitement.

Pour les calculs qui suivront :

C^i_a : quantité de l'**a**nalyte à doser dans l'échantillon **i**nitial
C^i_e : quantité d'**e**i introduite dans l'échantillon **i**nitial, avant le traitement
C^f_a : quantité de l'**a**nalyte dans la **f**raction
C^f_e : quantité de l'**e**i dans la **f**raction

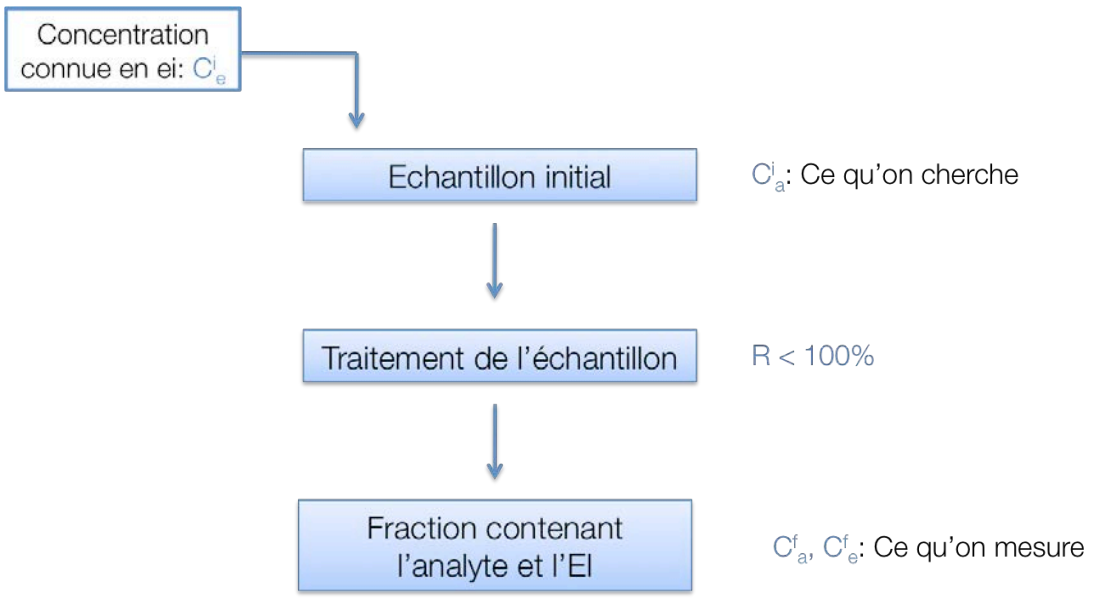


Figure 47: Etalonnage interne dans le calcul du taux de récuperation après une étape de traitement de l'échantillon.

En analyse chimique, la réponse d'un détecteur est considérée linéaire dans une plage de valeurs données. On peut alors écrire :

$$I_a = K_a \cdot C_a \quad (1)$$

C'est-à-dire que l'intensité I du signal est proportionnelle à la quantité C de produit introduite. K est le coefficient de réponse caractéristique de chaque molécule et représente son comportement vis-à-vis de l'appareillage.

Si on applique cette relation à l'analyte et l'ei présent dans l'échantillon à doser :

$$\begin{aligned} I_a^f &= K_a^f \cdot C_a^f \\ I_e^f &= K_e^f \cdot C_e^f \end{aligned} \text{ donc : } \frac{I_a^f}{I_e^f} = \frac{K_a^f}{K_e^f} \cdot \frac{C_a^f}{C_e^f}$$

Ce qui implique : $$\frac{I_a^f}{I_e^f} = K_{a/e}^f \cdot \frac{C_a^f}{C_e^f} \quad (2)$$

$K_{a/e}$ est alors le coefficient de réponse relatif qui, contrairement à K_a, ne dépend plus des variations instrumentales.

Pour le calcul des rendements de récupération, on ne peut pas se baser sur la concentration de l'ei dans l'échantillon même, il faut considérer par contre la moyenne des intensités (I^i_e) obtenues avec la gamme étalon. Rappelons que toutes les solutions de la gamme étalon renferment l'ei à une concentration constante connue (C^i_e).

$$\frac{I_e^f}{I_e^i} = \frac{K_e^f}{K_e^i} \cdot \frac{C_e^f}{C_e^i} \quad (3)$$

or $K_e^f = K_e^i$ puisque c'est la même molécule et donc dans les mêmes conditions de détection, elle est détectée pareillement. Sachant que $C_e^f = \frac{r}{100} \cdot C_e^i$ où r est le rendement de recouvrement ou taux de récupération. On en déduit : $\frac{I_e^f}{I_e^i} = \frac{C_e^i}{C_e^i} \cdot \frac{r}{100}$ donc : $r = \frac{I_e^f}{I_e^i} \cdot 100$ (5)

Ainsi, le calcul du taux de récupération r de l'hyoscyamine a pu être calculé.

3 Première méthode de purification: extraction liquide-liquide

La méthode de purification la plus employée en phytochimie est l'extraction liquide-liquide[18, 20, 77, 86-89]. C'est la méthode traditionnelle utilisée pour la purification de plusieurs types de composés. En effet, dans les articles scientifiques portant sur le dosage des alcaloïdes d'Amaryllidaceae dans des extraits de plantes ou de milieux de culture, ce type de purification est le plus généralement utilisé.

3.1 Principe de la méthode de purification liquide-liquide

Le principe de la méthode repose sur des extractions successives liquide-liquide en présence de solvants non miscibles et en faisant varier le pH. Dans le cas des alcaloïdes, c'est leur caractère basique qui est mis en jeu. Ceux-ci sont protonnés en milieu acide et par la suite solubles en phase aqueuse, et neutres en milieu basique et donc solubles en phase organique. Le protocole de l'extraction liquide-liquide est détaillé dans le paragraphe 10.3 du chapitre Matériels et Méthodes.

Dans un premier temps, les composés apolaires (stérols, huiles, chlorophylle, etc.) sont éliminés en extrayant la phase aqueuse acide deux fois avec un solvant organique (CH_2Cl_2). Dans un second temps, la phase aqueuse, contenant les alcaloïdes et d'autres composés polaires est extraite trois fois avec une phase organique après avoir alcalinisé la phase aqueuse. Les phases organiques renfermant les alcaloïdes sont récupérées, mélangées et évaporées.

3.2 Évaluation de la purification liquide-liquide

Tout d'abord, les bulbilles de *L. aestivum* lyophilisées et réduites en poudre ont été macérées dans le méthanol pendant 24 heures. On répartit au cours de ces 24 h, 1h30' de bain à ultrasons par séance de 30 min. Au bout de cette période, les extraits méthanoliques ont été filtrés et 300 µL de la solution-mère d'hyoscyamine (l'étalon interne) à 200 µg/mL ont été ajoutés. Le volume final des extraits purifiés étant de 3 mL, la concentration en

hyoscyamine théorique (sans perte due à l'étape de purification) est de 20 µg/mL.

Pour l'évaluation de la méthode de purification liquide-liquide, 6 extraits méthanoliques additionnés de l'étalon interne ont été purifiés et injectés en GCMS. Le mode de détection était en mode SIM. Les 6 pics obtenus dans chacun des 6 extraits correspondent à la quantité d'hyoscyamine (Figure 48).

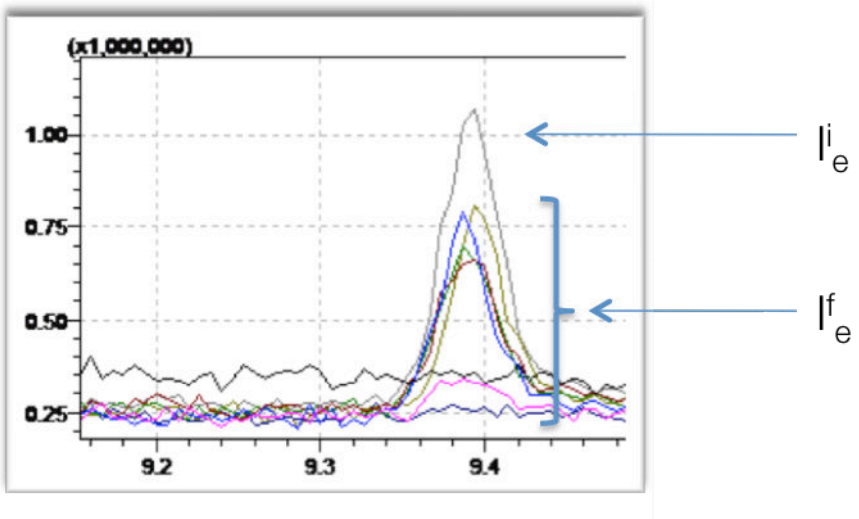


Figure 48: Pics d'hyoscyamine obtenus en injectant les 6 extraits purifiés par extraction liquide-liquide. Les pics obtenus (I^f_e) sont comparés au pic d'hyoscyamine dans une solution étalon (I^i_e).

Les taux de récupération de l'hyoscyamine ont été calculés. Les résultats figurent dans le Tableau 15 ainsi que la moyenne, l'écart type et l'écart type relatif exprimé en %.

Tableau 15 : Taux de récupération de l'hyoscyamine dans les extraits purifiés par la méthode liquide-liquide.

Numéro de l'échantillon	r (%)	Moyenne	Ecart type	Ecart type relatif (%)
1	14,11	40,07	23,97	59,81
2	57,77			
3	49,44			
4	51,61			
5	5,61			
6	61,9			

D'après les résultats obtenus, plusieurs inconvénients liés à cette méthode de purification sont relevés (Figure 49):

- Premièrement, l'écart type calculé est important. Sachant que les 6 extraits ont été purifiés par le même expérimentateur, le même jour, la méthode est alors non répétable.
- Deuxièmement, l'étape de traitement de l'échantillon doit être la moins longue possible mais surtout automatisable. La méthode liquide-liquide ne répond pas à ces critères.
- En outre, des volumes importants de solvants sont utilisés.
- Finalement, d'un point de vue analytique, l'ajout de l'hyoscyamine permet de calculer les valeurs initiales en galanthamine et en lycorine malgrès les pertes liées à l'étape de purification. Par contre, d'un point de vue « production d'alcaloïdes », on perd pratiquement 60% des alcaloïdes avec cette méthode de purification. Or le but de notre travail est d'augmenter la production en alcaloïdes *via* les cultures *in vitro* en présence d'éliciteurs. La stimulation de la bioproduction serait vaine si le taux de récupération des alcaloïdes était considérablement réduit par l'étape de purification.

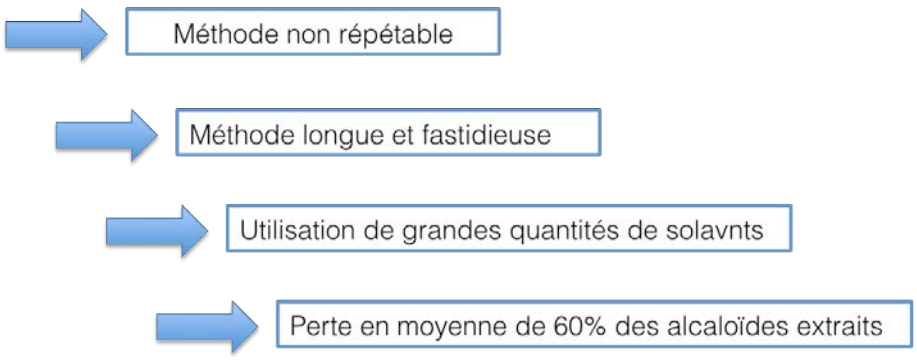


Figure 49 : Inconvénients de la purification par extraction liquide-liquide.

Pour toutes ces raisons (pertes importantes en alcaloïdes, méthode longue, non automatisable et non répétable), la purification par extraction liquide-liquide a été abandonnée.

4 Seconde méthode de purification: extraction en phase solide (SPE)

4.1 Principe de la SPE

L'extraction en phase solide est une méthode de purification qui permet à la fois de purifier et de concentrer un extrait brut. De petites cartouches en plastique ressemblant à un corps de seringue et contenant un adsorbant solide sont utilisées (Figure 50). La phase solide peut varier d'une phase normale de silice à une phase de silice greffée (polarité en phase inverse). Il existe deux modes d'utilisation:

- Dans le premier mode d'utilisation, les composés d'intérêt sont retenus sur l'adsorbant et les impuretés de la matrice sont éliminées par rinçage. Ensuite, les analytes sont élués avec un faible volume de solvant. Ainsi, on aura purifié et concentré les extraits.

- L'autre mode d'utilisation consiste à retenir les impuretés sur l'adsorbant et à laisser les composés désirés passer librement.



Figure 50 : Différents types de cartouches SPE[160].

Le protocole de purification sur SPE « Catch and Release » suit 4 étapes principales (Figure 51):

- 1ère étape : Conditionnement de la cartouche :

  L'activation de l'adsorbant et des groupes fonctionnels est réalisée avec un volume de solvant ou un mélange de solvants adéquat. Cette étape permet l'élimination des impuretés et la favorisation des

échanges avec l'adsorbant. Une fois la colonne activée, celle-ci ne doit pas sécher. De plus, pour une efficacité maximale de la purification, le débit du solvant éluant à travers la colonne durant les prochaines étapes doit être contrôlé (le mieux est de maintenir du goutte-à-goutte).

- 2ème étape : Dépôt de l'échantillon :

  L'échantillon est déposé sur la colonne. Les impuretés non retenues sont éluées directement à travers la cartouche avec la phase mobile. Par contre, celles qui sont plus ou moins retenues resteront à la surface de l'adsorbant. Il est important d'analyser toutes les fractions, afin de vérifier l'absence des analytes dans les fractions de dépôt ou de lavage.

- 3ème étape : Lavage de la colonne :

  Le lavage se fait dans un premier temps, avec le même solvant utilisé pour le dépôt de l'échantillon. Ceci permet d'éliminer d'avantage les impuretés non retenues. Ensuite, d'autres solvants peuvent être utilisés en fonction des impuretés à éliminer.

- 4ème étape : Elution des analytes

  Un solvant approprié est utilisé. Il va perturber l'interaction analyte-adsorbant et éluer ainsi les analytes. Le solvant doit avoir une interaction maximale avec les analytes et une interaction minimale avec les impuretés. De plus, le volume d'élution utilisé doit être le plus petit possible afin de concentrer les analytes.

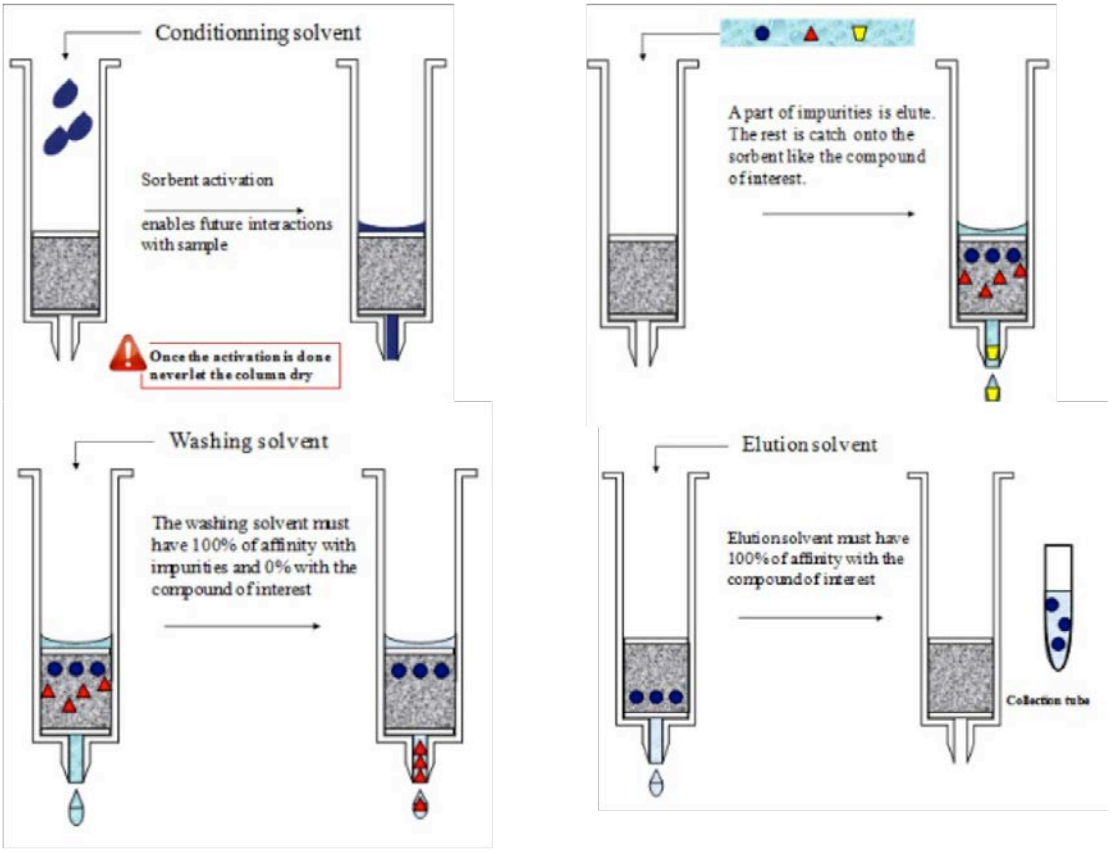


Figure 51 : Les 4 étapes de la purification par SPE recommandées par Interchim[160].

Grâce au manifold (collecteur) à 24 puits (Figure 52), il est possible de purifier simultanément 24 échantillons. Muni de robinets et d'une pompe, le manifold permet de régler le débit de la phase mobile éluant à travers la colonne.

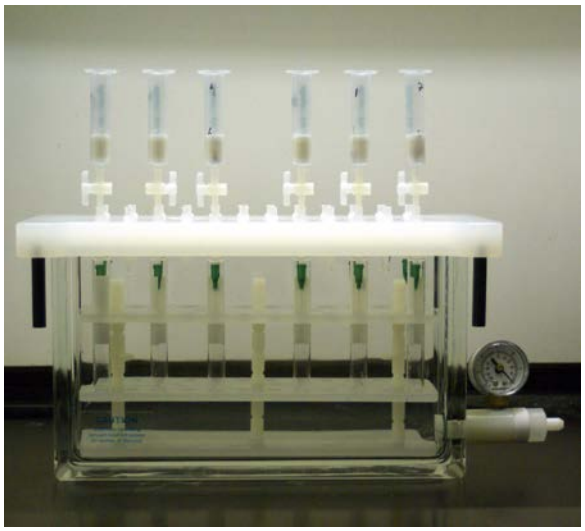


Figure 52 : Manifold pour SPE permettant de purifier simultanément 24 échantillons[157].

4.2 Pourquoi la SPE?

Dans tous les travaux scientifiques publiés sur la biosynthèse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae, les extraits bruts ou purifiés par extraction liquide-liquide sont analysés à l'aide des systèmes chromatographiques afin de déterminer leur teneur en alcaloïdes. Seulement deux de tous ces articles[161, 162], l'un publié en 2002 et l'autre en 2006, utilisent un autre moyen de purification. Ces deux équipes ont mis au point chacune un protocole SPE qui permet de purifier les extraits et de récupérer des fractions alcaloïdiques pures avec des taux de récupération compris entre 85,8 et 112,1%[162]. Cette méthode, présentant beaucoup d'avantages, nous a intéressés.

4.3 SPE avec une phase échangeuse de cations (SCX)

En se basant sur le caractère basique des alcaloïdes, on a mis au point, dans un premier temps, une méthode de purification utilisant des cartouches SPE contenant un adsorbant SCX (Strong Cation Exchange), une phase échangeuse de cations. En milieu acide, les alcaloïdes sont protonnés et sont donc retenus sur l'adsorbant. Il suffira d'éluer au moyen d'un solvant basique pour récupérer les alcaloïdes à travers la cartouche (Figure 53).

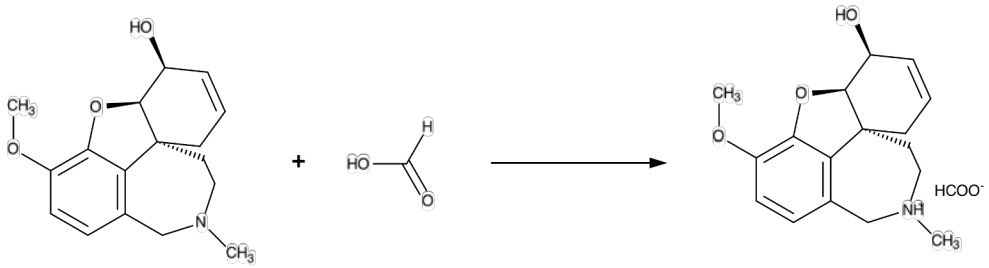


Figure 53 : Ionisation de la galanthamine renfermant un azote basique pouvant se protonner en milieu acide.

Une solution méthanolique renfermant 200 µg/mL d'hyoscyamine, 200 µg/mL de galanthamine et 200 µg/mL de lycorine a été préparée. Le protocole d'élution était le suivant :

La cartouche a été tout d'abord conditionnée avec 2 mL d'une solution aqueuse contenant 5% de HCOOH. Ensuite, 300 µL de la solution-mère d'alcaloïdes dilués au 1/10^{e} dans la solution aqueuse de conditionnement ont

été déposés sur la cartouche. Une étape de rinçage a suivi avec, successivement, 3 mL d'une solution aqueuse contenant 5% de HCOOH, 3 mL de CH_3CN contenant 5% de HCOOH et 1 mL de CH_3CN. Enfin, les alcaloïdes ont été élués avec 3 mL de CH_3CN contenant 5% de NH_4OH. Les éluats ont été analysés en GCMS et, d'après les résultats obtenus, la totalité des alcaloïdes était élués.

Rappelons qu'il s'agit d'un cas idéal où la solution ne contient que des alcaloïdes. Cette étape était nécessaire puisqu'elle a servi pour la validation du choix de l'adsorbant SCX.

Dans le but de tester l'efficacité de la purification avec des extraits de plantes, 2,7 mL d'un extrait méthanolique de bulbilles de *L. aestivum* ont été ajoutés à 300 µL de la solution-mère d'alcaloïdes, l'ensemble a été dilué au 1/10ème dans une solution aqueuse, contenant 5% de HCOOH et purifié sur SCX. Le protocole de purification a été le même que celui détaillé dans le paragraphe précédent (Figure 54). Il est à noter que les extraits méthanoliques de bulbilles sont des extraits chlorophylliens (couleur vert foncée). Comme déjà évoqué dans le paragraphe 4.2.3 du chapitre Matériels et Méthodes, la formation des bulbilles a lieu en présence d'une photopériode (la lumière stimulerait la capacité des bulbilles à produire des alcaloïdes[97-99]).

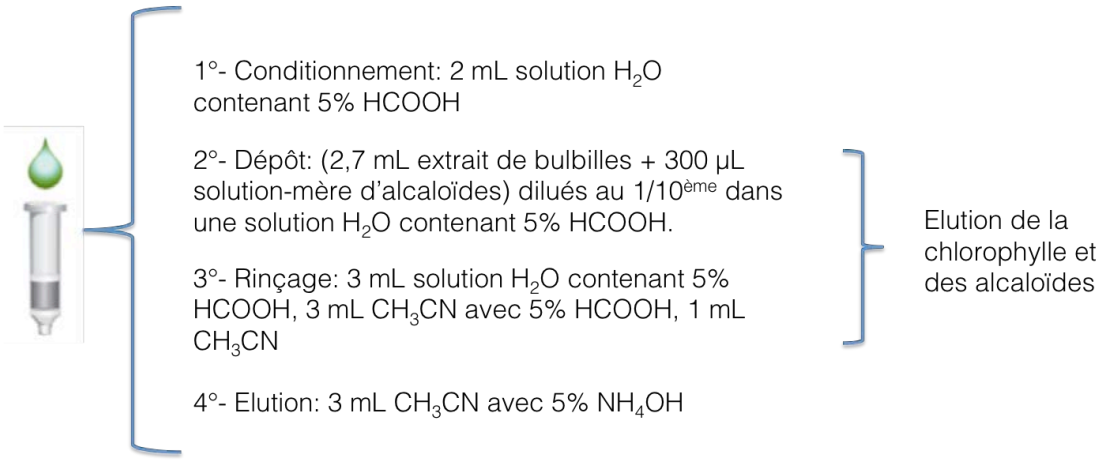


Figure 54 : Protocole de purification des alcaloïdes avec la SPE sur une phase SCX.

Concernant la rétention des alcaloïdes sur la phase SCX, ces derniers sont tout d'abord protonnés. Or, l'ajout de l'acide formique aurait créé, en parallèle, des charges positives au niveau d'un azote du noyau chlorine de la chlorophylle. Ainsi, la chlorophylle saturant la phase SCX était partiellement

retenue sur l'adsorbant et partiellement éluée avec les alcaloïdes à travers la cartouche durant les étapes de dépôt et de rinçage (Figure 54).

En effet, en milieu très acide (pH = 0), les deux amines secondaires du noyau chlorine se trouvent protonnés et la chlorophylle se transforme en une phéophytine[163] (chlorophylle sans Mg^{2+}). La charge globale de la molécule est neutre (Figure 55). Par contre, à pH acide compris entre 1 et 5, un seul azote des deux se trouve protonné. La charge globale de la molécule est alors égale à +1. Ce qui expliquerait la rétention de la chlorophylle sur l'adsorbant SCX. D'où la nécessité d'une purification préalable pour éliminer la chlorophylle.

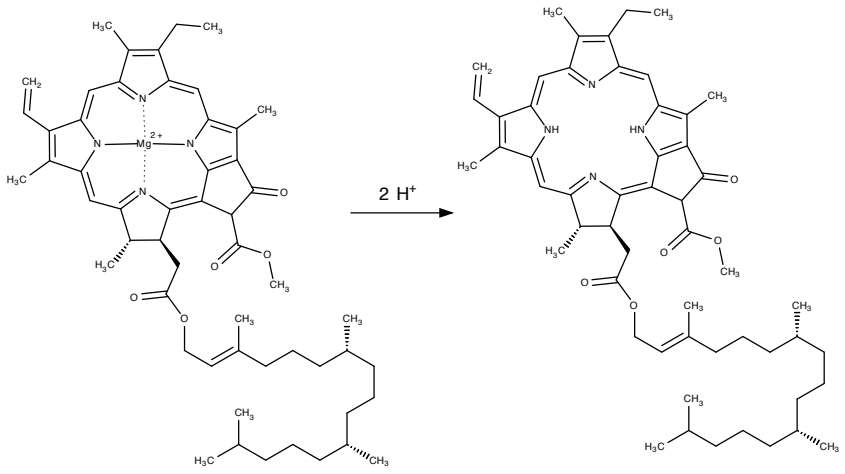


Figure 55 : Conversion de la chlorophylle a en phéophytine suite à une décomplexation en milieu acide[163].

Notre protocole a été inspiré par les travaux de Mroczek et al.,[162] qui ont utilisé des cartouches SPE échangeuses de cations afin de purifier les extraits méthanoliques de feuilles de *Datura*. La méthode d'extraction des alcaloïdes tropaniques à partir des feuilles était similaire à la nôtre (macération dans du MeOH). Leurs extraits méthanoliques étaient donc potentiellement chlorophylliens. Selon leurs résultats, les taux de récupération des alcaloïdes étaient compris entre 88 et 110%[162]. Notons que les auteurs n'utilisent pas un étalon interne dans leurs expériences. Cependant, ils n'évoquent pas la présence de chlorophylle dans leurs extraits et les alcaloïdes seraient quand même retenus sur la SCX (avec une phase mobile aqueuse acide comparable à la nôtre). Ils réussissent à récupérer la totalité des alcaloïdes après une élution avec du MeOH contenant 10% de NH_4OH.

Concernant les milieux de culture exempts de chlorophylle mais, par contre très riches en sels, la purification en utilisant une phase SCX ne peut pas être rentable. Les sels chargés positivement satureront rapidement la phase. Ainsi, une quantité non négligeable de sels sera éluée avec les alcaloïdes entraînant une perturbation du signal de l'appareil d'analyse (en LCMS ou en GCMS) ainsi qu'un allongement du temps d'analyse en raison des étapes d'entretient de l'appareil ainsi induites.

4.4 SPE avec une phase inverse C18

On a ensuite adopté un autre protocole en s'inspirant du protocole mis au point par le même auteur (Mroczek, T),[164] publié trois ans plus tard que celui portant sur la purification des extraits de feuilles de *Datura*. Ses travaux, ont porté, cette fois, sur la purification par SPE des alcaloïdes d'Amaryllidaceae contenus dans des extraits bruts de *Narcissus* et de *Galanthus*. Une phase inverse a été utilisée et, d'après les résultats obtenus (toujours sans étalon interne), les taux de récupération étaient compris entre 83,2 et 112,1%[164].

Nous avons utilisé une cartouche SPE avec un adsorbant de type C18. Elle a été d'abord conditionnée avec 3 mL d'une solution aqueuse contenant 5% de NH_4OH. Ensuite, 500 µL de la solution-mère d'alcaloïdes à 200 µg/mL, additionnés de 2,5 mL de MeOH ont été dilués au 1/10ème dans une solution aqueuse contenant du NH_4OH à 5%. La phase a été ensuite rincée avec 3 mL de la solution aqueuse de NH_4OH à 5%. Enfin, 5 mL d'une solution aqueuse de HCOOH à 5% ont servi pour l'élution. Les fractions obtenues ont été évaporées. Les extraits obtenus ont été redissouts dans 5 mL de MeOH et injectés en GCMS.

Les résultats obtenus ont montré que les alcaloïdes étaient élués à travers la cartouche durant les étapes de dépôt et de rinçage. La phase C18 serait très apolaire par rapport aux alcaloïdes. Il est à noter que, les extraits testés ne contenaient pas de chlorophylle.

Le même protocole a été suivi pour la purification de 2,5 mL d'un extrait méthanolique de bulbilles de *L. aestivum* additionnés de 500 µL de la solution-mère d'alcaloïdes. Théoriquement la chlorophylle, non soluble dans l'eau et grâce à sa partie hydrophobe (l'alcool terpénoïde), devrait être retenue sur l'adsorbant en laissant éluer les alcaloïdes. Mais, dans la pratique, la chlorophylle, saturant la phase C18, était partiellement retenue et

partiellement éluée avec les alcaloïdes durant les étapes de dépôt et de rinçage (Figure 57).

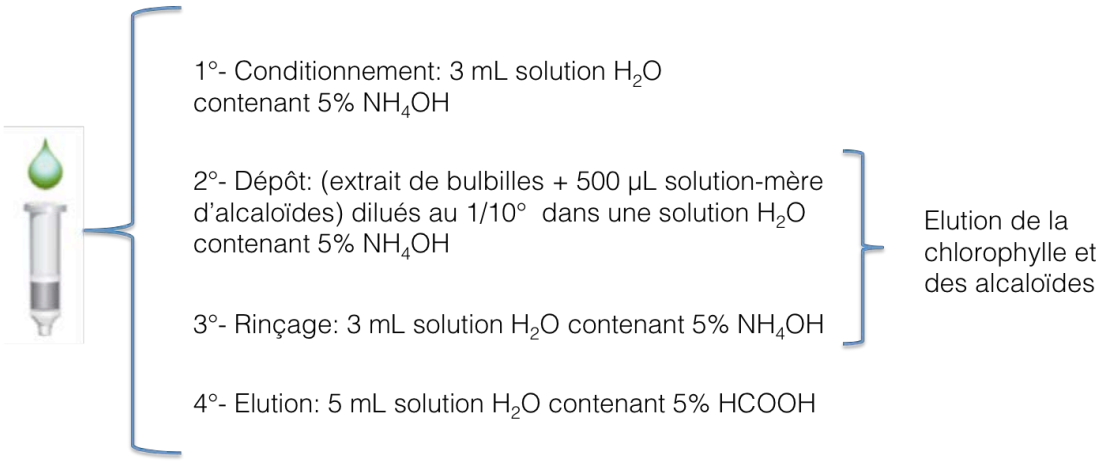


Figure 57 : Protocole de purification des alcaloïdes avec la SPE sur une phase C18.

La chlorophylle, non soluble dans l'eau, était éluée partiellement à travers la cartouche avec la solution de dépôt qui est constituée à 90% d'eau et avec la solution de rinçage à 100% d'eau. Ceci prouve la non-compatibilité de la phase C18 pour la purification de nos extraits chlorophylliens. Il est étonnant que, dans les travaux de López et al.,[161] la purification des extraits méthanoliques bruts de *N. confusus*, soit faite par simple élution à travers la C18. Les fractions alcaloïdiques étaient ensuite directement analysées. Or la chlorophylle est une molécule insoluble dans l'eau mais par contre soluble dans le MeOH, le fait d'augmenter le taux de MeOH par rapport à celui de l'eau dans la solution de dépôt va entrainer davantage l'élution de la chlorophylle en même temps que les alcaloïdes.

D'autre part, l'utilisation d'une solution aqueuse à 5% de HCOOH au lieu de 5% NH_4OH (conditions acides au lieu des conditions basiques), entraînera d'une part, la protonnation des alcaloïdes et d'autre part, l'apparition de charges positives sur la chlorophylle. Les alcaloïdes ainsi que la chlorophylle auront encore moins d'affinité pour la C18 et continueront à être élués en même temps.

D'après les travaux de Mroczek[164], les alcaloïdes sont retenus sur une phase inverse dans les mêmes conditions que celles que nous avons testées. Ils ont été élués en totalité avec un mélange MeOH : eau (75 mL:25 mL, v : v). Nous n'avons pas pu obtenir des résultats comparables.

En revanche, les extraits méthanoliques de milieux de culture ne contiennent pas de chlorophylle mais contiennent une grande quantité de sels. Pour l'élimination des sels, la phase C18 est adéquate. Pour cela, un extrait méthanolique de milieux de culture a été purifié selon le protocole de purification mis au point. L'étape de rinçage à l'eau devrait être suffisante pour l'élimination des sels. Les fractions obtenues ont été évaporées. Les extraits ont été redissouts dans du MeOH et injectés en GCMS. Les résultats obtenus ont montré que les alcaloïdes étaient aussi élués durant les étapes de dépôt et de rinçage avec les sels.

En conclusion, la phase inverse C18 n'est pas adéquate pour la purification des alcaloïdes contenus dans les extraits chlorophylliens ni dans les extraits de milieux de culture.

Cependant, les milieux de culture ne seront plus lyophilisés. C'est une étape supplémentaire coûteuse en termes de temps et d'énergie. Les alcaloïdes seront alors extraits directement à partir des milieux aqueux. L'élimination des sels est possible avec un rinçage à l'eau à travers une phase inverse (moins apolaire que la C18).

4.5 SPE avec une phase 2H

La phase 2H est aussi une phase inverse mais relativement plus polaire que la phase C18. Un nouveau protocole de purification des alcaloïdes à partir des milieux de culture aqueux a été mis au point. Le protocole comprend une première purification sur 2H et une deuxième purification sur SCX (Figure 58).

Premièrement, la cartouche est conditionnée avec 3 mL d'une solution aqueuse de NH_4OH à 5%. Ensuite, 10 mL de milieux de culture alcalinisés (pH = 8) auxquels ont été ajoutés 300 µL de la solution-mère d'alcaloïdes à 200 µg/mL, ont été déposés sur l'adsorbant. Un rinçage avec 6 mL de la même solution de dépôt permet d'éliminer les sels. Les alcaloïdes ont été ensuite élués avec 10 mL de CH_3CN. La fraction obtenue a été ensuite acidifiée (pH < 5) et transférée sur une phase SCX préconditionnée avec 2 mL de MeOH contenant du HCOOH à 2% pour une deuxième purification. Le rinçage a été fait successivement avec 3 mL de MeOH contenant du HCOOH à 2%, 3 mL de CH_3CN contenant du HCOOH à 2% et 3 mL de CH_3CN. Les alcaloïdes ont été finalement élués avec 15 mL de CH_3CN

contenant 5% de NH_4OH (Figure 58). La purification sur la phase SCX permet une deuxième purification plus sélective des alcaloïdes. Les extraits ont été ensuite concentrés et leur volume ajusté à 3 mL avant d'être injectés en GCMS.

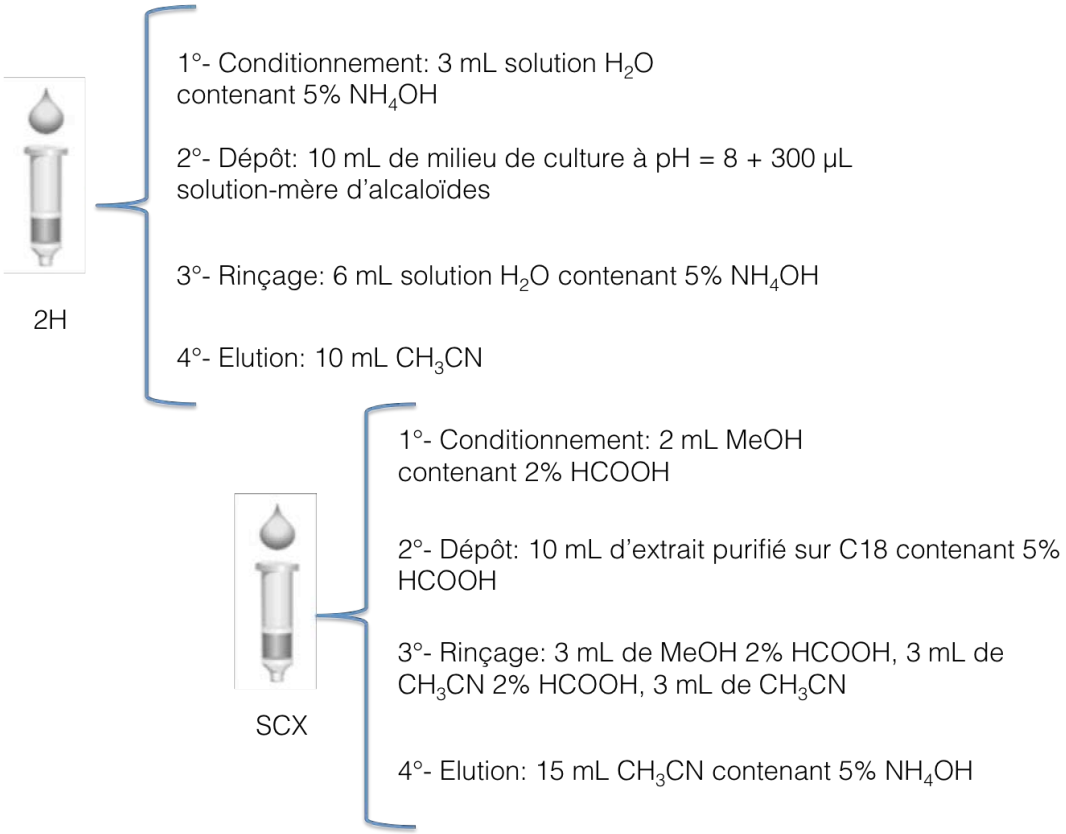


Figure 58 : Protocole de purification des alcaloïdes dans le milieu de culture mis au point avec la SPE sur une phase 2H suivie d'une SPE sur une phase SCX.

Pour l'évaluation de la méthode de purification des alcaloïdes présents dans le milieu de culture, 20 extraits de milieux de culture ont été purifiés. Les taux de récupération de l'hyoscyamine ont été calculés. La moyenne de récupération obtenue est de 95,7 ± 4.1%. L'écart type relatif est de 4,3%. C'est cette méthode qui sera appliquée pour les analyses des expériences suivantes. La méthode de purification SPE avec une phase 2H est donc adéquate pour l'extraction des alcaloïdes à partir des extraits aqueux de milieux de culture.

4.6 SPE avec une phase normale de silice

La chlorophylle est une molécule polaire non soluble dans l'eau. Partant de ce principe, une purification avec la méthode SPE sur une phase normale de silice a été mise au point. Premièrement, des essais en CCM ont été réalisés afin de choisir un éluant adéquat qui permettra la séparation de la chlorophylle des alcaloïdes.

4.6.1 CCM pour le choix de la phase mobile

La CCM est constituée d'une phase stationnaire de gel de silice déposée en couche mince sur une plaque en aluminium ou en verre. L'échantillon est fixé sur la phase puis entraîné par un solvant qui migre par capillarité. Les composés développent des interactions avec le solvant d'une part et avec la silice d'autre part. Les constituants de l'échantillon se séparent par migration différentielle : chacun d'eux est d'autant plus entrainé par l'éluant qu'il est soluble dans celui-ci et moins adsorbé sur la phase stationnaire.

Un extrait méthanolique de bulbilles auquel ont été ajoutés 300 µL de la solution-mère d'alcaloïdes (galanthamine, lycorine et hyoscyamine) a été préparé. Trois dépôts de cet extrait ainsi que trois dépôts de la solution-mère d'alcaloïdes ont été réalisés sur trois plaques de silice différentes. Chacune des plaques a été mise en contact avec un éluant différent. Trois éluants ont été testés : le premier est constitué de MeOH à 100%, le second de CH_3CN à 100% et le troisième est un mélange de MeOH et de CH_3CN (50:50, v : v). Chacune des plaque a été déposée dans l'une des trois cuves de développement. Une fois la migration achevée, les plaques ont été retirées, séchées et révélées sous UV avant d'êtres révélées par pulvérisation au réactif de Dragendorff (la composition est décrite en Annexe 3).

D'après les résultats obtenus, l'éluant idéal, permettant la séparation de la chlorophylle des alcaloïdes, est le CH_3CN à 100%. En effet, avec cette phase mobile, les alcaloïdes restent au point de dépôt, tandis que la chlorophylle migre avec le front du solvant. Avec les deux autres éluants la chlorophylle migre toujours avec le front du solvant. Les alcaloïdes quant à eux, migrent plus avec le MeOH à 100%.

La phase normale de silice est alors une phase convenable pour la séparation des alcaloïdes de la chlorophylle. La phase retient les alcaloïdes et la chlorophylle. Un rinçage à l'acétonitrile est nécessaire pour l'élution de la chlorophylle retenue. La fraction alcaloïdique est ensuite récupérée.

4.6.2 Protocole de purification SPE avec une phase normale de silice

Pour la mise au point du protocole de purification des alcaloïdes, on a procédé dans un premier temps à la purification des extraits méthanolique de bulbes *in vivo* qui renferment de la chlorophylle. Dans un second temps, nous avons purifié des extraits de bulbilles, riches en chlorophylle et en sels.

Premièrement, la cartouche de silice a été conditionnée avec 3 mL de MeOH : CH_3CN (1 mL:3 mL, v : v). Ensuite, 3mL d'un extrait méthanolique chlorophyllien de bulbes renfermant 300 µL de la solution-mère d'alcaloïdes (galanthamine, lycorine et hyoscyamine) ont été dilués au 1/3 dans du CH_3CN puis transférés dans la cartouche. Un rinçage au CH_3CN a permis d'éluer la chlorophylle. Le rinçage a été arrêté une fois que la couleur du solvant éluant de la cartouche est passée du vert à la transparence. Les alcaloïdes ont été ensuite élués avec 15 mL d'un mélange MeOH : H_2O : HCOOH (85:10:5, v : v). L'éluat obtenu a été transféré sur une cartouche SCX pour une deuxième purification.

La cartouche a été conditionnée avec 2 mL de MeOH contenant 2% de HCOOH. Une fois le dépôt effectué, la phase a été rincée successivement avec 2 mL de MeOH contenant 2% de HCOOH, 3 mL de CH_3CN contenant 2% de HCOOH et 3 mL de CH_3CN. Les alcaloïdes ont été finalement élués avec 15 mL de CH_3CN contenant 5% de NH_4OH (Figure 59). Les extraits purifiés ont été reconcentrés dans un volume final de 3 mL et injectés en GCMS pour le calcul des taux de récupération de l'hyoscyamine.

La moyenne des taux de récupération calculés pour 10 extraits de bulbes purifiés est de 98,3 ± 4,2%. L'écart type relatif est de 4,3%. Le taux de récupération de l'hyoscyamine étant satisfaisant, nous avons procédé à la purification des alcaloïdes dans les bulbilles.

Le même protocole a été appliqué avec une étape supplémentaire pour l'élimination des sels. Une étape de rinçage supplémentaire avec 3 mL de H_2O contenant 2% de NH_4OH (pH = 8) a été réalisée juste après le rinçage

au CH_3CN durant la première purification. La moyenne des taux de récupération de l'hyoscyamine calculés pour 20 extraits de bulbilles purifiés est de 107,4 ± 19,1%. L'écart type relatif est de 17,8%.

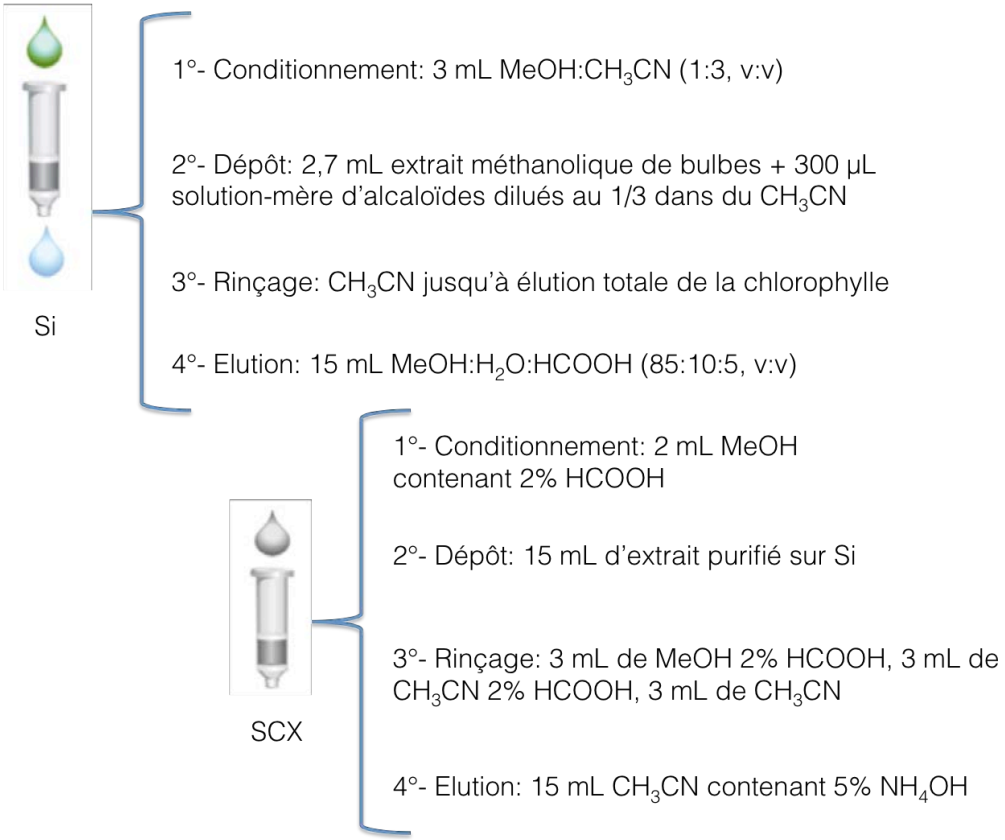


Figure 59 : Protocole de purification des alcaloïdes dans les extraits de bulbes mis au point avec la SPE sur une phase normale de silice suivie d'une SPE sur une phase SCX.

Les extraits de bulbilles ainsi purifiés et injectés en GCMS et en LCMS présentaient des chromatogrammes plus clairs, plus faciles à interpréter. Les résultats de quantification des alcaloïdes contenus dans les extraits issus des cultures *in vitro* en présence d'éliciteurs seront moins influencés par la matrice (Figure 60).

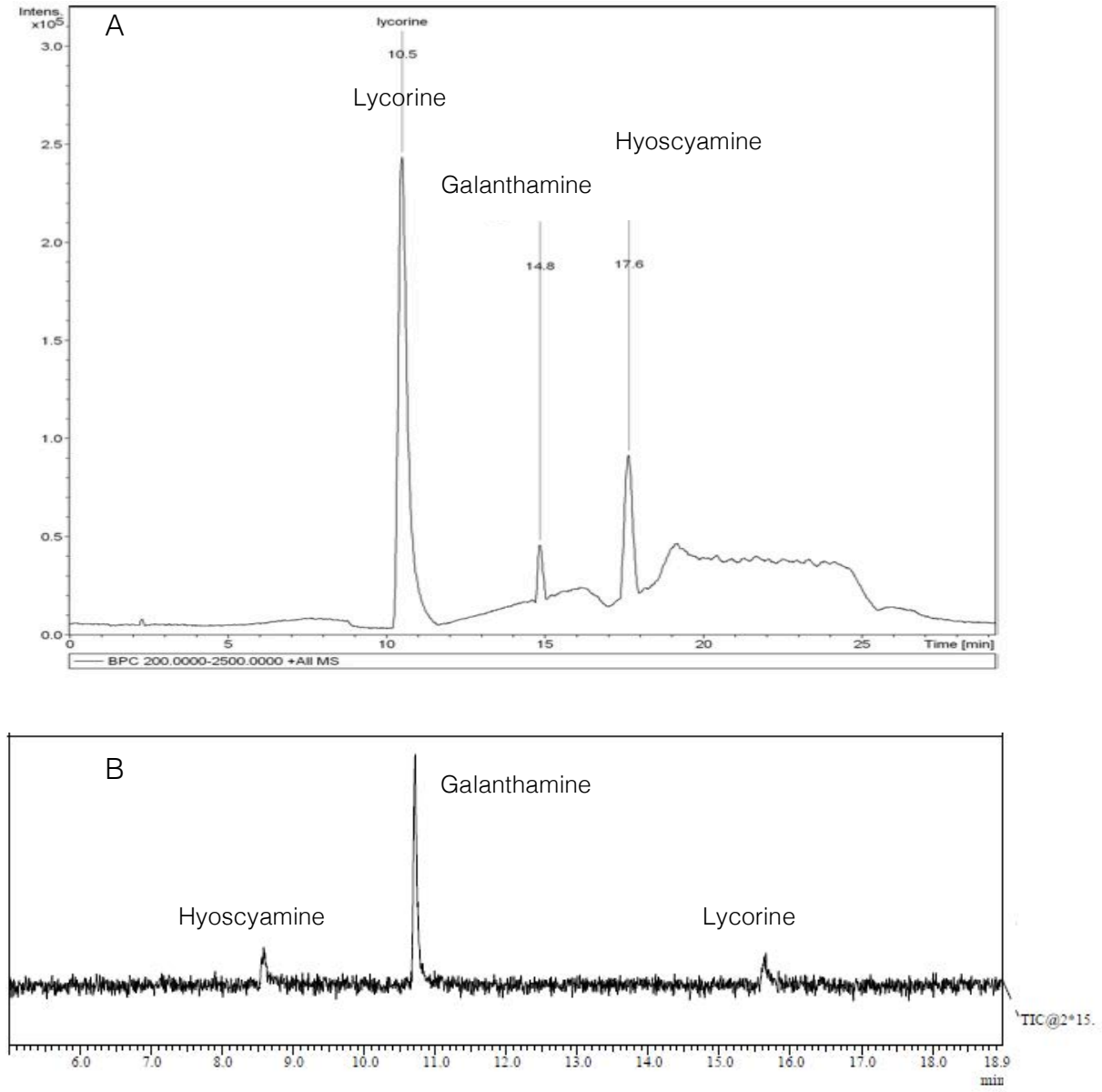


Figure 60 : Chromatogramme LCMS (A) et GCMS (B) d'un extrait de bulbilles purifié par la méthode SPE avec une phase normale de silice suivie d'une SPE sur une phase SCX.

5 Conclusion du chapitre 2

Les extraits méthanoliques bruts de bulbilles et de milieux de culture injectés directement en GCMS ou en LCMS pour le dosage des alcaloïdes renfermaient une quantité importante d'impuretés. Les analyses répétées de ces extraits non purifiés conduisaient à l'encrassement des sources d'ionisation, à la destruction des colonnes analytiques mais aussi à l'obtention de chromatogrammes difficiles à interpréter. La purification des extraits préalablement à leur injection était donc nécessaire. De ce fait, le

temps des analyses ainsi que le temps de traitement des spectres étaient considérablement réduits.

Une quantité connue d'hyoscyamine a été ajoutée aux extraits de bulbes, bulbilles et milieux de culture de *L. aestivum*. Les extraits ont été ensuite purifiés soit par la méthode traditionnelle liquide-liquide, soit par une méthode d'extraction en phase solide (SPE) qui a été mise au point. Dans le cadre des purifications par la méthode SPE, différentes phases ont été testées: la phase échangeuse de cations SCX, la phase inverse C18, la phase apolaire 2H et la phase normale de silice.

D'après les résultats obtenus, la phase C18 est trop apolaire pour assurer la rétention des alcaloïdes ou de la chlorophylle. Dans les différentes conditions testées, la chlorophylle n'a pas pu être séparée des alcaloïdes. Cet effet a aussi été observé avec une phase 2H moins apolaire. Par contre, pour la purification des alcaloïdes renfermés dans les milieux de culture, une première purification avec une phase 2H suivie d'une deuxième purification avec une SCX s'est avérée efficace. Quant aux extraits de bulbes et de bulbilles, une première purification avec une phase normale de silice suivie d'une deuxième purification sur une phase SCX ont permis d'éliminer la chlorophylle et d'obtenir des extraits purifiés d'alcaloïdes.

Pour faire la comparaison des méthodes de purification, les extraits ont été injectés en GCMS et les taux de récupération de l'hyoscyamine ont été calculés. Les résultats sont résumés dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Taux de récupération de l'hyoscyamine obtenus avec les deux méthodes de purification testées : liquide-liquide et SPE.

Méthode de purification	type d'extrait	nombre d'essais	moyenne du taux de récupération (%)	Ecart type	Ecart type relatif
liquide-liquide	bulbilles	6	40,1	24	59,8
SPE	bulbes	10	98,3	4,2	4,3
	bulbilles	20	107,4	19,1	17,8
	milieux de culture	20	95,7	4,1	4,3

Les taux de récupération varient fortement selon la méthode de purification utilisée. La moyenne des taux de récupération de l'hyoscyamine dans les extraits de bulbilles avec la méthode liquide-liquide est de 40,1 ± 24,0% alors qu'elle est de 107,4 ± 19,1% avec la méthode SPE.

Par conséquent, la méthode SPE présente plusieurs avantages par rapport à la méthode liquide-liquide. Cette dernière est non répétable, ce qui n'est pas le cas avec la méthode SPE. La méthode liquide-liquide est longue (environ 1 h 30'/échantillon), tandis que la méthode SPE est relativement rapide (4 h 30' pour 24 échantillons en utilisant le manifold à 24 puits). Avec la méthode SPE on récupère la totalité des alcaloïdes extraits alors qu'avec la méthode traditionnelle, on en perd en moyenne 60%. En outre, la méthode SPE est automatisable, un atout que ne possède pas la méthode traditionnelle. En conclusion, les échantillons obtenus avec les cultures en présence des éliciteurs seront purifiés avec la méthode SPE avant leur injection en LCMS ou en GCMS.

Notons que le taux de récupération de l'hyoscyamine obtenu avec les bulbilles en appliquant la méthode SPE était de 107,4% avec un écart type relatif de 17,8. Le résultat supérieur à 100% n'indique pas une production d'alcaloïdes durant l'étape de purification mais une erreur sur la concentration de l'étalon interne. En effet, dans la courbe de calibration, la concentration de l'hyoscyamine variait entre 18 et 21 µg/mL. Or, pour le calcul du taux de récupération de l'ei, on a considéré la concentration constante théorique de 20 µg/mL. Cette erreur relative peut conduire à des résultats supérieurs à 100%. Pour le calcul de la concentration de galanthamine, de lycorine et de l'hyoscyamine, en tenant compte du taux de récupération de l'ei, dans les chapitres suivants, la valeur de la concentration de l'ei considérée est égale à la moyenne des concentrations de l'hyoscyamine dans la gamme étalon et dans les blancs. Ceci permet de s'affranchir de l'erreur relative induite par l'incertitude sur la concentration de l'hyoscyamine.

Chapitre 3 : Impact d'un précurseur de la voie de biosynthèse sur la production de galanthamine et de lycorine *in vitro*

Plus de 500 alcaloïdes ont été isolés à partir de la famille des Amaryllidaceae[24]. Les activités pharmacologiques variées d'un grand nombre d'entre eux ont pu être déterminées. De nos jours, la galanthamine est le seul alcaloïde d'Amaryllidaceae commercialisé. C'est un inhibiteur réversible de l'AchE utilisé dans le traitement palliatif de la maladie d'Alzheimer[165]. Un autre alcaloïde d'intérêt est la lycorine. Celle-ci possède plusieurs activités biologiques, en particulier anti tumorale[7], apoptotique[52], antivirale[5], antimalariale[55] et analgésique[2].

Pour les applications thérapeutiques, la galanthamine est principalement extraite des plantes du genre *Leucojum* et *Narcissus*[69]. Elle peut être obtenue également par voie chimique. Cependant, le respect de la configuration de ses trois centres d'asymétrie afin d'obtenir la forme naturelle active, rend cette méthode d'obtention difficile et coûteuse[166].

Ces alcaloïdes, produits du métabolisme secondaire, sont synthétisés en faibles quantités par les plantes. Les sources naturelles ne peuvent pas, à elles seules, pallier aux besoins grandissants du marché pharmaceutique. C'est pour cette raison que les scientifiques ont recours à la culture *in vitro* comme méthode alternative pour l'obtention de ces alcaloïdes à haute valeur ajoutée. Cependant, le manque d'informations concernant la voie de biosynthèse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae et sa régulation rend l'optimisation des conditions de culture plus difficile. En effet, les renseignements sur la voie de biosynthèse restent incomplets[13]. Les études menées par Barton et al.[32, 96]et par Eicchorn et al.[36] en utilisant des précurseurs radiomarqués, ont permis l'élucidation des premières étapes de la voie de biosynthèse de ces alcaloïdes. En dépit de la grande diversité de leurs structures chimiques, les alcaloïdes d'Amaryllidaceae partagent un précurseur commun, la 4'-*O*-méthylnorbelladine (MN).

L'optimisation de la biosynthèse des alcaloïdes d'Amarylliadceae, surtout celle de la galanthamine, par des cultures *in vitro* de *L. aestivum* a été

largement étudiée durant ces dernières années. Ces études ont permis de définir plusieurs facteurs clés influençant la voie de biosynthèse, parmi lesquels : la différenciation cellulaire[88, 166], l'ajout de précurseurs de la voie de biosynthèse[21, 95] et le mode de culture (cultures en milieu solide ou en milieu liquide, cultures en Erlenmeyers ou en bioréacteurs)[95, 100].

1 Résultats des études antérieures réalisées au laboratoire

Pour la stimulation de la voie de biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine, El Tahchy et al.,[21, 95] ont testé l'effet du précurseur MN deutéré ajouté aux milieux de culture liquides des bulbilles de *L. aestivum*. Trois concentrations différentes du précurseur MN (0,05 ; 0,10 et 0,20 g/L) ont été ajoutées à 2 g de bulbilles mises en culture dans des Erlenmeyers contenant 20 mL de milieu MS liquide additionné des phytorégulateurs ANA (10 µM) et BAP (5 µM). Des arrêts de cultures ont été effectués après 15, 30 et 40 jours.

Tout d'abord, l'effet de l'ajout du précurseur deutéré sur le taux de croissance des bulbilles a été évalué[21, 95]. D'après les résultats obtenus, les taux de croissance en présence du précurseur étaient plus faibles que ceux en l'absence du précurseur. Ce dernier serait toxique pour les bulbilles. Paradoxalement, avec la plus faible concentration de précurseur (0,05 g/L) les plus faibles taux de croissance ont été obtenus.

Après chaque arrêt de culture, les bulbilles et les milieux de culture ont été récupérés. Les alcaloïdes ont été extraits. Les extraits méthanoliques bruts ainsi obtenus ont été directement injectés en GCMS et en LCMS.

Afin d'identifier les alcaloïdes présents dans les extraits, les chromatogrammes et les spectres de masse obtenus en GCMS ont été analysés[95]. L'identification des alcaloïdes deutérés ou non, a été faite selon deux critères : leur temps de rétention et leur spectre de fragmentation. Ces données ont été comparées à d'autres publiées dans la littérature. Les alcaloïdes deutérés ainsi que leurs homologues non deutérés présentaient les mêmes temps de rétention et les mêmes spectres de fragmentation. Cependant, leurs masses moléculaires différentes ont permis leur différenciation. Les ions moléculaires de la galanthamine et de la lycorine

avaient des rapports m/z de 287. Leurs homologues deutérés présentaient des m/z respectivement à 290 (galantamine-d_3) et à 289 (lycorine-d_2).

Ainsi, en plus du précurseur deutéré, six alcaloïdes deutérés ont été identifiés dans les extraits : déméthylnarwédine-d_3, déméthylgalanthamine-d_3, lycorine-d_2, galanthamine-d_3, crinine-d_2 et déméthylmarithidine-d_3 [95]. Tous les alcaloïdes deutérés ont été détectés après 15 jours de culture exceptée la lycorine-d_2 détectée après 40 jours de culture. Ces résultats ont montré, d'une part, que le précurseur a bien été absorbé et métabolisé par les bulbilles et, d'autre part, que les alcaloïdes synthétisés par les bulbilles diffusent dans le milieu de culture.

Entre J0 et J15 la quantité de précurseur restant dans le milieu de culture a fortement diminué quelque soit la concentration de MN-d_3 employée[95]. Au bout de 30 jours de culture, seulement des traces de précurseur ont été détectées dans les milieux. Parallèlement, la quantité de précurseur deutéré a augmenté dans les bulbilles et a atteint son maximum après 15 jours de culture. A partir du J15 et jusqu'à J30, la quantité de précurseur a diminué. Seulement des traces de précurseur ont été détectées au bout de 40 jours de culture. Ces résultats ont prouvé l'absorption du précurseur et sa métabolisation par les bulbilles de *L. aestivum*.

Après l'analyse phytochimique des extraits de bulbilles, El Tahchy et al.[21] ont défini les conditions optimales pour la biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine natives. En effet, celles-ci ont été stimulées en présence du précurseur deutéré. La concentration la plus importante de galanthamine native a été obtenue après 15 jours de culture en présence de 0,10 gL/ de MN-d_3. Sous ces conditions de culture, la concentration la plus élevée de lycorine native a été aussi mesurée. Un autre pic de lycorine a été obtenu après 40 jours de culture en présence de 0,10 et de 0,20 g/L de MN-d_3. Des traces de galanthamine et de lycorine natives ont été détectées dans les milieux de culture.

La galanthamine et la lycorine deutérées ont été détectées dans les bulbilles et dans les milieux de culture. Cependant leurs concentrations étaient relativement faibles par rapport à celles de leurs homologues natifs. Les alcaloïdes deutérés ont été détectés après 30 jours de culture. La biosynthèse des alcaloïdes deutérés a commencé après la diminution de la production des alcaloïdes natifs. Ces résultats ont montré que l'ajout du

précurseur a stimulé les bulbilles à métaboliser d'abord le précurseur MN natif contenu dans leurs tissus puis, une fois que celui-ci a été épuisé, d'utiliser le précurseur MN-d_3.

2 Objectifs du travail actuel

Dans le travail précédent, trois facteurs clés influençant la biosynthèse des alcaloïdes ont été mis en évidence. En effet, la capacité biosynthétique de **tissus différenciés** mis en culture dans **un milieu liquide** a été évaluée en présence d'un **stimulateur de la voie de biosynthèse**. Pour le travail actuel, ces trois facteurs ont été pris en compte.

Dans un premier temps, la stimulation de l'accumulation en galanthamine et en lycorine a été obtenue en ajoutant le précurseur MN non marqué au milieu de culture de bulbilles de *L. aestivum*. La synthèse de la MN a été optimisée. Dans un second temps, la durée de la culture a été prolongée jusqu'à 50 jours et une nouvelle concentration de MN (0,15 g/L de milieu de culture) a été testée. Par ailleurs, les cultures ont été menées dans des bioréacteurs RITA® en vue d'augmenter l'échelle de production des alcaloïdes. Tous les extraits ainsi obtenus ont été purifiés par la méthode de purification SPE et injectés en LCMS pour la quantification de la galanthamine et de la lycorine.

3 Optimisation de la synthèse du précurseur MN

La synthèse du précurseur deutéré a été réalisée au sein de SRSMC, groupe MOBAT, en collaboration avec le Dr. Michel Boisbrun.

Pour les cultures des bulbilles en Erlenmeyers et en bioréacteurs RITA®, le précurseur MN non deutéré a été utilisé en vue de stimuler la voie de biosynthèse des alcaloïdes. La MN a été synthétisée à partir de l'isovanilline en suivant le protocole décrit par Szewczyk et al[150]. Il a été remarqué que le produit obtenu était difficilement soluble dans l'acétate d'éthyle, aussi ce protocole nécessitant plusieurs extractions dans ce solvant était fastidieux. De plus, le rendement que nous avons obtenu était de 33% alors que celui rapporté par l'équipe de Szewczyk était de 99%. Pour cette raison, un protocole plus facile a été développé.

Après l'étape de l'amination réductrice et l'ajustement du pH, une simple filtration suivie d'une recristallisation dans l'éthanol a donné le composé MN pure avec un rendement de 47%. Le protocole optimisé est alors le suivant :

À 70 mL de MeOH anhydre 2,500 g (16,43 mmol) d'isovanilline, 2,250 g (16,43 mmol) de tyramine et 15 g de tamis moléculaire 4 Å ont été ajoutés. La suspension a été laissée durant une nuit sous agitation à température ambiante et sous atmosphère d'argon. Le mélange a été ensuite filtré et refroidi à 0°C avant l'ajout de 1,243 g (32,86 mmol) de $NaBH_4$ par portions tout en agitant. La suspension blanche ainsi obtenue a été mise sous agitation pendant 3 heures. Le solvant a été ensuite évaporé et le résidu mis en suspension dans 100 mL d'un mélange d'eau distillée et d'eau saturée en sels (50mL:50 mL, v : v), le pH a été ajusté à 8 avec de l'HCl à 3 M. A la suspension, 200 mL d'EtOAc ont été ajoutés et le mélange a été agité. La suspension a été filtrée et le composé solide a été lavé avec de l'eau (40 mL) et de l'EtOAc (50 mL). Il a été ensuite dissout dans de l'éthanol à reflux et la solution obtenue a été filtrée. Une fois refroidie, 15 mL de HCl aqueux concentré ont été ajoutés au filtrat qui a été placé à 4°C durant toute la nuit. La solution a ensuite été filtrée et les cristaux blancs ainsi récupérés, lavés avec de l'éthanol glacé et séchés pesaient 1,900 g. Le filtrat a été évaporé à sec, redissout dans de l'éthanol à reflux (32 mL) et laissé durant la nuit à 4°C pour un deuxième jet de cristallisation. Après filtration, 450 mg de cristaux blancs ont été obtenus. Après séchage, 2,350 g (7,59 mmol, 47% de rendement) de cristaux blancs ont été récupérés.

Caractéristiques des cristaux blancs de MN obtenus : température de fusion 196°C (195°C d'après Szewczyk et al.[150]). ^{1}H RMN (DMSO-d_6) : *d* 2,85 (m, 2 H, CH_2), 2,98 (m, 2 H, CH_2), 3,77 (s, 3 H, CH_3), 3,98 (s, 2 H, CH_2), 6,71 (d, *J* = 7,5 Hz, 2 H, H_{arom}), 6,91-7,05 (m, 5 H, H_{arom}), 9,15 (br s, 3 H, OH + NH_2^+), 9,34 (s, 1 H, OH); ^{13}C RMN (DMSO-d_6, 62,5 MHz): *d* 30,6, 47,5, 49,5, 55,6, 112,0, 115,4, 117,4, 121,3, 124,2, 127,2, 129,4, 146,4, 148,1, 156,2; ESI-MS: m/z 274 $[M+H]^+$; Analyse élémentaire: pour $C_{16}H_{20}ClNO_3$: C 62,03; H 6,51; N 4,52; trouvé: C 62,18; H 6,55; N 4,62.

4 Ajout du précurseur au milieu de culture liquide de bulbilles de *L. aestivum* en Erlenmeyer

Deux séries d'expériences ont été menées en ajoutant le précurseur aux cultures *in vitro* de *L. aestivum* en Erlenmeyers.

Première série d'expériences :

Dans le but de stimuler les voies de biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine, une série d'expériences a été réalisée en suivant le protocole décrit par El Tahchy et al.[21] (série d'expériences *a*, paragraphe 5.2.1 du chapitre Matériels et Méthodes). Dans cette étude nous avons travaillé avec le précurseur MN non deutéré. Ainsi, dans des Erlenmeyers de 100 mL, 2 g de bulbilles de *L. aestivum* âgées de 12 mois ont été mis en culture dans 20 mL de milieu MS liquide additionné de saccharose (60 g/L), de phytorégulateurs (10 µM de ANA et 5 µM de BAP) et de trois concentrations différentes de MN (0,05 ; 0,10 et 0,20 g/L). Des arrêts de culture au bout de 15, 30 et 40 jours ont été réalisés. Trois répétitions, pour chaque condition, ainsi que des cultures témoins privées de MN ont été établies (un total de 39 cultures).

4.1 Evaluation des taux de croissance des bulbilles

Après chaque arrêt de culture, les bulbilles ont été récupérées, lavées avec trois bains successifs d'eau stérile puis séchées. Les taux de croissance ont été ensuite évalués en appliquant la formule ci-dessous :

(Masse de la matière fraîche finale MF_f - Masse de la matière fraîche inoculée MF_i) / MF_i.

Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 61.

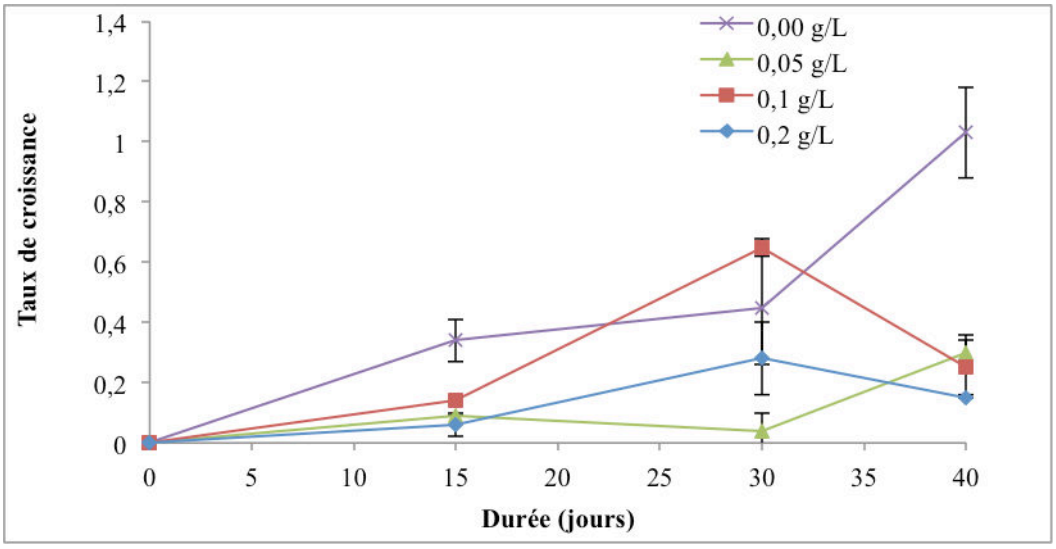


Figure 61 : Evaluation du taux de croissance des bulbilles de *L. aestivum* en présence de 0,05 ; 0,10 et 0,20 g/L de MN. Les résultats sont la moyenne de trois répétitions.

Avec les échantillons témoins, le taux de croissance des bulbilles était de 0,34 ± 0,07 après 15 jours de culture. Ce taux a augmenté durant toute la durée de culture jusqu'à atteindre un maximum de 1,03 ± 0,15 après 40 jours. En présence du précurseur et quelque soit la concentration employée, les taux de croissance des bulbilles étaient similaires jusqu'au 15ème jour de culture. Il est à noter que durant cette période, les taux de croissance calculés en présence du précurseur sont plus faibles que ceux en l'absence du précurseur. Au bout de 30 jours de culture, le taux de croissance le plus élevé (0,65 ± 0,06) a été obtenu en présence de 0,10 g/L de MN. En présence de 0,10 et de 0,20 g/L de MN, et entre 30 et 40 jours de culture, les taux de croissance avaient la même tendance ; ils ont diminué. Cependant, un autre cas de figure se présente avec 0,05 g/L de MN. En effet, après 30 jours de culture, le taux de croissance le plus faible (0,04 ± 0,03) a été obtenu avec la plus faible concentration de précurseur. Par contre, entre 30 et 40 jours de culture, ce taux a augmenté. El Tahchy et al.[21] avaient observé le même phénomène. Ces résultats peuvent être expliqués par une corrélation qui existerait entre le taux de croissance des bulbilles et la synthèse des alcaloïdes.

4.2 Analyse quantitative des alcaloïdes en LCMS

Après chaque arrêt de culture, les alcaloïdes ont été extraits à partir des bulbilles et des milieux. Ensuite, les extraits additionnés de 50 µL de la solution-mère d'hyoscyamine à 200 µg/mL ont été purifiés par la méthode

SPE. Pour les alcaloïdes contenus dans les bulbilles, une première purification impliquant une phase normale de silice suivie d'une deuxième purification utilisant une phase SCX ont été réalisées. Quant aux milieux de culture, ils ont été purifiés d'abord à travers une phase apolaire 2H puis à travers une phase SCX (Figure 62). Les extraits purifiés ont été reconcentrés dans un volume final de 5 mL (concentration théorique en ei égale à 2 µg/mL). Dans le but de déterminer les quantités de galanthamine, lycorine et MN contenues dans les extraits et de suivre leur cinétique d'accumulation ou de biotransfomation dans les conditions de culture testées, les échantillons ont été injectés en LCMS. La méthode utilisée est celle décrite dans le paragraphe 11.1 du chapitre Matériels et Méthodes et elle est validée dans le premier chapitre Résultats et Discussions. Pour la quantification du précurseur, la même méthode LCMS a été utilisée. La MN avait un temps de rétention de 14 min et un $[M+H]^+$ à m/z égal à 274,165 ± 0,05. Une courbe de calibration a été tracée (Figure 62).

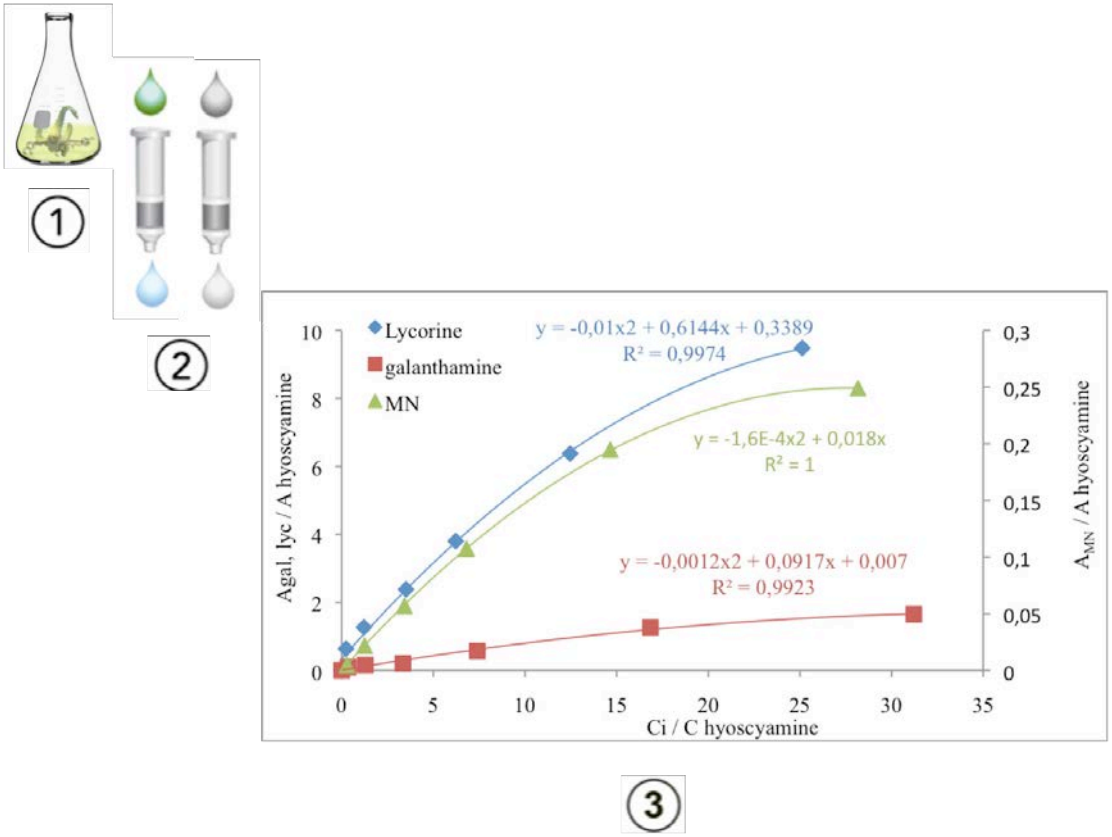


Figure 62 : Arrêt des culture (1), extraction des alcaloïdes et purification des extraits par SPE (2), quantification des alcaloïdes par LCMS (3).

A J0, 0,05 ; 0 ,10 et 0,20 g/L de précurseur MN ont été ajoutés aux milieux de culture. Les concentrations en MN dans le milieu de culture ont

diminué jusqu'à 15 jours de culture et seulement des traces étaient détectées après 40 jours de culture (Figure 63 A). Parallèlement, les concentrations de MN ont augmenté dans les bulbilles jusqu'à 15 jours de culture, où l'absorption maximale (0,9 ± 0,1 mg/g MS) a été atteinte en présence de 0,10 g/L de MN (Figure 63 B). Après 30 jours de culture, les quantités de précurseur ont chuté dans les tissus indiquant la métabolisation de celui-ci en d'autres alcaloïdes d'Amaryllidaceae.

En comparant la cinétique d'absorption et de métabolisation du précurseur avec le taux de croissance des bulbilles, on constate que l'accumulation de la MN dans les bulbilles à J15 est accompagnée d'un faible taux de croissance. Par contre, la métabolisation du précurseur par les bulbilles est accompagnée de l'augmentation du taux de croissance entre 15 et 30 jours de culture. Ces résultats semblent montrer un effet toxique du précurseur sur la croissance des cellules végétales.

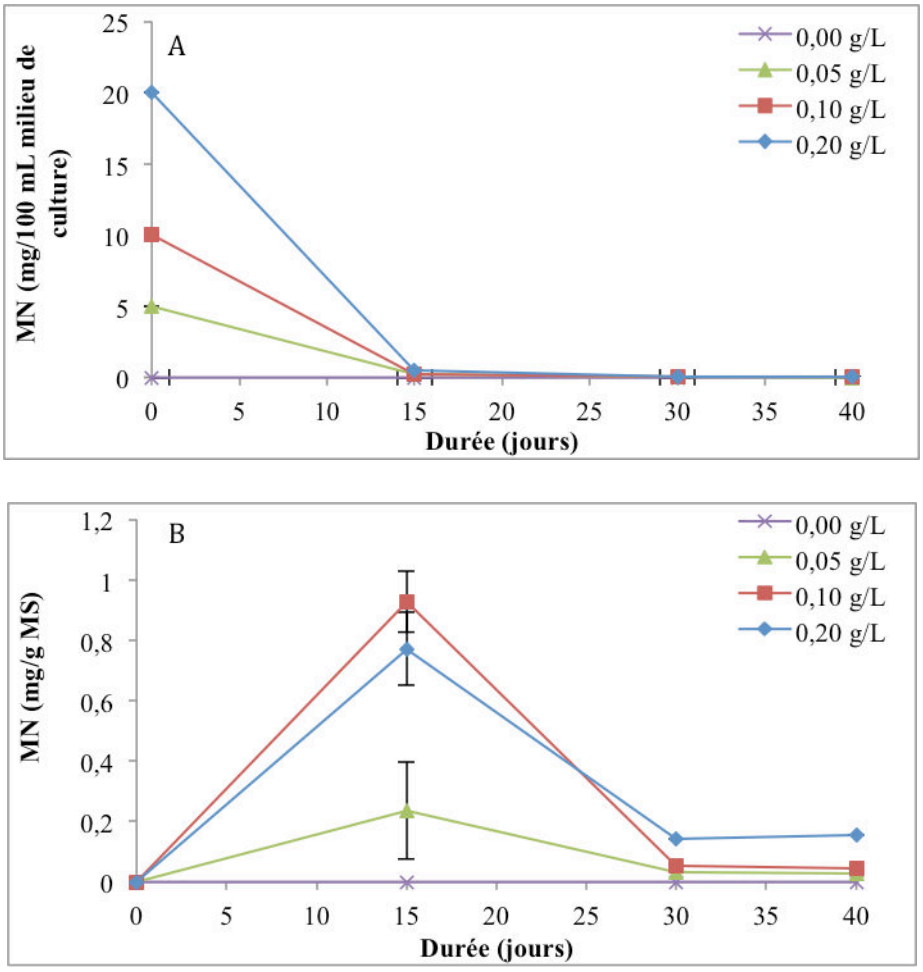


Figure 63 : Quantités de MN contenues dans les milieux de culture (A) et dans les extraits de bulbilles de *L. aestivum* (B) mises en culture en présence de 0,05 ; 0,10 et 0,20 g/L de précurseur MN.

Durant toute la durée de culture, la biosynthèse de la galanthamine par les bulbilles en l'absence et en présence de 0,05 et 0,20 g/L de précurseur était très faible (Figure 64 A). Cependant, en présence de 0,10 g/L de MN, la biosynthèse de la galanthamine a été stimulée de J0 jusqu'à J15 où elle a atteint un maximum de 0,494 mg/g de matières sèches MS (Figure 64 A). Après 30 jours de culture, la quantité de galanthamine contenue dans les bulbilles a chuté, elle était non détectable. Une restimulation de cette voie de biosynthèse a été observée après 40 jours de culture. Dans les milieux de culture (Figure 64 B), la concentration la plus élevée en galanthamine (0,16 ± 0,07 mg/100 mL de milieu de culture) a été mesurée à J15, soit 15 jours avant que la concentration la plus élevée avec les témoins ait été atteinte. D'après les résultats obtenus, l'ajout de 0,10 g/L de précurseur a induit la stimulation de la voie de biosynthèse de la galanthamine. El Tahchy et al.[21] ont observé le même phénomène qu'ils ont tenté d'expliquer par la transformation de la galanthamine en d'autres alcaloïdes. D'ailleurs, pour soutenir cette hypothèse, les auteurs ont mis en évidence la présence de narwédine-d_3 et N-formylgalanthamine-d_3 dans les cultures.

Concernant la lycorine, celle-ci avait une concentration presque constante (0,04 mg/g MS) en l'absence du précurseur durant toute la période de culture (Figure 64 C). Dans les milieux (Figure 64 D), seulement des traces ont été détectées jusqu'au J15, ensuite la concentration en lycorine a atteint 0,09 mg/100 mL de milieu de culture entre J30 et J40. La synthèse de la lycorine dans les bulbilles a été stimulée par l'ajout du précurseur MN. A J15, des concentrations maximales de 0,193 ± 0,04 et 0,1 ± 0,012 mg/g MS ont été atteintes en présence de 0,10 et 0,05 g/L de MN respectivement. A J30, la concentration en lycorine était très faible quelque soient les conditions de culture. Après 40 jours de culture, elle a augmenté et atteint de nouveau 0,197 ± 0,016 et 0,159 ± 0,023 mg/g MS en présence de 0,20 et 0,10 g/L de précurseur respectivement. L'ajout de la MN a conduit à la stimulation de la biosynthèse de la lycorine dont le pic maximal a été obtenu 15 jours plus tôt que celui observé avec les témoins. Dans les milieux de culture auxquels 0,10 g/L de MN ont été ajoutés, la concentration la plus élevée de lycorine relarguée (0,36 ± 0,09 mg/100 mL de milieu de culture) a été observée à J30 alors que l'accumulation de la lycorine était minimale dans les bulbilles. Ces courbes peuvent s'expliquer par le relargage de la lycorine depuis les tissus végétaux dans le milieu de culture à J30.

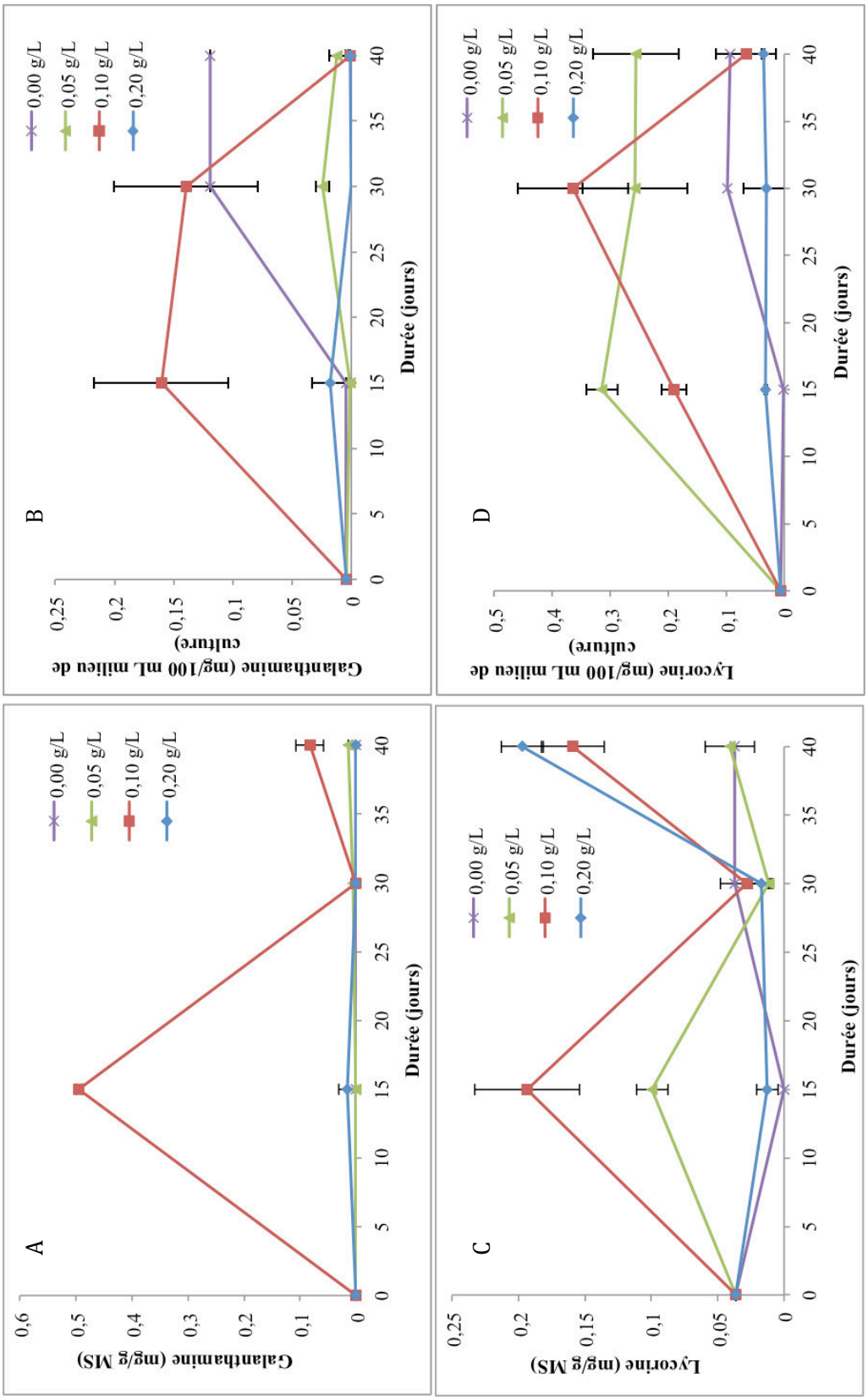


Figure 64 : Quantités de galanthamine et de lycorine dans les extraits de bulbilles de *L. aestivum* et relarguées dans les milieux de culture en présence de 0,05 ; 0,10 et 0,20 g/L de MN.

4.3 Conclusion partielle

L'effet de l'ajout de 3 concentrations différentes (0,05; 0,10 et 0,20 g/L) de MN au milieu de culture liquide de bulbilles de *L. aestivum* a été évalué. La culture traditionnelle en immersion continue avec agitation a été utilisée. Les résultats obtenus sont comparables à ceux obtenus par El Tahchy et al[21]. Le précurseur a un double effet à la fois sur la biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine. D'une part, il a stimulé la production de ces deux alcaloïdes par rapport aux témoins et d'autre part, il a induit leur accumulation et leur relargage 15 jours plus tôt qu'avec les cultures témoins.

En termes de biosynthèse, la concentration maximale de galanthamine (0,494 mg/g MS v/s 0,01 mg/g de MS dans les échantillons témoins) et la concentration maximale de lycorine (0,193 mg/g ± 0,04 MS v/s 0,04 mg/g MS avec les témoins) ont été obtenues après 15 jours de culture en présence de 0,10 g/L de précurseur dans le milieu de culture. A 0,20 g/L, le précurseur a aussi stimulé la biosynthèse de la lycorine (0,197 ± 0,016 mg/g MS) après 40 jours de culture. En effet, au bout de 40 jours une restimulation de la biosynthèse a été observée pour les deux alcaloïdes dosés. Il serait donc intéressant d'augmenter la durée de culture afin de voir si des pics d'alcaloïdes plus importants ne seraient pas atteints après 40 jours.

En outre, on a remarqué que l'analyse des milieux de culture était coûteuse et fastidieuse. En effet, la purification par la méthode SPE en employant la phase 2H coûte 7,5 €/échantillon. De plus, en analysant un batch d'extraits de milieux (39 échantillons) le signal était perdu au bout de 13 analyses en moyenne. En fait, une grande partie des sels persistait après l'étape de traitement et pour pallier au problème, deux purifications successives à travers la cartouche 2H sont recommandées. Comme seules des traces d'alcaloïdes ont été relarguées, les milieux de culture ne seront plus analysés par la suite. Comme la cinétique d'absorption du précurseur ajouté ne sera plus évaluée dans les milieux de culture, il n'apparaît non plus nécessaire de l'évaluer dans les bulbilles. En effet, en changeant les conditions de culture (quantité de précurseur/bulbille notamment), c'est l'analyse de la quantité de MN dans les milieux de culture qui nous renseigne sur son absorption. La preuve de la métabolisation de la MN ayant été apportée par ailleurs, l'identification et la quantification du profil alcaloïdique des bulbilles suffiront pour évaluer l'effet du précurseur par comparaison à des témoins.

Deuxième série d'expériences :

Dans le but d'améliorer la stimulation de la biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine par ajout du précurseur MN et d'évaluer l'effet de celui-ci au-delà de 40 jours de culture, une série d'expériences a été réalisée en suivant le protocole décrit dans le paragraphe 5.2.1 du chapitre Matériel et Méthodes (série d'expériences *b*). Ainsi, trois concentrations différentes de précurseur (0,10 ; 0,15 et 0,20 g/L) ont été ajoutées aux milieux de culture MS liquide (de volume égal à 30 mL/Erlenmeyer) avec 2 g de bulbilles de *L. aestivum* âgées de 12 mois. Des arrêts de culture au bout de 15, 30, 40 et 50 jours de culture ont été réalisés. Trois répétitions pour chaque condition ainsi que des témoins ont été établis (51 Erlenmeyers au total).

4.4 Evaluation des taux de croissance des bulbilles

Les taux de croissance des bulbilles ont été calculés comme décrit précédemment. Les résultats sont présentés dans la Figure 65.

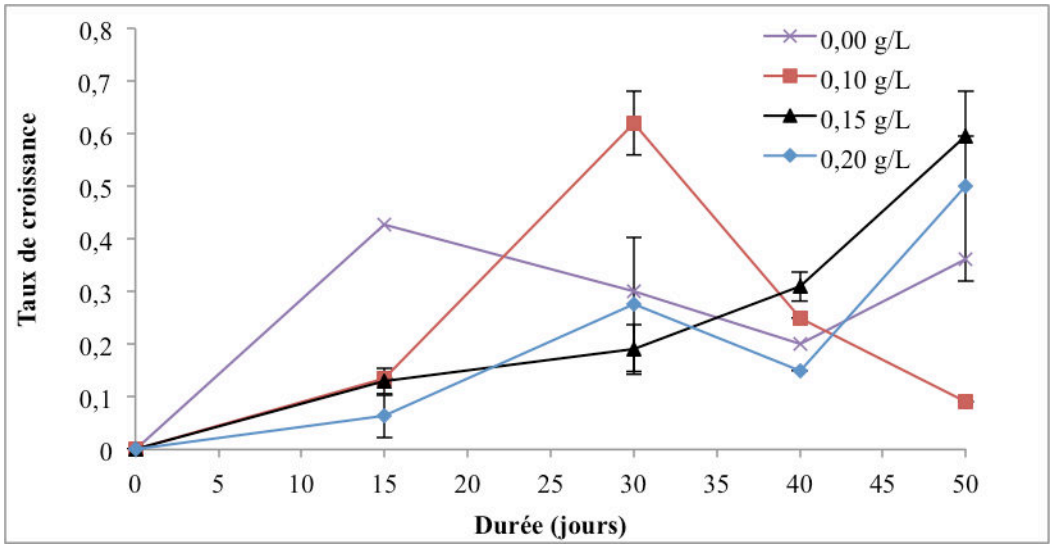


Figure 65: Evaluation du taux de croissance des bulbilles de *L. aestivum* en présence de 0,10 ; 0,15 et 0,20 g/L de MN. Les résultats sont la moyenne de trois répétitions.

Après 15 jours de culture, le taux de croissance des bulbilles cultivées en l'absence du précurseur était plus élevé (0,4) que ceux en présence de la MN. A J30, le meilleur taux de croissance (0,6 ± 0,06) a été obtenu en présence de 0,10 g/L de MN. Parallèlement, la croissance des bulbilles témoins avait chuté et était comparable à celle des bulbilles cultivées en

présence des deux autres concentrations de précurseur. Au bout de 40 jours de culture, les taux de croissance calculés avec toutes les conditions étaient proches. Le taux calculé avec 0,15 g/L de MN avait augmenté alors que les taux des autres conditions avaient diminué. A l'exception de la valeur obtenue avec 0,10 g/L de MN, tous les taux de croissance avaient augmenté après 50 jours de culture et il n'y avait pas de différence significative entre eux. Notons que l'allure des courbes obtenues avec les témoins et en présence de 0,20 g/L de MN est presque similaire. La seule différence est le pic de croissance survenant 15 jours plus tard en présence de la MN. Avec 0,10 g/L de précurseur, le taux de croissance augmente jusqu'à atteindre un pic à J30 puis rechute jusqu'à la fin de la période d'incubation. Cependant, le taux de croissance augmente tout au long de l'expérience avec 0,15 g/L de MN. Ainsi, les valeurs obtenues avec cette condition étaient les plus faibles durant le premier mois de culture et les plus élevées à partir de J40.

A l'exception du taux de croissance calculé en l'absence du précurseur à J40, les allures des courbes obtenues en l'absence du précurseur ainsi qu'en présence de 0,10 et 0,20 g/L de MN sont comparables avec celles de la première série d'expériences.

4.5 Analyse quantitative des alcaloïdes en LCM

Après chaque arrêt de culture, les alcaloïdes ont été extraits à partir des bulbilles. Les extraits méthanoliques obtenus, additionnés de 50 µL de la solution-mère d'hyoscyamine à 200 µg/mL, ont été purifiés par la méthode SPE. Les extraits purifiés ont été reconcentrés dans un volume final de 5 mL (concentration théorique de l'ei est égale à 2 µg/mL) et injectés en LCMS pour le dosage de la galanthamine et de la lycorine.

Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 66.

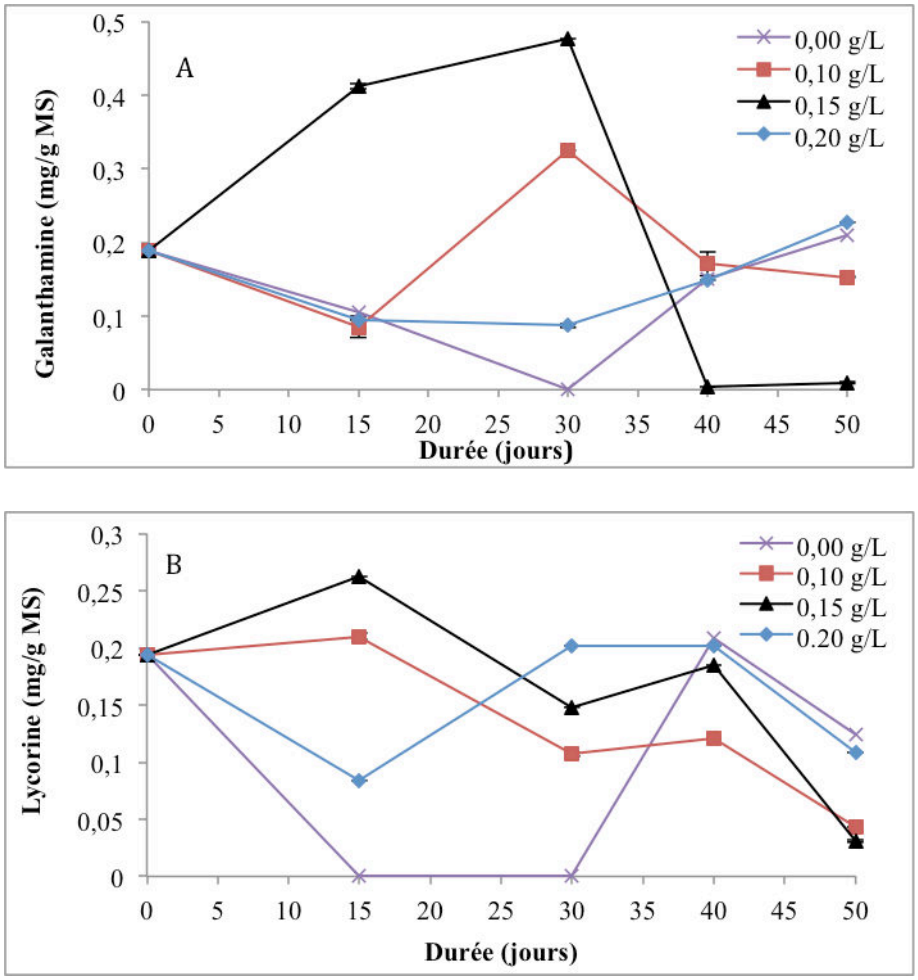


Figure 66: Quantités de galanthamine (A) et de lycorine (B) contenues dans les extraits de bulbilles de *L. aestivum* en présence de 0,10 ; 0,15 et 0,20 g/L de MN.

Contrairement à la première série d'expériences, les bulbilles à J0 renfermaient de la galanthamine (0,2 mg/g MS) et de la lycorine (0,2 mg/g MS). L'accumulation maximale en galanthamine (Figure 66 A ; 0,476 mg/g MS) a été atteinte après 30 jours de culture en présence de 0,15 g/L de MN dans les milieux de culture. Dans ces conditions, l'accumulation en galanthamine dans les bulbilles a augmenté durant le premier mois de culture pour chuter drastiquement après 30 jours où des traces étaient détectées. En présence de 0,10 g/L de MN, la même allure de la courbe a été observée avec la première série d'expériences avec un décalage du pic de biosynthèse en galanthamine de 15 jours. Avec 0,00 et 0,20 g/L de MN, les allures des courbes suivent la même tendance. Cependant à J30, l'accumulation en galanthamine était non détectable dans les bulbilles témoins.

La concentration maximale en lycorine (Figure 66 B ; 0,262 mg/g MS) a été atteinte après 15 jours de culture en présence de 0,15 g/L de MN. Avec 0,10 et 0,15 g/L de précurseur, les cinétiques d'accumulation de la lycorine avaient les mêmes tendances sachant que les concentrations calculées avec la deuxième condition sont plus importantes qu'avec la première. En présence de 0,20 g/L de MN, la concentration en lycorine dans les bulbilles a augmenté entre 20 et 40 jours de culture (0,202 mg/g MS) puis elle a diminué entre 40 et 50 jours. En l'absence du précurseur, la biosynthèse était faible durant les 30 premiers jours de culture, cependant, au-delà de cette période, la concentration en lycorine a augmenté et un pic à J40 a été observé (0,209 mg/g MS).

L'ajout du précurseur a donc permis de stimuler les voies de biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine. La biosynthèse de la première a été augmentée de 2,3 fois (en comparant le pic obtenu avec 0,15 g/L de MN et le pic obtenu avec les témoins) et celle de la lycorine de 1,25 fois. Le pic de galanthamine a été obtenu 20 jours plus tôt qu'avec les témoins et celui de la lycorine 25 jours plus tôt. Le double effet du précurseur sur la biosynthèse des alcaloïdes a ainsi été démontré une seconde fois.

Dans les conditions de culture testées, la biosynthèse de la galanthamine est plus importante que celle de la lycorine. Ce phénomène a déjà été observé avec la première série d'expériences. En outre, ces deux voies de biosynthèse sont en compétition ; les bulbilles produisant des quantités importantes de galanthamine produisent en parallèle des quantités faibles de lycorine. Ces résultats sont en accord avec ceux de Ptak et al[89].

4.6 Conclusion partielle

Le double effet du précurseur, stimulation précoce de la biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine par rapport aux témoins et accumulation accrue de ces alcaloïdes, a été montré pour la deuxième fois.

La concentration maximale de galanthamine (0,476 mg/g MS v/s 0,209 mg/g MS avec les témoins) et la concentration maximale de lycorine (0,262 mg/g MS v/s 0,209 mg/g MS dans les témoins) ont été obtenues après 30 et 15 jours de culture respectivement en présence de 0,15 g/L de précurseur dans le milieu de culture. L'accumulation en galanthamine et en lycorine a été multipliée par 2,3 et 1,25 fois respectivement par rapport aux témoins.

La voie de biosynthèse de la galanthamine a été favorisée sous ces conditions de culture par rapport à celle de la lycorine. Notons aussi, que ces deux voies sont en compétition.

La durée de culture prolongée par rapport à la première série d'expériences nous a permis d'évaluer les cinétiques d'accumulation de ces deux alcaloïdes dans les bulbilles au delà de 40 jours de culture. En effet, les concentrations en lycorine chutent entre J40 et J50. C'est le cas aussi de la galanthamine en présence de 0,10 et 0,15 g/L de MN. Cependant avec les deux autres conditions, la concentration continue à augmenter légèrement. Quoi qu'il en soit, la durée de culture ne peut pas être prolongée davantage, en effet, les bulbilles récupérées au bout de J50 montraient des nécroses.

5 Ajout du précurseur MN aux cultures *in vitro* de bulbilles de *L. aestivum* en conditions d'immersion temporaire

Ce travail a été fait en collaboration avec le Dr. Agata Ptak à l'Université d'Agriculture à Cracovie, Pologne.

Les bioréacteurs RITA® ont été rapportés dans la littérature pour la micropropagation de plusieurs familles de plantes dont la famille des Amaryllidaceae et plus particulièrement *L. aestivum*. D'après les travaux de Ptak et al.,[89] les systèmes à immersion temporaire RITA® ont permis l'obtention de bulbilles de *L. aestivum* « de bonne qualité ». C'est-à-dire, les bulbilles obtenues étaient morphologiquement et génétiquement homogènes et capables de produire des quantité importantes de galanthamine (0,5 mg/g MS). D'après les travaux menés par Ivanov et al.,[114] ce mode de culture permettrait une production diversifiée d'alcaloïdes d'Amaryllidaceae. Compte tenu des avantages apportés par l'utilisation des bioréacteurs RITA® (préservation de l'intégralité des tissus, forces de cisaillement minimales, diminution considérable du taux d'hyperhydricité et d'asphyxie des tissus), les cultures en immersion temporaire ont été testées. Deux types de bulbilles de *L. aestivum* ont été étudiés : des bulbilles issues de la culture d'explants provenant de bulbes de *L. aestivum* achetés dans le commerce et des bulbilles issues de la culture d'explants de *L. aestivum* de la variété Gravety Giant.

Première série d'expériences : application sur *L. aestivum*

Afin de tester l'effet combiné de l'ajout du précurseur et de l'utilisation des conditions d'immersion temporaire, les bulbilles de *L. aestivum* ont été mises en culture en présence de la MN dans des bioréacteurs RITA®. Le protocole suivi est décrit dans le paragraphe 5.2.2 du chapitre Matériels et Méthodes. Ainsi, 5 g de bulbilles âgées de 12 mois ont été mis en culture dans 200 mL de milieu MS liquide additionné de 2 concentrations différentes de MN (0,15 et 0,30 g/L). La fréquence d'immersion était de 5 min toutes les deux heures. Les cultures ont duré 50 jours. Des arrêts au bout de 15, 30, 40 et 50 jours de cultures ont été réalisés. Trois répétitions pour chaque condition ainsi que des témoins ont été établis (39 bioréacteurs au total).

5.1 Evaluation des taux de croissance

Après chaque arrêt de culture, les taux de croissance des bulbilles ont été évalués. Les résultats sont présentés dans la Figure 67.

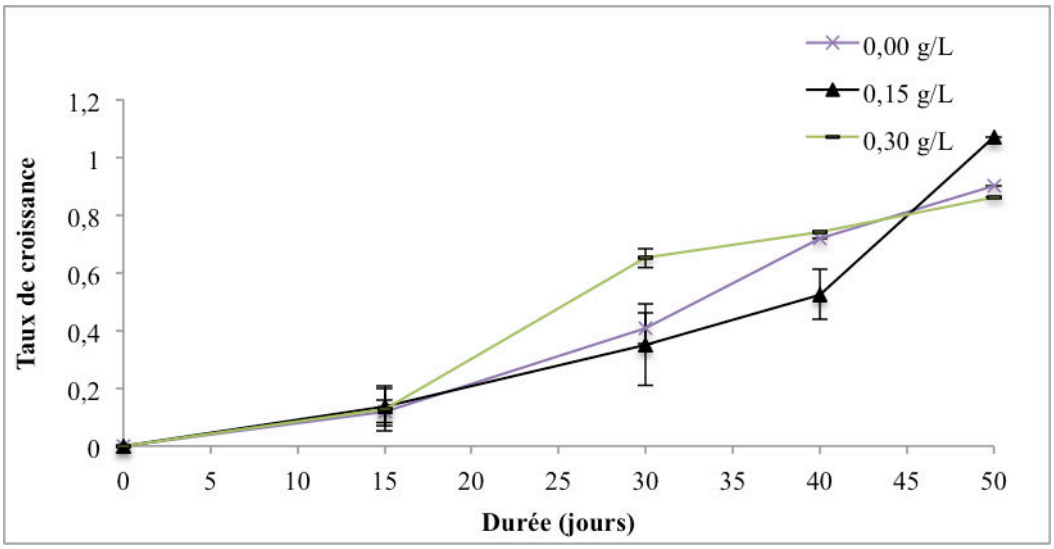


Figure 67: Evaluation du taux de croissance des bulbilles de *L. aestivum* mises en culture dans des bioréacteurs RITA® en présence de 0,15 et 0,30 g/L de MN. Les résultats sont la moyenne de trois répétitions.

En présence et en l'absence du précurseur, les taux de croissance ont augmenté durant toute la durée de culture. Ainsi, les meilleurs taux de croissance ont été obtenus à J50. Contrairement aux cultures traditionnelles, les bulbilles récupérées à la fin de l'expérience avaient un aspect sain et n'étaient pas nécrosées (Figure 68). Les résultats obtenus montrent l'effet positif de l'immersion temporaire sur la croissance des tissus, résultats en

accord avec la littérature[89, 114, 115]. Les bulbilles, n'étant pas en contact continu avec le milieu de culture renfermant le précurseur qui s'est révélé toxique dans les expériences précédentes, ont montré une croissance comparable à celle des bulbilles témoins. A J30 et J50, les taux de croissance les plus importants (0,65 ± 0,032 et 1,06) ont été obtenus respectivement avec 0,30 et 0,15 g/L de MN. Le meilleur taux de croissance obtenu avec les bioréacteurs RITA® était 1,76 fois plus élevé que le meilleur obtenu avec les Erlenmeyers.



Figure 68 : Bulbilles de *L. aestivum* après 50 jours de culture dans les bioréacteurs RITA®.

5.2 Analyse quantitative des alcaloïdes en LCMS

Après chaque arrêt de culture, les alcaloïdes ont été extraits à partir des bulbilles. Les extraits purifiés ont été analysés par LCMS. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 69.

En l'absence du précurseur, l'accumulation de la galanthamine a augmenté tout au long de la culture jusqu'à J50 où elle a atteint 0,465 mg/g MS (Figure 69 A). La biosynthèse de cet alcaloïde a été stimulée par la présence de 0,15 et 0,30 g/L de MN. A J15, la concentration en galanthamine dans les bulbilles était de 0,576 ± 0,003 et de 0,313 ± 0,045 mg/g MS avec 0,15 et 0,30 g/L de MN respectivement. A J30, la concentration la plus élevée de galanthamine (0,781 ± 0,04 mg/g MS) a été obtenue avec 0,30 g/L de MN. Dix jours plus tard, la meilleure concentration (0,814 mg/g MS) a été obtenue en présence de 0,15 g/L de MN. Après de 50 jours de culture, les quantités de galanthamine dosées dans les bulbilles témoins et dans les bulbilles traitées avec 0,15 g/L de MN étaient

comparables. Cependant, l'accumulation de galanthamine dans les bulbilles traitées avec 0,30 g/L de MN était plus faible (0,255 mg/g MS).

Concernant la lycorine (Figure 69 B), la concentration la plus élevée (0,537 mg/g MS) a été obtenue avec 0,30 g/L de MN après de 30 jours de culture, tandis qu'après 40 jours de culture, l'accumulation de la lycorine dans les bulbilles a diminué (0,322 mg/g MS). Entre J40 et J50 la biosynthèse a été restimulée (0,393 mg/g MS). A l'exception du J30, les concentrations en lycorine les plus faibles ont été observées en l'absence du précurseur.

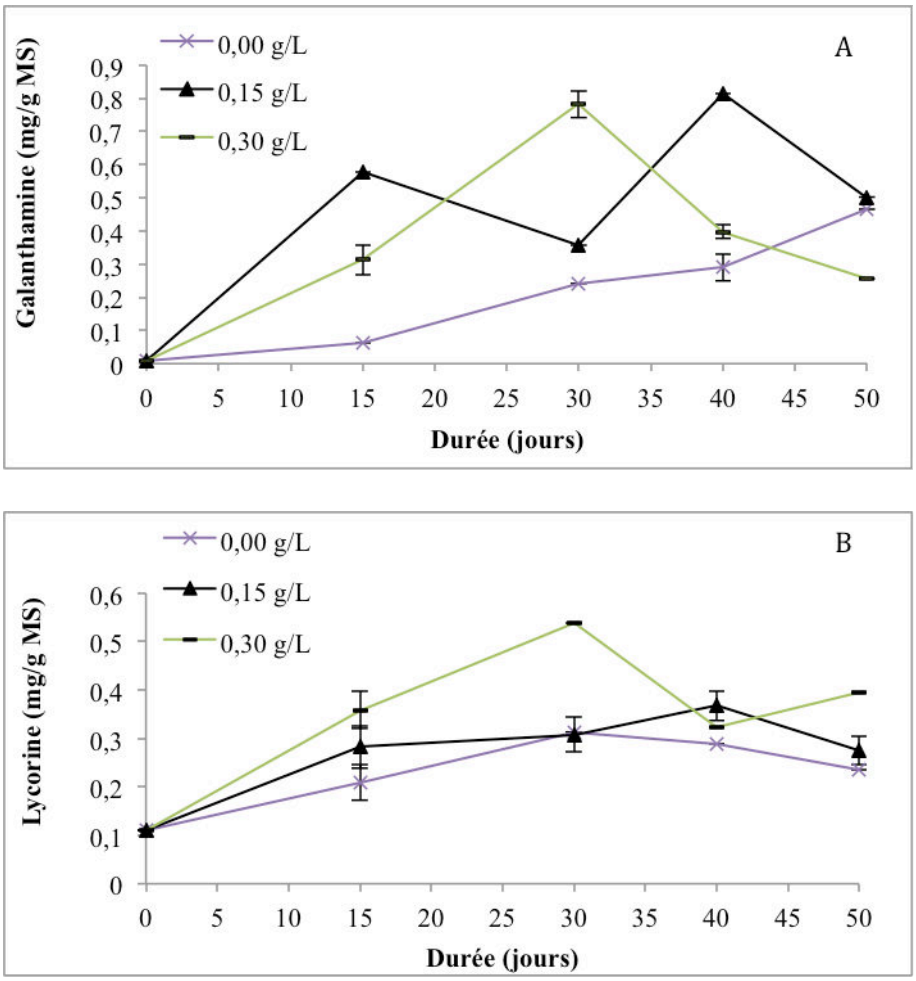


Figure 69: Quantités de galanthamine (A) et de lycorine (B) contenues dans les extraits de bulbilles de *L. aestivum* mises en culture dans des bioréacteurs RITA® en présence de 0,15 et 0,30 g/L de MN.

Dans les conditions d'immersion temporaire, la voie de biosynthèse de la galanthamine a été favorisée par rapport à celle de la lycorine. Contrairement à ce qui a été observé avec les cultures réalisées en Erlenmeyer, les voies de biosynthèse de ces deux alcaloïdes n'étaient pas

en compétition. En comparant les meilleures concentrations obtenues en présence et en l'absence de la MN, la biosynthèse de la galanthamine et celle de la lycorine ont été améliorées de 1,75 fois.

5.3 Conclusion partielle

L'effet combiné des conditions d'immersion temporaire et de l'ajout de la MN aux milieux de culture des bulbilles de *L. aestivum* a été testé pour la première fois. Dans ces conditions de culture, le double effet du précurseur (stimulation précoce de la voie de biosynthèse par rapport aux témoins et accumulation accrue des alcaloïdes) a pu être démontré.

Les meilleures concentrations en galanthamine (0,781 ± 0,04 mg/g MS) et en lycorine (0,537 mg/g MS) ont été obtenues en présence de 0,30 g/L de MN après 30 jours de culture dans les bioréacteurs RITA®. La meilleure accumulation en galanthamine peut également être atteinte en présence de 0,15 g/L de MN après de 40 jours de culture. Ces résultats montrent qu'avec les cultures en immersion temporaire, les voies de biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine ne semblent pas être en compétition.

Dans la littérature, un certain nombre de travaux visant la stimulation de la voie de biosynthèse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae en utilisant les bioréacteurs RITA® ont été rapportés[20, 89, 94, 114]. Ptak et al.[89] ont obtenu une concentration maximale de galanthamine (0,5 mg/g MS) en cultivant des bulbilles de *L. aestivum* dans des bioréacteurs RITA® en présence du thidiazuron. Dans les mêmes conditions, 0,02 mg/g MS de lycorine ont été accumulés par les bulbilles. Toujours avec le même matériel biologique et le même mode de culture, Schumann et al.[20] ont obtenu la meilleure accumulation en galanthamine (0,468 mg/g MS) en présence du méthyljasmonate. Ivanov et al.,[114, 115] ont testé l'effet de la température de culture et celui de la fréquence d'immersion sur le profil alcaloïdique des bulbilles cultivées en bioréacteurs RITA®. Une concentration maximale de galanthamine égale à 0,883 mg/g MS a été montrée. L'accumulation maximale de galanthamine dans nos bulbilles est proche de celle obtenue par l'équipe d'Ivanov.

Deuxième série d'expériences : application sur la variété Gravety Giant de *L. aestivum* :

Toujours dans le but de trouver des individus hautement producteurs en galanthamine et en lycorine, la variété Gravety Giant de *L. aestivum*, jusque-là non étudiée dans la littérature, a été analysée. Pour cela, des cultures de bulbilles en immersion temporaire en présence du précurseur ont été réalisées. Le protocole suivi est décrit dans le paragraphe 5.2.3 du chapitre Matériels et Méthodes. 5 g de bulbilles âgées de 12 mois ont été mis en culture dans 200 mL de milieu MS liquide additionné de MN à deux concentrations différentes (0,15 et 0,30 g/L). Des arrêts au bout de 15, 30, 40 et 50 jours de culture ont été réalisés. Trois répétitions pour chaque condition de culture ainsi que des cultures témoins ont été établies (soit un total de 39 cultures).

5.4 Evaluation des taux de croissance

Jusqu'au 30ème jour de culture (Figure 70), les taux de croissance obtenus dans les différentes conditions testées, étaient comparables. A J50, le meilleur taux de croissance a été obtenu avec les témoins (0,8). Le taux de croissance calculé en présence de 0,30 g/L de MN (0,7) était plus élevé que celui avec 0,15 g/L de MN (0,53).

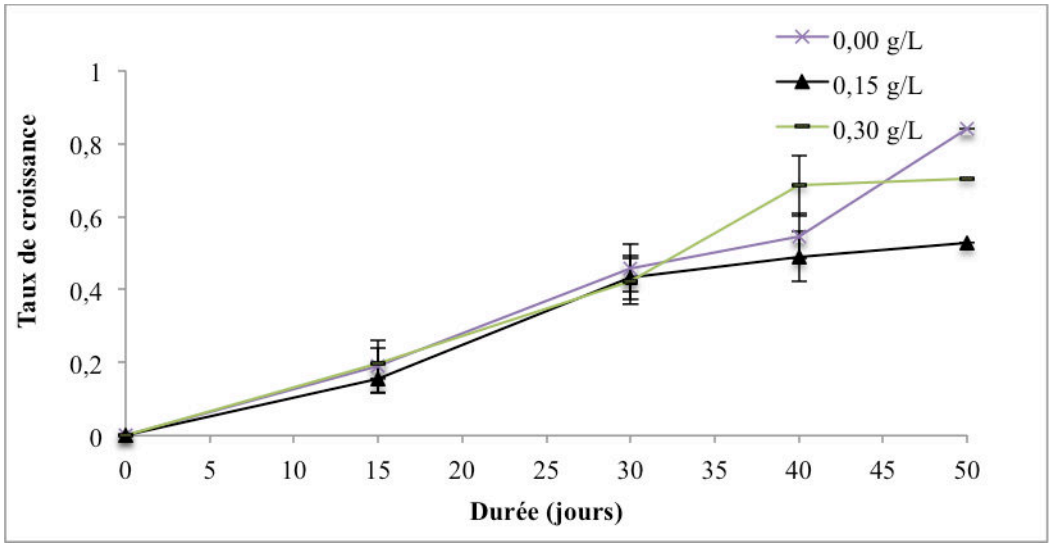


Figure 70: Evaluation du taux de croissance des bulbilles de *L. aestivum* de la variété Gravety Giant, mises en culture dans des bioréacteurs RITA® en présence de 0,15 et 0,30 g/L de MN. Les résultats sont la moyenne de trois répétitions.

5.5 Analyse quantitative des alcaloïdes en LCMS

L'accumulation la plus élevée de galanthamine dans les bulbilles (0,6 mg/g MS) a été atteinte en présence de 0,30 g/L de MN après de 50 jours de culture (Figure 71 A). A J15, la concentration en galanthamine était la plus élevée en l'absence du précurseur. Dans ces conditions, et après 30 jours de culture, l'accumulation était la plus faible. A J30, les concentrations en galanthamine dosées en présence de 0,15 et 0,30 g/L de MN étaient comparables (0,47 ± 0,06 mg/g MS).

La concentration la plus élevée en lycorine dans les bulbilles (1,13 ± 0,1 mg/g MS) a été obtenue avec 0,30 g/L de MN après 30 jours de culture (Figure 71 B). Les concentrations en alcaloïdes les plus faibles ont été obtenues avec les témoins. Cependant, à J50, les quantités dosées étaient proches quelque soient les conditions expérimentales.

Contrairement aux cas précédents, avec la variété Gravety Giant, la voie de biosynthèse de la lycorine a été favorisée par rapport à celle de la galanthamine. Même en l'absence du précurseur, cette variété produit plus de lycorine que *L. aestivum*. En comparant les meilleures valeurs obtenues en présence et en l'absence du précurseur, on constate que l'accumulation de la galanthamine a été stimulée de 1,5 fois et celle de la lycorine de 2,26 fois.

5.6 Conclusion partielle

Dans les mêmes conditions de culture, la quantité de lycorine produite par les bulbilles de la variété Gravety Giant est plus importante que celle produite par les bulbilles de *L.aestivum*. En effet la concentration de lycorine par cette variété a atteint 1,13 ± 0,1 mg/g MS soit 2,1 fois plus qu'avec les bulbilles de *L. aestivum*. D'après les résultats obtenus, les voies de biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine ne sont pas en compétition. C'est à dire, les bulbilles accumulant des quantités maximales de galanthamine, produisaient aussi de la lycorine (contrairement à ce qui a été observé avec les cultures en Erlenmeyers).

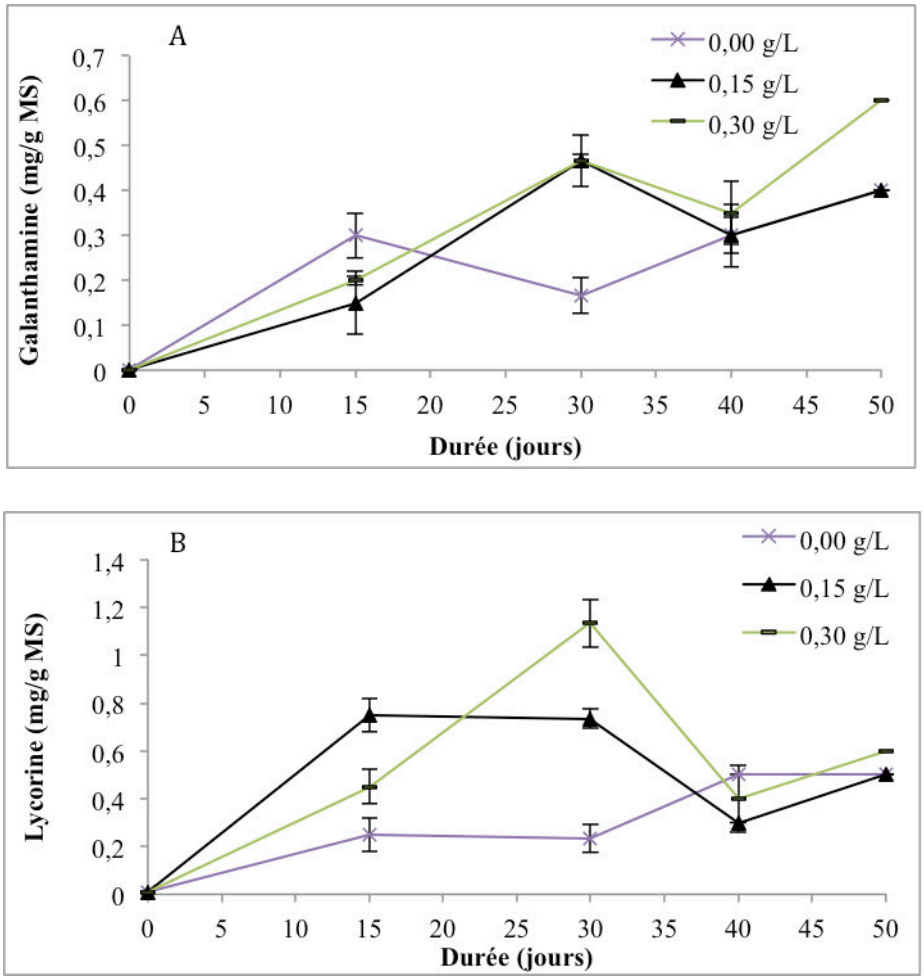


Figure 71: Quantités de galanthamine (A) et de lycorine (B) contenues dans les extraits de bulbilles de *L. aestivum* de la variété Gravety Giant mises en culture dans des bioréacteurs RITA® en présence de 0,15 et 0,30 g/L de MN.

6 Conclusion du chapitre 3

L'extraction de la galanthamine à partir de plantes de la famille des Amaryllidaceae reste la source principale d'obtention de cet alcaloïde. En effet, le respect de la configuration des trois centres d'asymétrie de la forme naturelle active, rend la synthèse chimique fastidieuse et coûteuse. La galanthamine est généralement extraite à partir du genre *Narcissus* en Europe Centrale et en Europe de l'Ouest, à partir de *L. aestivum* en Europe de l'Est, de *Lycoris radiata* en Chine et d'*Ungernia victoria* en Ouzbékistan et Kazakhstan[81]. Le taux de galanthamine dans les plantes utilisées comme matière première pour l'extraction varie à l'état de traces jusqu'à 0,3% MS chez *L. aestivum*[81] (en moyenne entre 0,059 et 0,166% MS[13]). En raison des demandes sans cesse croissantes de l'industrie pharmaceutique et de la disponibilité limitée des sources naturelles, la synthèse de la galanthamine

via les cultures *in vitro* est considérée comme une méthode attractive pour la production durable de cet alcaloïde à haute valeur ajoutée.

Les alcaloïdes d'Amaryllidaceae dérivent tous d'un précurseur commun, la 4'-*O*-méthylnorbelladine (MN). Des études antérieures menées au laboratoire[21, 95] ont montré l'effet positif de l'ajout de la MN deutérée aux milieux de culture liquides de bulbilles de *L. aestivum* sur la voie de biosynthèse des alcaloïdes notamment, la galanthamine et la lycorine. En comparant les taux d'accumulation en galanthamine et lycorine dans les bulbilles cultivées en présence de la MN à ceux obtenus avec les cultures témoins, les auteurs ont constaté de meilleurs taux obtenus en présence du précurseur en une plus courte durée d'incubation. En outre, le précurseur deutéré a d'abord stimulé les bulbilles à métaboliser la MN native puis la MN-d_3.

La métabolisation du précurseur ayant été rapportée par ailleurs, le but de notre travail était de stimuler davantage les voies de biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine en présence du précurseur en s'appuyant sur deux modes de culture différents : la culture traditionnelle en Erlenmeyers et la culture en immersion temporaire avec des bioréacteurs RITA®. Les facteurs clés améliorant la stimulation *in vitro* de la voie de biosynthèse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae ont été respectés : utilisation de tissus différenciés, culture en photopériode et en milieu liquide.

Dans un premier temps, la synthèse chimique de la MN a été améliorée. En effet, en appliquant le protocole décrit par Szewczyk et al.,[150] on obtenait des rendements faibles de 37% par rapport au rendement publié (99%). Pour cette raison, le protocole a été optimisé. En suivant le protocole mis au point par l'équipe de Szewczyk nécessitant plusieurs extractions de la MN dans de l'AcOEt, il a été remarqué que le produit était difficilement soluble dans ce solvant. Pour cela, les étapes de purification par extraction liquide-liquide de la phase aqueuse renfermant le produit par une phase organique d'AcOEt ont été remplacées par une simple filtration de la phase aqueuse suivie d'une recristallisation dans de l'éthanol. Le composé MN pure a été ainsi obtenu avec un rendement de 47%. Par conséquent, d'une part le rendement de la réaction a été amélioré et d'autre part, le temps de la synthèse a été considérablement réduit.

Les cultures *in vitro* de bulbilles de *L. aestivum* et de la variété Gravety Giant en présence du précurseur ont été ensuite établies. Premièrement, le mode de culture traditionnel en Erlenmeyer été utilisé et deuxièmement, les conditions d'immersion temporaire en utilisant les bioréacteurs RITA® ont été testées. De ce fait, deux séries d'expériences ont été réalisées : 2 g et 5 g de bulbilles âgées de 12 mois ont été mises en culture respectivement dans 30 mL (en Erlenmeyer) et 200 mL (en bioréacteur RITA®) de milieu de culture MS liquide. Le milieu a été additionné de 60 g/L de saccharose, de 10 µM de ANA et 5 µM de BAP. Différentes concentrations du précurseur ont été ajoutées au milieu de culture en Erlenmeyer (0,10 ; 0,15 ; 0,20 g/L de MN) et en bioréacteur RITA® (0,15 et 0,30 g/L de MN). Les durées de culture étaient de 50 jours avec des arrêts au bout de 15, 30, 40 et 50 jours de culture. Les extraits ont été purifiés selon le protocole mis au point (Chapitre Résultats et Discussions 2) et injectés en LCMS. L'analyse phytochimique a conduit aux résultats suivants (Tableau 17).

Tableau 17 : Biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine sous toutes les conditions testées.

	Mode de culture	[galanthamine] mg/g MS	[Lycorine] mg/g MS	stimulation par rapport aux témoins
L. aestivum	Erlenmeyers	0,476	0,262	2,3 x pour galanthamine et 1,25 x pour lycorine
	Bioréacteurs RITA®	0,814	0,537	1,75 x pour les deux alcaloïdes
L. aestivum 'Gravety Giant'	Bioréacteurs RITA®	0,600	1,130	1,5 x pour galanthamine et 2,26 x pour lycorine

Les expériences réalisées en Erlenmeyers montrent l'effet du précurseur sur la voie de biosynthèse des alcaloïdes dosés. Celles réalisées en bioréacteurs RITA® montrent l'effet combiné du précurseur et du mode de culture sur la voie de biosynthèse de ces alcaloïdes.

Les taux de croissance des bulbilles étaient meilleurs en conditions d'immersion temporaire qu'en immersion continue. Les bulbilles issues du premier mode de culture, en Erlenmeyer, étaient nécrosées en fin de culture alors que celles issues du deuxième mode de culture, en RITA®, étaient en bon état physiologique.

En Erlenemeyers, la concentration maximale de galanthamine (0,476 mg/g MS v/s 0,209 mg/g MS avec les témoins) et la concentration maximale de lycorine (0,262 mg/g MS v/s 0,209 mg/g MS dans les témoins) ont été obtenues après 30 et 15 jours de culture respectivement en présence de 0,15 g/L de précurseur dans le milieu de culture. Avec les bioréacteurs RITA®, les meilleures concentrations en galanthamine (0,781± 0,04 mg/g MS) et en lycorine (0,537 mg/g MS) ont été obtenues en présence de 0,30 g/L de MN et après 30 jours de culture. Un autre pic d'accumulation en galanthamine (0,814 mg/g MS) a été atteint en présence de 0,15 g/L de MN au bout de 40 jours de culture. Avec la variété Gravety Giant, des concentrations plus importantes en lycorine (1,13 ± 0,1 mg/g MS) ont été atteintes. En présence de 0,30 g/L de MN, les meilleures concentrations en galanthamine et en lycorine ont été obtenues après 50 et 30 jours de culture respectivement.

Comme déjà évoqué, la concentration moyenne en galanthamine dans les plantes utilisées par les laboratoires pharmaceutiques pour l'extraction de l'alcaloïde varie entre 0,59 et 1,66 mg/g MS. Bien que la galanthamine était à l'état de traces dans les bulbes *in vivo* de départ, les meilleures concentrations obtenues avec nos conditions de culture correspondent à celles retrouvées dans les bulbes *in vivo*.

Avec toutes les conditions de culture mises en œuvre un double effet de la MN a été prouvé. Par comparaison aux témoins, le précurseur a stimulé la biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine. De plus, les pics, correspondant aux alcaloïdes en présence du précurseur, sont survenus plus tôt que ceux obtenus avec les témoins.

Contrairement aux cultures traditionnelles, les deux voies de biosynthèse ne semblaient pas en compétition dans les conditions d'immersion temporaire. En effet, les bulbilles cultivées en bioréacteurs RITA® produisaient à la fois des concentrations importantes de galanthamine et de lycorine.

Dans les conditions de culture testées, la voie de biosynthèse de la galanthamine par les bulbilles de *L. aestivum* a été favorisée par rapport à celle de la lycorine. Le cas contraire a été observé avec les bulbilles *L. aestivum* 'Gravety Giant' chez lesquelles des concentrations plus élevées en lycorine qu'en galanthamine ont été produites.

Chapitre 4 : Eliciteurs et production de galanthamine et lycorine par les bulbilles de *L. aestivum*

Ce travail a été fait en collaboration avec le Dr. Agata Ptak à l'Université d'Agriculture à Cracovie, Pologne.

Le rôle des métabolites secondaires dans le métabolisme de la plante reste mal connu. Toutefois, ces composés semblent protéger l'organisme producteur contre l'attaque des pathogènes et augmenter la résistance de celui-ci face à l'action de différents facteurs biotiques ou abiotiques. Leur biosynthèse est induite par divers éliciteurs et molécules de signal[93]. Partant de ce principe, différentes stratégies visant l'augmentation de la production des métabolites secondaires ont été développées en exposant les cellules de la plante à l'action de divers éliciteurs[167]. L'élicitation des cultures *in vitro* est ainsi devenue une stratégie communément utilisée pour la stimulation de la biosynthèse des métabolites secondaires.

Les éliciteurs sont des molécules induisant chez les plantes une réaction physiologique ou morphologique en provoquant la biosynthèse des phytoalexines[93]. Le méthyljasmonate (MeJa) est l'un des éliciteurs les plus utilisés. Il a été montré que cet éliciteur stimule la biosynthèse des alcaloïdes chez différentes plantes, parmi lesquelles *Argemone mexicana*[168], *Catharanthus roseus*[169], *Anisodus acutangulus*[170] et *Echium rauwolfii*[171]. L'élicitation de la biosynthèse de la galanthamine par le MeJa a été aussi montrée chez *N. confusus*[91], *Lycoris chinensis*[92] et *L. aestivum*[20, 94]. Le MeJa est un phytorégulateur de nature gazeuse. Il module la croissance des racines, la germination des racines et du pollen, l'initiation des boutons floraux et la production de l'éthylène.

1 Synthèse des études antérieures réalisées au laboratoire

El Tahchy et al.[12] étaient les premiers à étudier l'effet du MeJa sur l'accumulation de la galanthamine et de la lycorine dans des cals et des bulbilles de *L. aestivum*. Pour cela, 6 g de matière fraîche (cals embryogènes et bulbilles) ont été mis en culture dans 20 mL de milieu MS liquide (additionné de 30 g/L de saccharose, 25 µM de picloram et 0,5 µM de BAP pour les cals et de 60 g/L de saccharose, 10 µM de ANA et 5 µM de BAP pour les bulbilles). Deux séries de concentrations différentes de MeJa ont été testées (0; 50; 100; 150; 200 et 300 µM avec les cals et 0; 50; 100 et 150 µM avec les bulbilles). Les essais ont été réalisés avec 6 durées de métabolisation différentes (0; 2; 5; 10; 24 et 31 heures). Les alcaloïdes ont été extraits à partir des cals, bulbilles et milieux de culture. Les extraits méthanoliques bruts ont été injectés en LCMS pour la quantification des alcaloïdes.

Les auteurs ont constaté que l'effet du MeJa sur la voie de biosynthèse était rapide, quelques heures d'incubation ont suffi pour la stimulation de la voie de biosynthèse[12]. La synthèse (0,016 mg/g MS) et le relargage dans le milieu de culture (0,03 mg/100 mL de milieu de culture) de la galanthamine ont été stimulés après 10 h d'incubation des cals avec 150 µM de MeJa. La synthèse (0,04 mg/g MS) et le relargage dans le milieu de culture (0,011 mg/100 mL de milieu de culture) de la lycorine ont été stimulés après 10 h d'incubation des cals avec 100 µM de MeJa.

Concernant les bulbilles, la concentration maximale de galanthamine (0,017 mg/g MS) a été atteinte après 10 h d'incubation en présence de 150 µM de MeJa. Les mêmes conditions expérimentales ont induit le meilleur relargage de cet alcaloïde dans le milieu de culture (0,0025 mg/100 mL de milieu de culture)[12]. Les concentrations maximales de lycorine dans les bulbilles (0,35 mg/g MS) et dans les milieux de culture (0,018 mg/100 mL) ont été obtenues après 5 h d'incubation en présence de 100 µM de MeJa[12].

Dans la littérature, quelques travaux ont été rapportés concernant les effets de plusieurs éliciteurs sur la voie de biosynthèse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae[91, 92]. Deux seulement concernaient l'élicitation de la voie de biosynthèse de bulbilles de *L. aestivum*[20, 94].

L'équipe de Schumann[20] est arrivée à la même conclusion que El Tahchy et al.,[12] avec une plus grande quantité de galanthamine produite et relarguée dans le milieu de culture (deux semaines de culture en présence de 25 µM de MeJa). En effet, ils ont comparé l'action de 4 éliciteurs dont le MeJa et L'acide salicylique (AS) ajoutés à une concentration de 100 µM dans les milieux de culture liquide des bulbilles de *L. aestivum*. Les cultures ont été réalisées en conditions d'immersion temporaire dans des bioréacteurs de 1 L. Les auteurs, sans doser les quantités de lycorine accumulées dans les tissus, ont conclu que l'AS n'était pas un bon éliciteur des alcaloïdes d'Amaryllidacea[20].

Ivanov et al.[94] ont étudié l'effet du MeJa et celui de l'acide jasmonique sur la voie de biosynthèse des alcaloïdes dans des bulbilles de *L. aestivum*. Les cultures traditionnelles en Erlenmeyers ont été utilisées. Les éliciteurs ont été ajoutés à une concentration de 25 µM au début (J28) et à la fin (J35) de la phase exponentielle de croissance des bulbilles. L'effet d'élicitation le plus significatif a été observé quand les éliciteurs ont été ajouté à J28[94].

2 Objectifs du travail actuel

Dans un premier temps, l'effet éliciteur du MeJa et celui de l'acide salicylique (AS) ont été évalués sur la production de galanthamine et de lycorine dans des bulbilles de *L. aestivum*. Pour cela, les éliciteurs ont été ajoutés à des concentrations différentes durant la phase exponentielle de croissance des bulbilles (après 21 jours de culture). Les bioréacteurs RITA®, offrant de meilleures conditions de culture, ont été utilisés. De plus, au terme du chapitre précédent, on a conclu que la variété Gravety Giant de *L. aestivum* produisait plus de lycorine que *L. aestivum* dans les mêmes conditions de culture. Par conséquent, dans un second temps, les effets des mêmes éliciteurs dans les mêmes conditions de culture ont été évalués sur des bulbilles de la variété Gravety Giant.

3 Ajout d'éliciteurs dans les cultures de bulbilles de *L. aestivum* en bioréacteur RITA®

L'effet du MeJa ainsi que celui de l'AS sur la biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine dans des bulbilles de *L. aestivum* ont été

étudiés. Deux séries d'expériences *a* et *b* ont été réalisées selon le protocole décrit dans le paragraphe 6.1 du chapitre Matériels et Méthodes. Les solutions d'éliciteurs ont été ajoutées séparément aux milieux de culture des bulbilles après 21 jours de culture dans les bioréacteurs RITA®. Les conditions de culture testées sont résumées dans la Figure 72.

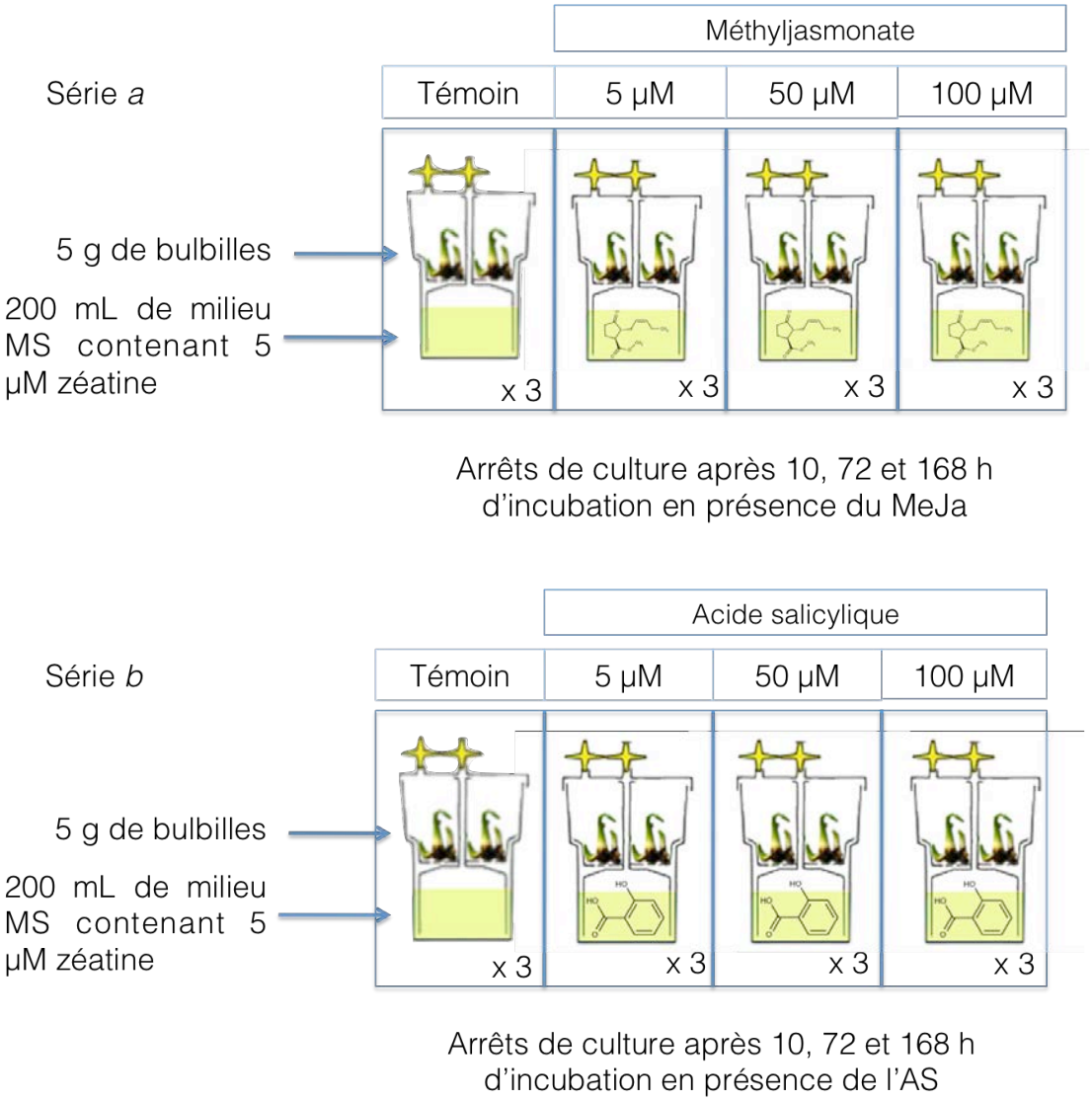


Figure 72 : Protocole d'incubation des bulbilles de *L. aestivum* en présence du MeJa et de l'AS.

3.1 Evaluation des taux de croissance

Après chaque arrêt de culture, les bulbilles ont été récupérées, lavées à l'eau stérile, séchées et pesées. Les taux de croissance ont été calculés comme décrit dans le paragraphe 8 du chapitre Matériels et Méthodes. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 73. Les séries d'expériences

a et *b* correspondent respectivement aux bulbilles incubées en présence du MeJa et de l'AS.

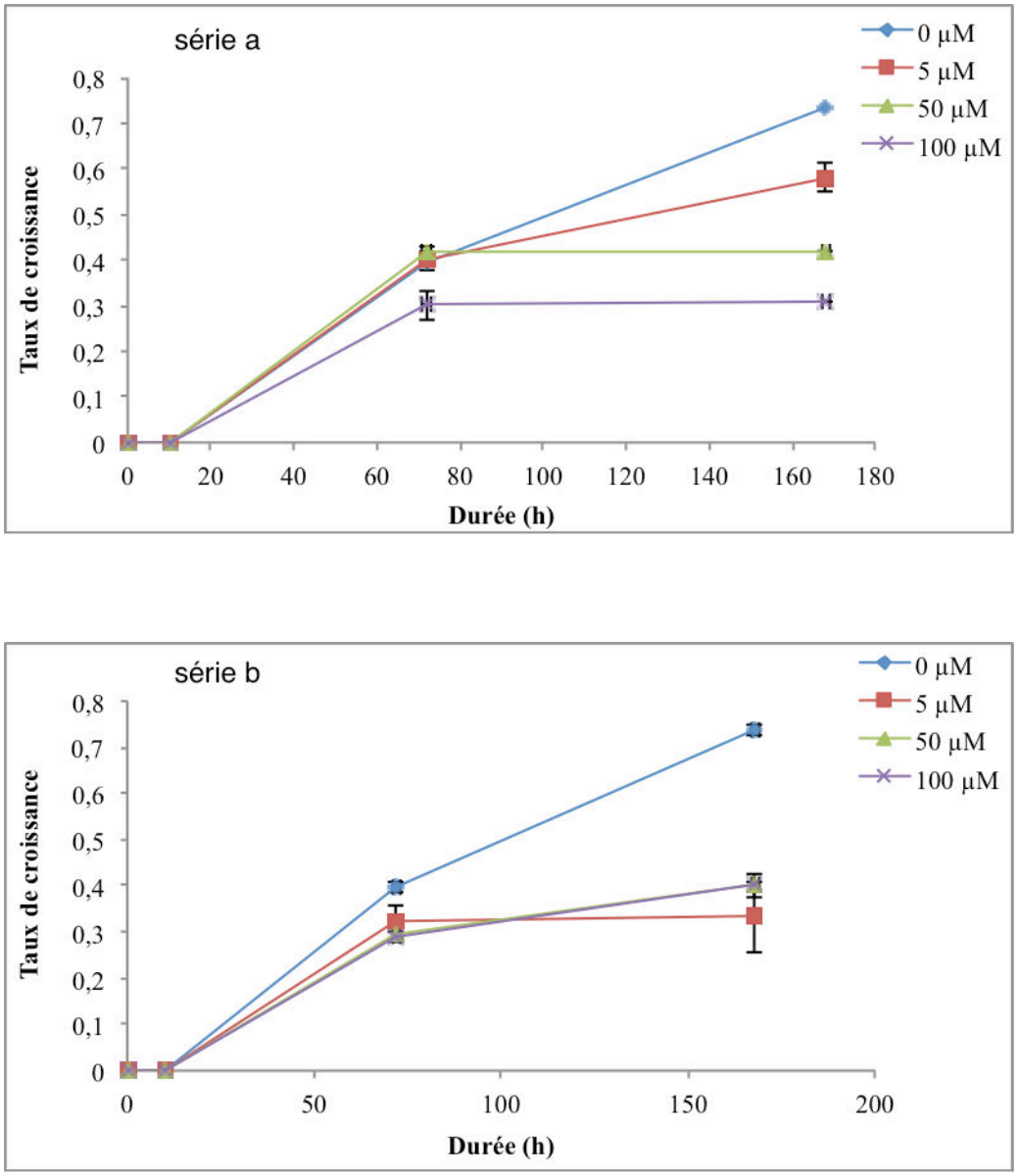


Figure 73: Evaluation des taux de croissance des bulbilles de *L. aestivum*, mises en culture dans des bioréacteur RITA® en présence du Méthyljasmonate (série *a*) et de l'acide salicylique (série *b*). Les résultats sont la moyenne de trois répétitions.

Les taux de croissance des bulbilles ont augmenté entre 10 h et 72 h en présence du MeJa. Les taux calculés en présence de 0, 5 et 50 µM de MeJa étaient proches et compris entre 0,396 ± 0,022 et 0,416 ± 0,012. Ceux calculés en présence de 100 µM de MeJa étaient les plus faibles (0,301 ± 0,034). Entre 72 et 168 h d'incubation, la croissance des bulbilles incubées en présence de 50 et 100 µM de MeJa était stable (0,42 et 0,309 respectivement). Par contre en l'absence et en présence de 5 µM de MeJa,

les bulbilles ont continué à croitre. Le meilleur taux de croissance (0,737 ± 0,024) a été obtenu en l'absence du MeJa au bout de 28 jours de culture.

Les profils obtenus en présence de 50 et 100 µM d'AS étaient identiques. Au bout de 72 h de culture et quelque soit la concentration d'AS employée, les taux de croissance calculés étaient proches (compris entre 0,291 ± 0,012 et 0,321 ± 0,035). Dans les mêmes conditions de culture, la croissance des bulbilles en présence de l'AS était plus faible qu'en présence du MeJa. Entre 72 et 168 h d'incubation, la croissance des bulbilles cultivées en présence de 5 µM d'AS était stable. Le taux de croissance le plus faible (0,333 ± 0,035) a ainsi été obtenu. Les taux de croissance des bulbilles ont augmenté légèrement en présence de 50 et 100 µM d'AS (0,405 ± 0,015 et 0,4 ± 0,025 respectivement).

Après 72 h d'incubation, le MeJa ajouté à des concentrations de 5 et 50 µM dans les milieux de culture, ne présentait pas d'effet toxique pour les bulbilles (taux de croissance comparables à ceux des témoins). Ce n'était pas le cas en présence de 5 et 50 µM d'AS dans les mêmes conditions de culture. Après une semaine d'incubation (168 h), les effets toxiques du MeJa sont apparus. En présence de cet éliciteur, le taux de croissance le plus élevé a été obtenu en présence de la concentration la plus faible. Inversement, l'AS ajouté à des concentrations de 50 et 100 µM était moins toxique que les faibles concentrations pour les bulbilles.

Schumann et al.,[20] ont testé également l'effet d'éliciteurs (100 µM de MeJa, et de 100 µM d'acide salicylique) ajoutés après 6 semaines de culture aux milieux de culture liquides de bulbilles de *L. aestivum*. Les cultures se sont déroulées sous conditions d'immersion temporaire dans des bioréacteurs de 1 L. Les taux de croissance des bulbilles, évalués après deux mois de culture, étaient comparables en présence des éliciteurs et avec les témoins. Contrairement à nos résultats (au bout de 168 h d'incubation), le MeJa et l'AS n'avaient pas un effet négatif sur la croissance des bulbilles. Avec les cultures de *N. confusus*[91] et *L. chinensis*[92], le MeJa n'avait pas d'effet négatif sur la croissance des cultures, par contre l'AS a inhibé leur croissance. Ivanov et al.[94] ont aussi testé l'effet du MeJa ajouté à une concentration de 25 µM aux milieux de culture de bulbilles de *L. aestivum* durant la phase exponentielle de croissance des cultures. La culture traditionnelle en Erlenmeyer a été utilisée. Les taux de croissance ont été évalués après 1, 4, 7 et 14 jours d'incubation. Contrairement à nos

résultats, les auteurs ont conclu que le MeJa, ajouté durant la phase exponentielle de croissance, stimulait la biomasse. Il est à noter que le matériel biologique ainsi que les conditions de culture, les concentrations en MeJa et en AS et les temps de culture diffèrent d'un laboratoire à l'autre.

3.2 Analyse quantitative des alcaloïdes en GCMS

Après chaque arrêt de culture, les alcaloïdes ont été extraits à partir des bulbilles. Les extraits méthanoliques obtenus, additionnés de 500 µL de la solution-mère d'hyoscyamine à 200 µg/mL, ont été purifiés par la méthode SPE. Les extraits purifiés ont été reconcentrés dans un volume final de 5 mL (concentration théorique de l'ei est égale à 20 µg/mL) et injectés en GCMS pour le dosage de la galanthamine et de la lycorine. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 74.

Les quantités de galanthamine dans les bulbilles témoins dosées tout au long de l'expérience étaient inférieures à la limite de détection de l'appareil. En présence de 50 µM de MeJa, la concentration de galanthamine a augmenté entre 10 et 168 h d'incubation où elle a atteint son maximum (0,1 ± 0,01 mg/g MS). Après 10 h d'incubation, la concentration de cet alcaloïde a augmenté en présence de 5 (0,01± 0,01 mg/g MS) et de 50 µM de MeJa (0,01 mg/g MS). Avec 5 µM de MeJa, l'élicitation de la galanthamine n'était pas significative. Cependant, en présence de 100 µM de MeJa, les quantités de galanthamine étaient non détectables. Après 72 h d'incubation, les concentrations de galanthamine ont augmenté en présence de 50 et 100 µM de MeJa et ont atteint respectivement 0,03 ± 0,02 et 0,02 ± 0,01 mg/g MS. Parallèlement, en présence de 5 µM de MeJa, l'accumulation en galanthamine dans les bulbilles était stable. Celle-ci a légèrement augmenté (0,02 ± 0,02 mg/g MS) au bout de 168 h d'incubation en présence de 5 µM de MeJa et est restée stable (0,02 ± 0,01 mg/g MS) en présence de 100 µM de MeJa. En tenant compte des valeurs des écarts type, le MeJa ajouté à une concentration de 50 µM aux milieux de culture des bulbilles de *L. aestivum* a fortement élicité la biosynthèse de la galanthamine au bout de 168 h d'incubation.

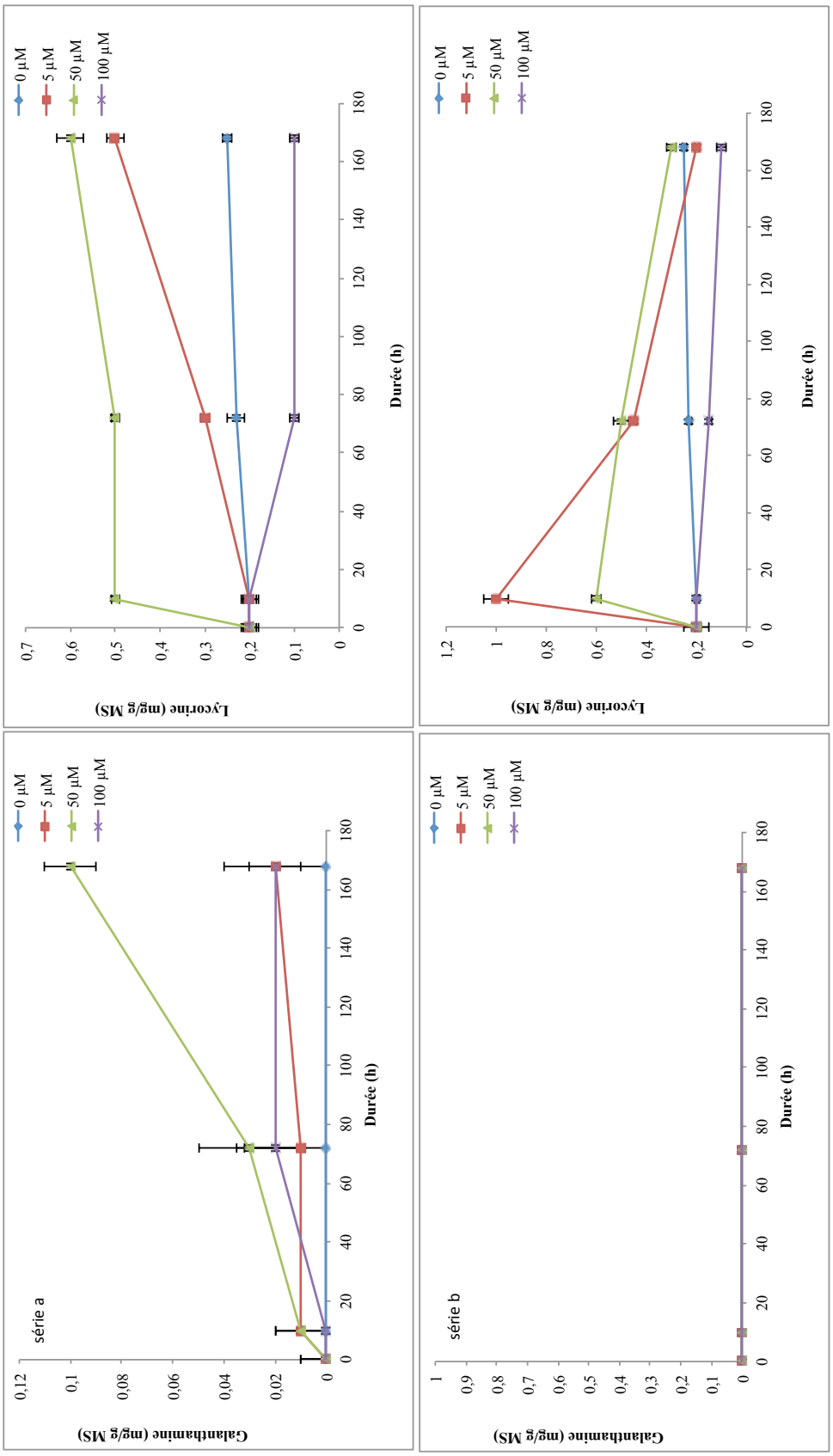


Figure 74: Quantités de galanthamine et de lycorine contenues dans les extraits de bulbilles de *L. aestivum* mises en culture dans des bioréacteurs RITA® en présence du Méthyljasmonate (série *a*) et de l'acide salicylique (série *b*).

Les bulbilles utilisées étaient initialement riches en lycorine (0,2 ± 0,01 mg/g MS). La quantité de lycorine contenue dans les bulbilles témoins était stable tout au long de l'expérience et a atteint son maximum (0,25 ± 0,01 mg/g MS) à la fin de la période de culture. L'ajout de 50 µM de MeJa a eu un effet immédiat sur la voie de biosynthèse de la lycorine. Celle-ci a été fortement élicitée (0,5 ± 0,01 mg/g de MS) au bout de 10 h d'incubation seulement. Dans ces conditions, la concentration est restée stable après 72 h d'incubation et a augmenté au bout de 168 h où elle a atteint un maximum de 0,6 ± 0,03 mg/g MS. L'ajout de 5 µM de MeJa a élicité aussi la voie de biosynthèse de la lycorine au bout de 72 h d'incubation. Celle-ci a atteint un maximum de 0,5 ± 0,02 mg/g MS au bout de 168 h d'incubation. Cependant, l'ajout de 100 µM de MeJa n'a pas conduit à l'élicitation de la voie de biosynthèse de la lycorine. En effet, la quantité de lycorine a même chuté (0,1 ± 0,01 mg/g MS) au bout de 72 h d'incubation.

Les quantités de galanthamine contenues dans les bulbilles mises en culture en présence des différentes concentrations d'AS étaient non détectables tout au long de l'expérience. Cependant, l'AS ajouté dans les milieux de culture à une concentration de 5 µM a fortement élicité la voie de biosynthèse de la lycorine qui a atteint son maximum (1 ± 0,05 mg/g MS) au bout de 10 h d'incubation. Il est à noter que, le pouvoir éliciteur de l'AS est immédiat mais bref. Les quantités de lycorine dosées après 72 et 168 h d'incubation avaient diminué (0,45 ± 0,01 et 0,2 ± 0,01 mg/g MS). Le même profil a été obtenu en présence de 50 µM d'AS. L'accumulation la plus importante en lycorine dans cette condition (0,6 ± 0,02 mg/g MS) a été atteinte au bout de 10 h d'incubation également. Dans les bulbilles témoins, l'accumulation de la lycorine était stable au cours de l'expérience. L'ajout de 100 µM d'AS avait le même effet inhibiteur sur l'accumulation de la lycorine que le MeJa ajouté à la même concentration.

Bien que la voie de biosynthèse de la lycorine ait été favorisée par rapport à celle de la galanthamine, nos travaux ont montré que le MeJa est un éliciteur des deux voies de biosynthèse. 50 µM de MeJa avec 168 h d'incubation était la condition optimale pour l'accumulation maximale de galanthamine (0,1 ± 0,01 mg/g MS) et de lycorine (0,6 ± 0,03 mg/g MS). Quant à l'AS, celui-ci a élicité uniquement la biosynthèse de la lycorine. La concentration maximale (1 ± 0,05 mg/g MS) a été obtenue au bout de 10 h d'incubation. Ces résultats montrent l'effet immédiat mais bref de cet éliciteur. Après 10 h d'incubation, la concentration en lycorine dosée en

présence de 5 µM d'AS était égale au double de celle dosée en présence de 50 µM de MeJa. L'AS est donc un meilleur éliciteur de la lycorine (4x plus que la concentration maximale obtenue avec les témoins) que le MeJa (2,4x plus que la concentration maximale obtenue avec les témoins).

Conformément aux résultats obtenus par El Tahchy et al.,[12] l'ajout du MeJa a stimulé la voie de biosynthèse des alcaloïdes en favorisant surtout la biosynthèse de la lycorine. D'après les résultats obtenus par Schumann et al.,[20] la concentration maximale en galanthamine (0,47 mg/g MS) a été obtenue en présence du MeJa tandis que la plus faible concentration de galanthamine (0,29 mg/g MS) a été obtenue en présence du sulfate de cuivre. Conformément à ce qui a été observé avec les cultures de *N. confusus*[91] et à nos résultats, l'acide salicylique (AS) n'a pas stimulé la biosynthèse de la galanthamine. De plus, dans ces conditions, le plus faible relargage de galanthamine a été observé par les auteurs. Les effets des éliciteurs sur la biosynthèse de la lycorine n'ont pas été évalués dans les travaux de Schumann et al.[20] pourtant, les auteurs ont conclu que l'AS n'était pas un bon éliciteur de la voie de biosynthèse chez *L. aestivum*.

Ivanov et al.[94] ont obtenu, en présence de 25 µM de MeJa, une concentration maximale de galanthamine (0,180 mg/Erlenmeyer) et de lycorine (0,450 mg/Erlenemeyer) après 7 jours d'incubation. Ils sont parvenus à éliciter les deux voies de biosynthèse et conformément à nos résultats, la biosynthèse de la lycorine a été favorisée par rapport à celle de la galanthamine. Par contre, nos conditions de culture étaient plus favorables pour la biosynthèse de la lycorine.

3.3 Conclusion partielle

Dans le but d'évaluer l'effet éliciteur du MeJa et de l'AS sur les voies de biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine, deux séries d'expériences *a* et *b* ont été réalisées. Après 21 jours de culture des bulbilles de *L. aestivum* dans des bioréacteurs RITA®, trois concentrations différentes de MeJa et d'AS (5, 50 et 100 µM) ont été ajoutées séparément au milieu de culture. Des arrêts au bout de 10, 72 et 168 h d'incubation ont été réalisés.

Dans un premier temps, les taux de croissance des bulbilles ont été calculés. D'après les résultats obtenus, le MeJa serait toxique pour les bulbilles à partir de 10 h d'incubation. L'AS serait encore plus toxique que le

MeJa. Paradoxalement, les taux de croissance les plus faibles ont été obtenus avec la plus faible concentration d'AS.

Dans un second temps, les alcaloïdes ont été extraits à partir des bulbilles. Les extraits ont été purifiés par SPE et injectés en GCMS La méthode utilisée est celle validée au premier chapitre Résultats et Discussions. D'après l'analyse quantitative, le MeJa a élicité les deux voies de biosynthèse se traduisant par une accumulation accrue de galanthamine et de lycorine. Cependant et conformément aux résultats obtenus par Ivanov et al.,[94] la biosynthèse de la lycorine a été favorisée par rapport à celle de la galanthamine. L'AS n'a pas élicité la biosynthèse de la galanthamine. Par contre, c'est un meilleur éliciteur de la lycorine que le MeJa. Son action est immédiate mais brève.

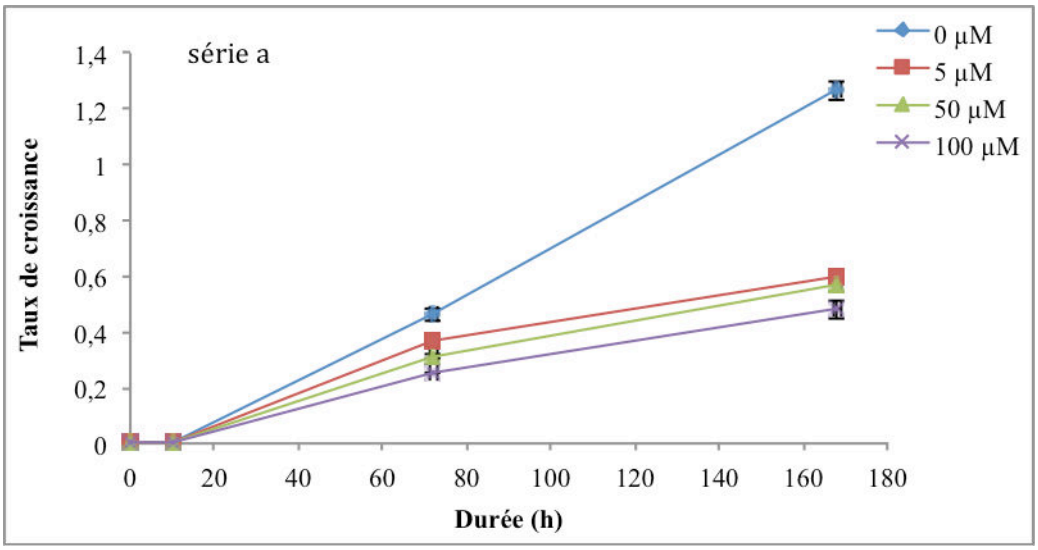
4 Ajout d'éliciteurs dans les cultures de bulbilles de la variété Gravety Giant en bioréacteur RITA®

Les mêmes séries d'expériences *a* et *b* décrites précédemment (Figure 72) ont été réalisées avec des bulbilles de la variété Gravety Giant de *L. aestivum* en présence du MeJa et de l'AS.

Dans un premier temps, les taux de croissance des bulbilles ont été calculés selon les différentes conditions de culture. Dans un second temps, les extraits alcaloïdiques purifiés ont été injectés en GCMS pour le dosage de la galanthamine et de la lycorine accumulées dans les tissus.

4.1 Evaluation des taux de croissance

Les taux de croissance ont été calculés comme décrit précédemment (paragraphe 7 du chapitre Matériels et Méthodes). Les résultats sont présentés dans la Figure 75.



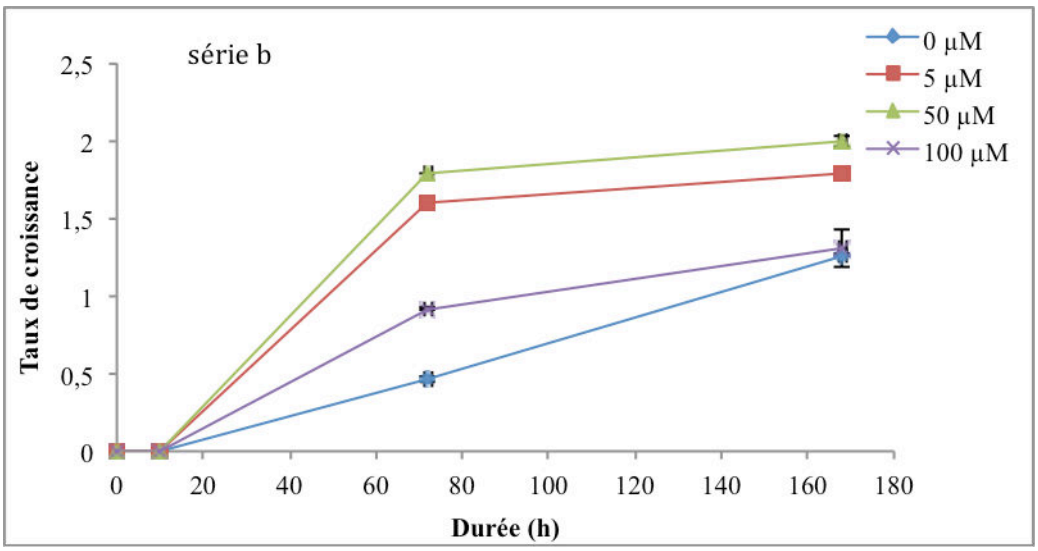


Figure 75: Evaluation des taux de croissance des bulbilles de *L. aestivum* 'Gravety Giant', mises en culture dans des bioréacteur RITA® en présence du MeJa (série *a*) et de l'AS (série *b*). Les résultats sont la moyenne de trois répétitions.

En l'absence d'éliciteurs, les taux de croissance ont augmenté jusqu'au 28ème jour de culture où un maximum de 1,265 a été atteint. Ce taux est 1,72 fois plus important que le taux observé avec les bulbilles de *L. aestivum* dans les mêmes conditions de culture. En présence du MeJa, les taux de croissance calculés présentent les mêmes tendances que ceux obtenus avec les bulbilles de *L. aestivum*. Le MeJa serait toxique aussi pour cette variété. La plus faible toxicité a été obtenue avec la plus faible concentration. Au bout de 168 h d'incubation, les taux de croissance obtenus en présence de 5 et 50 µM de MeJa étaient très proches (respectivement 0,603 et 0,568).

Contrairement à ce qui a été observé avec les bulbilles de *L. aestivum*, l'AS ne montre pas d'effet toxique sur les bulbilles de la variété Gravety Giant. Au contraire, il a stimulé la production de biomasse. Au bout de 72 h d'incubation, le taux le plus faible (0,462) a été obtenu avec les bulbilles témoins. Parallèlement, le taux le plus élevé (1,792) a été obtenu en présence de 50 µM d'AS. Cette valeur est proche de celle obtenue en présence de 5 µM d'AS (1,604). Cependant, en présence de la concentration la plus importante d'éliciteur (100 µM), le taux de croissance était de 0,92. Au bout de 168 h d'incubation, les taux de croissance calculés pour les bulbilles témoins et pour les bulbilles cultivées en présence de 100 µM d'AS étaient identiques (1,265 et 1,303 respectivement). Le taux le plus élevé (1,998) a été obtenu en présence de 50 µM d'AS.

Ces résultats montrent que la réaction des bulbilles vis-à-vis de l'éliciteur dépend de leur génotype. L'AS était toxique pour les bulbilles de *L. aestivum* alors qu'il a stimulé la croissance des bulbilles de *L. aestivum* 'Gravety Giant'.

4.2 Analyse quantitative des alcaloïdes en GCMS

Les extraits de bulbilles ont été purifiés par SPE et injectés en GCMS pour le dosage de la galanthamine et de la lycorine. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 76.

Les bulbilles utilisées étaient initialement riches en galanthamine (0,1 ± 0,01 mg/g MS). Les quantités de galanthamine contenues dans les bulbilles témoins étaient restées stable jusqu'au 24ème jour de culture où elles ont légèrement diminué (0,08 ± 0,01 mg/g MS). Au bout de 10 h d'incubation, le MeJa, ajouté à une concentration de 50 et de 100 µM, a élicité la voie de biosynthèse de la galanthamine (0,15 ± 0,01 et 0,18 ± 0,02 mg/g MS respectivement). Cependant, à cette période, le MeJa ajouté à une concentration de 5 µM aux milieux de culture, n'avait aucun effet d'élicitation. Entre 10 et 72 h d'incubation, la biosynthèse de la galanthamine a été fortement élicitée en présence de 5 et 50 µM de MeJA (0,25 ± 0,02 et 0,25 ± 0,01 mg/g MS respectivement). L'accumulation de la galanthamine en présence de 100 µM de MeJa était stable entre 10 et 72 h d'incubation. Au bout de 168 h, la biosynthèse de la galanthamine a été fortement élicitée en présence de 5 et de 50 µM de MeJa. Les concentrations en galanthamine

les plus élevées ont été ainsi obtenues (0,4 ± 0,03 et 0,4 ± 0,01 mg/g MS respectivement).

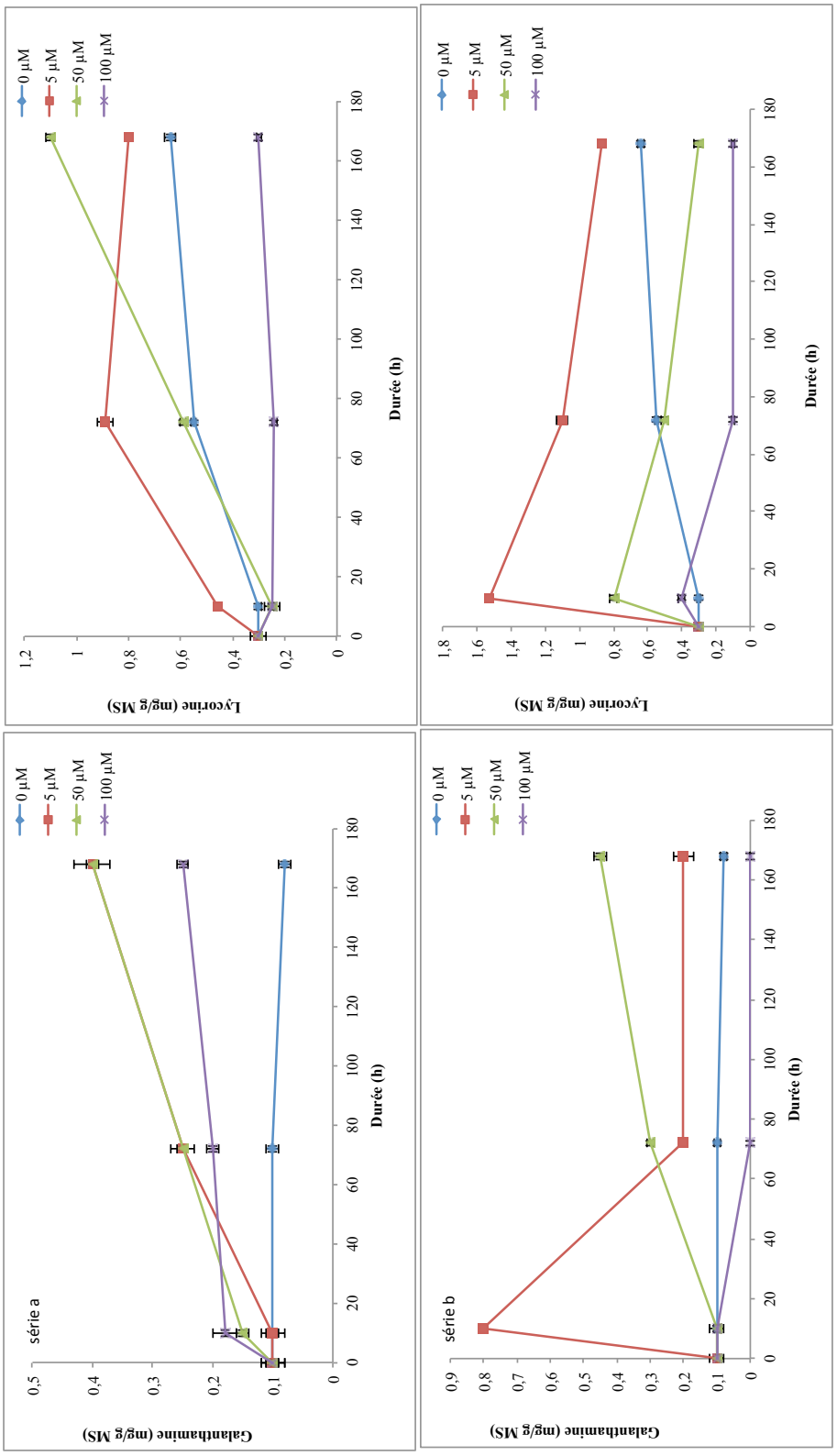


Figure 76: Quantités de galanthamine et de lycorine contenues dans les extraits de bulbilles de *L. aestivum* de la variété Gravety Giant mises en culture dans des bioréacteurs RITA® en présence du MeJa (série *a*) et de l'AS (série *b*).

Les bulbilles utilisées étaient initialement riches en lycorine (0,3 ± 0,01 mg/g MS). L'accumulation en lycorine dans les bulbilles témoins a augmenté jusqu'à la fin de l'expérience où elle a attient 0,64 ± 0,02 mg/g MS. Au bout de 10 h d'incubation et seulement en présence de 5 µM de MeJa, la voie de biosynthèse de la lycorine a été élicitée (0,46 ± 0,01 mg/g MS). Entre 10 et 72 h d'incubation, l'accumulation en lycorine a fortement augmenté en présence de 5 et de 50 µM de MeJa (respectivement 0,89 ± 0,03 et 0,59 ± 0,01 mg/g MS). En présence de 100 µM de MeJa, la biosynthèse de la lycorine était stable tout au long de la période d'incubation (0,25 ± 0,001 et 0,3 ± 0,001 mg/g MS après 10 h et 168 h d'incubation respectivement). Au bout de 168 h d'incubation, la concentration de lycorine dans les bulbilles cultivées en présence de 5 µM de MeJa a chuté (0,8 ± 0,01 mg/g MS). La concentration la plus élevée en cet alcaloïde (1,1 ± 0,017 mg/g MS) a été obtenue après 168 h d'incubation en présence de 50 µM de MeJa.

La condition optimale pour l'accumulation maximale en galanthamine (4x plus que la concentration maximale obtenue avec les témoins) et en lycorine (1,72x plus que la concentration maximale obtenue avec les témoins) a été observée après 168 h d'incubation en présence de 50 µM de MeJa dans les bulbilles.

L'ajout de 5 µM d'AS aux milieux de culture des bulbilles de *L. aestivum* 'Gravety Giant' a élicité fortement la voie de biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine au bout de 10 h d'incubation. Ainsi, les concentrations les plus élevées en galanthamine (0,8 ± 0,01 mg/g MS) et en lycorine (1,53 ± 0,01 mg/g MS) ont été atteintes. Au delà de cette période, l'AS, ajouté à la concentration de 5 µM, n'avait plus d'effet éliciteur pour les deux voies de biosynthèse. Ainsi, l'accumulation en galanthamine a chuté fortement au bout de 72 h d'incubation (0,2 ± 0,011 mg/g MS) et s'est stabilisée entre 72 et 168 h d'incubation. Celle de la lycorine a diminué jusqu'à 168 h d'incubation où elle a atteint un minimum de 0,87 ± 0,01 mg/g MS. Dans ces conditions de culture, l'AS a stimulé les deux voies de biosynthèse dans les bulbilles de la variété Gravety Giant. Rappelons qu'avec les bulbilles de *L. aestivum* et dans les mêmes conditions de culture, l'AS n'avait aucun effet sur la voie de biosynthèse de la galanthamine. L'ajout de 100 µM d'AS a inhibé la voie de biosynthèse de la galanthamine (des traces ont été détectées au bout de 72h d'incubation) et celle de la lycorine (0,1 ± 0,01 mg/g MS). La biosynthèse de la lycorine en présence de 50 µM d'AS avait un profil identique à celui obtenu en présence de 5 µM. Néanmoins, les

concentrations obtenues étaient plus faibles (0,8 ± 0,02 et 0,3 ± 0,03 mg/g MS au bout de 10 et 168 h d'incubation respectivement).

D'après les résultats obtenus, l'AS ajouté à une concentration de 5 µM aux milieux de culture des bulbilles de la variété Gravety Giant après 10 h d'incubation est un meilleur éliciteur de la biosynthèse de la galanthamine (8x plus que la concentration maximale obtenue avec les témoins) et de la lycorine (5,1x plus que la concentration maximale obtenue avec les témoins) que le MeJa.

4.3 Conclusion partielle

La même expérience réalisée avec les bulbilles de *L. aestivum* a été reprise avec les bulbilles de *L. aestivum* 'Gravety Giant' afin d'étudier l'effet du MeJa et de l'AS sur la biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine. Cette variété n'a jamais été étudiée dans la littérature. Au terme de ce chapitre on a observé qu'elle était capable de synthétiser plus de lycorine que *L. aestivum* dans les mêmes conditions de culture.

Le MeJa a montré un effet toxique vis-à-vis des bulbilles se traduisant par la diminution de la biomasse. La toxicité la plus faible a été observée avec la concentration la plus faible de MeJa. Cependant, l'AS avait un effet stimulateur de la croissance contrairement à ce qui a été observé avec les bulbilles de *L. aestivum*.

D'après l'analyse des alcaloïdes, le MeJa et l'AS ont élicité les deux voies de biosynthèse. Les concentrations les plus élevées en galanthamine (0,8 ± 0,01 mg/g MS) et en lycorine (1,53 ± 0,01 mg/g MS) ont été obtenus après 10 h d'incubation en présence de 5 µM d'AS. Soit, respectivement 2x et 1,4x plus que les concentrations maximales de galanthamine et de lycorine obtenus avec 50 µM de MeJa. L'AS est alors un meilleur éliciteur de la biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine dans les bulbilles de *L. aestivum* 'Gravety Giant' que le MeJa.

5 Conclusion du chapitre 4

Dans le but d'évaluer l'effet éliciteur du MeJa et de l'AS sur les voies de biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine, deux séries d'expériences

ont été réalisées. 5 g de bulbilles de *L. aestivum* et de *L. aestivum* 'Gravety Giant' ont été mis en culture séparément dans des bioréacteurs RITA®. Après 21 jours de culture, trois concentrations différentes de MeJa et d'AS (5, 50 et 100 µM) ont été ajoutées séparément aux milieux de culture des bulbilles. Des arrêts au bout de 10, 72 et 168 h d'incubation ont été réalisés.

Dans un premier temps, les taux de croissance ont été calculés. L'accumulation en biomasse était plus importante avec les bulbilles de la variété Gravety Giant qu'avec les bulbilles de *L. aestivum*. En effet, le taux de croissance maximal obtenu au 28ème jour de culture avec les bulbilles témoins de la variété Gravety Giant était de 1,265 (v/s 0,737 avec les bulbilles de *L. aestivum*). Le MeJa a montré un effet toxique pour les bulbilles de cette variété. Conformément à ce qui a été observé avec les bulbilles de *L. aestivum*, la toxicité est dépendante de la dose (plus la concentration de MeJa employée est faible, plus la toxicité est faible). Cependant, et contrairement à ce qui a été observé durant l'expérience précédente, l'AS avait un effet positif sur l'accumulation de la biomasse. Ces résultats montrent l'effet significatif du génotype sur la réaction des plantes en présence d'un éliciteur.

Dans un second temps, les extraits de bulbilles purifiés par la méthode SPE (sur une première phase de silice et une deuxième phase de SCX) et injectés en GCMS (avec une concentration théorique d'ei égale à 20 µg/mL) ont été analysés pour leur contenu en galanthamine et en lycorine.

Avec les bulbilles de *L. aestivum* témoins, les concentrations en galanthamine dosées tout au long de l'expérience étaient inférieures à la limite de détection de l'appareil. Par contre, la concentration en lycorine a augmenté de 1,25 fois entre t0 (ajout des éliciteurs) et t168 h (arrêts des cultures). Les bulbilles de la variété Gravety Giant étaient initialement riches en galanthamine. La quantité de cet alcaloïde contenu dans les tissus est restée stable durant la période de culture étudiée. Cependant, la quantité de lycorine a augmenté de 2,13x par rapport à la quantité initiale contenue dans les bulbilles. Ces résultats montrent que dans les mêmes conditions de culture, les bulbilles de la variété Gravety Giant ont produit plus de lycorine que celles de *L. aestivum*.

Avec les bulbilles de *L. aestivum*, 50 µM de MeJa et 168 h d'incubation était la condition optimale pour l'accumulation maximale en galanthamine

(0,1 ± 0,01 mg/g MS) et en lycorine (0,6 ± 0,03 mg/g MS). Conformément aux résultats obtenus par Schumann et al.[20] et par Colque et al.,[91] l'AS n'avait pas stimulé la voie de biosynthèse de la galanthamine. En présence de 5 µM de cet éliciteur, la concentration maximale de lycorine (1 ± 0,05 mg/g MS) a été obtenue au bout de 10 h d'incubation. Après 10 h d'incubation, la concentration en lycorine dosée en présence de 5 µM d'AS était égale au double de celle dosée en présence de 50 µM de MeJa après 168 h d'incubation. L'AS est donc un meilleur éliciteur de la lycorine (4x plus que la concentration maximale obtenue avec les témoins) que le MeJa (2,4x plus que la concentration maximale obtenue avec les témoins).

Avec les bulbilles de *L. aestivum* 'Gravety Giant', les concentration les plus élevées de galanthamine (0,4 ± 0,01 mg/g MS) et de lycorine (1,1 ± 0,017 mg/g MS) ont été obtenues après 168 h d'incubation en présence de 50 µM de MeJa. L'ajout de 5 µM d'AS suivi de 10 h d'incubation était optimal pour l'accumulation de la galanthamine (0,8 ± 0,01 mg/g MS) et de la lycorine (1,53 ± 0,01 mg/g MS). Ces valeurs sont respectivement 2x et 1,4x plus élevées que les concentrations maximales de galanthamine et de lycorine obtenues avec 50 µM de MeJa. L'AS est alors un meilleur éliciteur de la biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine par les bulbilles de *L. aestivum* 'Gravety Giant' que le MeJa.

Les conditions optimales pour l'accumulation maximale d'alcaloïdes en présence du MeJa (50 µM et 168 h d'incubation) ainsi qu'en présence de L'AS (5 µM et 10 h d'incubation) étaient les mêmes chez les deux espèces étudiées.

Chapitre 5: Précurseurs d'éthylène et production de galanthamine et de lycorine par les bulbilles de *L. aestivum*

Ce travail a été fait en collaboration avec le Dr. Agata Ptak à l'Université d'Agriculture à Cracovie, Pologne.

Les phytorégulateurs (ou régulateurs de croissance) sont des messagers chimiques que les cellules utilisent pour moduler leur développement et s'adapter à un environnement auquel les plantes, immobiles, ne peuvent échapper. Il existe 5 familles de phytorégulateurs : les auxines, les cytokinines, les gibbérellines, l'acide abscissique et l'éthylène. Ce dernier est un phytorégulateur de nature gazeuse.

Il a été montré que l'éthylène influence l'embryogenèse somatique[172, 173]. L'effet de ce phytorégulateur sur la morphogenèse *in vitro*, et plus particulièrement sur l'embryogenèse somatique, a été étudié chez plusieurs plantes, dont : *Brassica oleracea gemnifera*[174], le maïs[175] et l'orchidée du genre *Oncidium*[176].

Outre ses effets sur la morphogenèse, l'éthylène peut aussi stimuler ou inhiber la production de métabolites secondaires. Par exemple, l'éthylène a stimulé la production d'alcaloïdes indoliques par des suspensions cellulaires de *Catharantus roseus*[177], l'accumulation de ginsenosides dans des cultures cellulaires de *Panax ginseng*[178] et la production d'isoflavonoides par des suspensions cellulaires de *Pueraria tuberosa*[179]. Les inhibiteurs de la biosynthèse de l'éthylène ont induit l'augmentation de la production de paclitaxel par des cultures cellulaires de *Taxus*[180].

Dans les cultures *in vitro*, l'accumulation de l'éthylène peut être contrôlée par l'ajout, dans les milieux de culture, de précurseurs (acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC)), d'inhibiteurs ($AgNO_3$, thiosulfate d'argent (STS), $CoCl_2$) ou encore de relargueurs (étéphon) d'éthylène. Elle peut aussi être contrôlée par l'emploi d'adsorbant d'éthylène ($KMnO_4$) dans les chambres de cultures[83].

1 Synthèse des études antérieures réalisées au laboratoire

Ptak et al.,[82, 87] ont étudié l'effet d'un précurseur (ACC), de deux inhibiteurs (STS, $AgNO_3$) et d'un adsorbant ($KMnO_4$) de l'éthylène sur la callogenèse, l'embryogenèse somatique et la production de galanthamine et de lycorine par des cals de *L. aestivum* d'une part et par des embryons somatiques de *L. aestivum* d'autre part.

Dans une première expérience, la callogenèse et l'embryogenèse somatique indirecte ont été induites sur des explants primaires de *L. aestivum*[87]. Ces derniers ont été mis en culture sur un milieu solide MS additionné de 25 µM de picloram et de 0,5 µM de BA (benzyladénine). L'ACC, l'$AgNO_3$ ou le STS ont été ajoutés séparément aux différents milieux de culture à une concentration de 1 ou de 10 µM. Le $KMnO_4$ (4,5 g) a été placé dans des tubes ouverts à l'intérieur des bocaux de culture. Les cultures ont duré quatre semaines. Le meilleur taux de callogenèse a été obtenu en présence de 4,5 g de $KMnO_4$. La présence de 10 µM d'$AgNO_3$ ou de 10 µM de STS étaient aussi favorables[87]. Par contre, l'ajout de 10 µM d'ACC a diminué la croissance des cals d'un facteur de 1,2 par rapport au témoin et a stimulé l'embryogenèse somatique[87]. L'accumulation de la galanthamine et de la lycorine ainsi que la diversité des alcaloïdes observées dans les cals étaient maximales en présence du $KMnO_4$ et du STS (10 µM). En présence du $KMnO_4$, les concentrations maximales en galanthamine (0,02 mg/g MS) et en lycorine (0,03 mg/g MS) ont été atteintes[87]. Des quantités moins importantes de galanthamine (0,01 mg/g MS) et de lycorine (0,02 mg/g MS) ont été obtenues en présence de 10 µM de STS. En présence d'ACC ou de faibles concentrations d'inhibiteurs d'éthylène, aucun alcaloïde n'a été détecté[87].

Dans une seconde expérience, la maturation des embryons somatiques de *L. aestivum*, a eu lieu en utilisant un milieu MS solide additionné de 0,5 µM d'ANA et de 5 µM de zéatine[82]. Les effets de l'$AgNO_3$ (10 µM), de l'ACC (10 µM) et du $KMnO_4$ (4,5 g) ajoutés séparément aux différents milieux de culture ont été étudiés. Au bout de 4 semaines de culture, les embryons somatiques, au stade torpédo, ont été transférés sur un milieu MS additionné de 0,5 µM de ANA et de 5 µM de zéatine (et dépourvus de précurseurs, d'inhibiteurs et d'adsorbants d'éthylène). Les cultures ont duré 4 semaines.

Au bout de cette période, les bulbilles ont été récupérées pour l'analyse phytochimique. La formation des embryons somatiques a été maximale en présence de 10 µM d'ACC[82]. Sous cette condition, l'accumulation de la galanthamine était aussi maximale, elle était 6x plus importante que celle obtenue avec les témoins[82].

2 Objectifs du travail

Dans le travail actuel, l'effet de l'ACC, sur le taux de croissance et sur la production de galanthamine et de lycorine, a été comparé à celui de l'éthéphon (relargueur d'éthylène) chez des bulbilles de *L. aestivum* mises en culture dans des bioréacteurs RITA®. L'expérience a été réalisée ensuite avec des bulbilles de *L. aestivum* 'Gravety Giant' dans les mêmes conditions expérimentales.

3 Ajout de précurseurs d'éthylène dans les cultures de bulbilles de *L. aestivum* et *L. aestivum* 'Gravety Giant' en bioréacteurs RITA®

L'effet de l'ACC et celui de l'éthéphon ont été étudiés sur le taux de croissance et sur la voie de biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine dans des bulbilles de *L. aestivum* et de *L. aestivum* 'Gravety Giant' cultivées en bioréacteurs RITA®. Pour chaque variété de bulbilles, 2 séries d'expériences *a* et *b* ont été définies (Figure 77). Pour les deux séries, 5 g de bulbilles ont été mises en culture dans 200 mL de milieu liquide MS (contenant 30 g/L de saccharose et 5 µM de zéatine). L'effet de deux concentrations d'ACC (10 et 100 µM) a été testé avec la série *a* et l'effet de deux concentrations d'éthéphon (10 et 100 µM) avec la série *b*. Les solutions d'ACC et d'éthéphon ont été stérilisées par filtration avant leur ajout aux différents milieux de culture à J0. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque condition en prenant soin de maintenir des cultures témoins. Les bulbilles ont été récupérées après 4 semaines de culture.

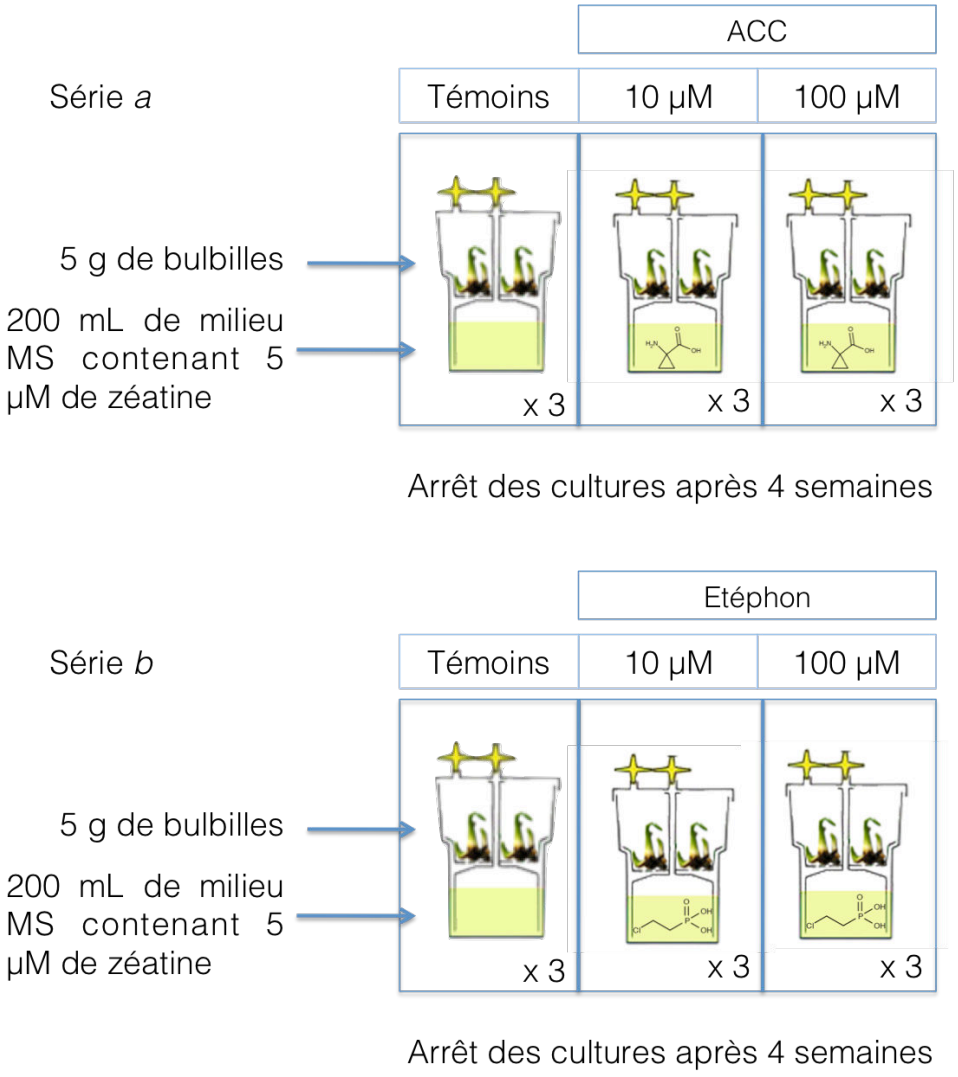


Figure 77 : Protocole d'incubation des bulbilles de *L. aestivum* et de *L. aestivum* 'Gravety Giant' en présence d'un précurseur de l'éthylène (ACC) et d'un relargueur d'éthylène (éténhon).

3.1 Evaluation des taux de croissance

Au bout de 4 semaines de culture en présence de l'ACC ou de l'éténhon, les bulbilles ont été récupérées, lavées, séchées et pesées. Les taux de croissance ont été calculés comme déjà décrit dans le paragraphe 8 du chapitre Matériels et Méthodes. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 18, ci-dessous.

Tableau 18 : Taux de croissance des bulbilles en présence d'ACC ou d'étéphon.

	Taux de croissance	
Conditions de culture	*L. aestivum*	*L. aestivum* 'Gravety Giant'
témoins	1,206 ± 0,06	0,848 ± 0,19
10 µM ACC	2,822 ± 0,19	2,735 ± 0,06
100 µM ACC	2,744 ± 0,28	2,958 ± 0,05
10 µM étéphon	1,671 ± 0,17	3,36 ± 0,02
100 µM étéphon	1,989 ± 0,03	2,9 ± 0,12

En comparant les résultats obtenus avec ceux des bulbilles témoins, on constate que le taux de croissance des bulbilles de *L. aestivum* (1,206 ± 0,06) était plus élevé que celui obtenu avec *L. aestivum* 'Gravety Giant' (0,848 ± 0,19). En présence de l'ACC et de l'étéphon, les taux de croissance obtenus pour les deux variétés étaient toujours plus élevés que ceux obtenus avec les témoins. En présence de l'ACC et dans toutes les conditions étudiées, les taux de croissance étaient comparables et compris entre 2,735 ± 0,06 (obtenu avec les bulbilles de la variété Gravety Giant en présence de 10 µM d'ACC) et 2,958 ± 0,05 (obtenu avec la même variété en présence de 100 µM d'ACC). En présence de l'étéphon, les taux de croissance des bulbilles de *L. aestivum* étaient moins élevés que ceux des bulbilles *L. aestivum* 'Gravety Giant'. Dans le premier cas, le taux le plus élevé (1,989 ± 0,03) a été obtenu en présence de 100 µM d'étéphon, tandis que dans le second, la valeur la plus importante (3,36 ± 0,02) a été obtenue en présence de 10 µM d'étéphon.

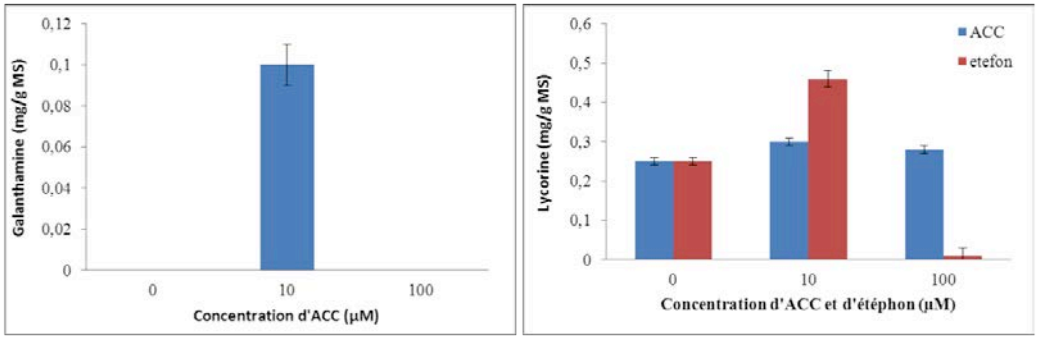
L'ajout d'ACC dans les milieux de culture a stimulé aussi bien la croissance des bulbilles de *L. aestivum* que celle de *L. aestivum* 'Gravety Giant'. Par contre, l'effet de l'étéphon sur la croissance des cultures était différent selon la variété des bulbilles étudiée. Comparativement aux témoins, l'étéphon a stimulé fortement la croissance des bulbilles de la variété Gravety Giant (taux de croissance de 2,9 ± 0,12 et 3,36 ± 0,02) et légèrement la croissance des bulbilles de *L. aestivum* (taux de croissance de 1,671 ± 0,17 et 1,989 ± 0,03).

L'effet stimulateur de l'ACC sur la croissance a été également observé avec les embryons somatiques de *L. aestivum*[82] et de carotte[173], en présence de 10 µM d'ACC. Cependant, ce composé employé, à une concentration de 100 µM a montré un effet inhibiteur de la croissance d'embryons somatiques de carotte. L'éthéphon (100 µM), par contre, a eu des effets positifs sur la croissance de ces derniers.

3.2 Analyse quantitative des alcaloïdes en GCMS

Après 4 semaines de culture, les alcaloïdes ont été extraits à partir des bulbilles lyophilisées. Les extraits méthanoliques obtenus ont été purifiés par SPE (selon le protocole mis au point dans le chapitre 2 de Résultats et Discussions) puis injectés en GCMS. Les résultats de l'analyse quantitative des alcaloïdes sont présentés dans la Figure 78.

L. aestivum



L. aestivum 'Gravety Giant'

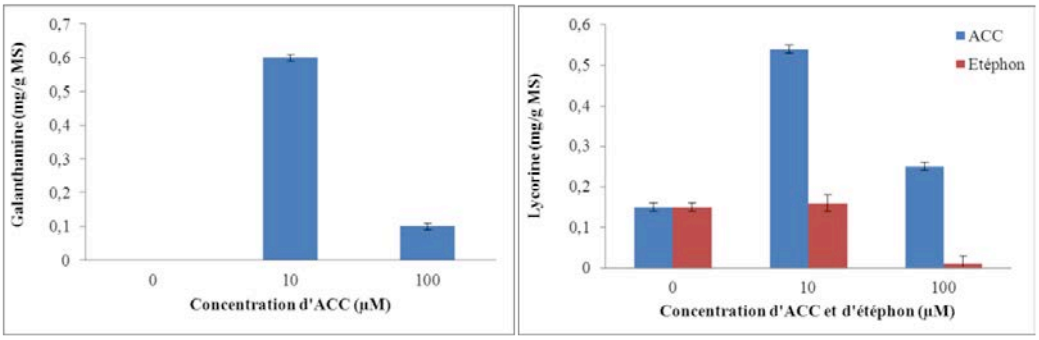


Figure 78: Concentrations en galanthamine et lycorine dans les extraits de bulbilles de *L. aestivum* et de *L. aestivum* de la variété Gravety Giant mises en culture dans des bioréacteurs RITA® en présence de l'ACC ou de l'éthéphon.

La voie de biosynthèse de la galanthamine a été élicitée dans les bulbilles de *L. aestivum* en présence de 10 µM d'ACC. L'accumulation maximale de galanthamine dans les bulbilles a atteint 0,1 ± 0,01 mg/g MS. Il

est à noter que dans les bulbiles témoins et dans les bulbilles mises en contact avec 100 µM d'ACC et avec de l'éthéon (10 et 100 µM), la galanthamine n'était pas détectable. Cependant, les bulbilles de *L. aestivum* témoins étaient initialement riches en lycorine (0,25 ± 0,01 mg/g MS) et la biosynthèse de l'alcaloïde par les bulbilles de *L. aestivum* a été légèrement stimulé par 10 µM (0,3 ± 0,01 mg/g MS) et 100 µM d'ACC (0,28 ± 0,01 mg/g MS). La présence de 10 µM d'éthéphon dans le milieu de culture, a fortement stimulé la production de lycorine avec une accumulation maximale de 0,46 ± 0,02 mg/g MS. On remarque que, l'ajout de 100 µM d'éthéphon a fortement inhibé la biosynthèse de cet alcaloïde (0,01 ± 0,02 mg/g MS). On peut donc conclure que l'éthéphon à faible concentration a stimulé la biosynthèse de lycorine mais n'a pas eu d'effet ni éliciteur ni inhibiteur sur la galanthamine.

Chez *L. aestivum* 'Gravety Giant', la concentration maximale de galanthamine (0,6 ± 0,01 mg/g MS) a été observée avec 10 µM d'ACC comme observé précédemment chez *L. aestivum* (0,1 ± 0,01 mg/g MS). Les bulbilles témoins ne présentaient pas de galanthamine et l'éthéphon n'a pas montré un effet eliciteur sur la synthèse de la galanthamine. La présence de 10 µM d'ACC a fortement élicité la voie de biosynthèse de la galanthamine avec les deux variétés de bulbilles étudiées. Cependant, l'accumulation de la galanthamine chez la variété Gravety Giant était plus importante qu'avec *L. aestivum* (0,6 v/s 0,1 mg/g MS). Le matériel témoin était riche en lycorine (0,15 ± 0,01 mg/g MS). La biosynthèse de cet alcaloïde a été élicitée (0,54 ± 0,01 mg/g MS) en présence de 10 µM d'ACC dans le milieu de culture des bulbilles de *L. aesivum* 'Gravety Giant'. Avec 100 µM d'ACC, la quantité de lycorine était moins élevée (0,25 ± 0,01 mg/g MS). Pour ce qui concernre l'éthéphon, l'ajout de 10 µM n'avait pas d'effet stimulant sur la production de lycorine par les bulbilles comparativement avec les témoins. Cependant, l'ajout de 100 µM d'éthéphon au milieu de culture a inhibé cette biosynthèse. Ce même phénomène a été observé avec les bulbilles de *L. aestivum*.

Ptak et al.,[82] avaient aussi observé l'effet stimulateur de l'ACC sur la biosynthèse de la galanthamine par des embryons somatiques de *L. aestivum*. L'ACC a également stimulé la production de shikonine dans des cultures de *Lithospermum erythrorhizon*[181]. L'éthéphon, ajouté à une concentration de 50 µM dans le milieu de culture de racines de *Panax ginseng*, a stimulé la croissance des racines ansi que l'accumulation de ginsenosides[178]. Cependant, ajouté à une concentration de 100 µM, l'éthéphon a inhibé l'accumulation de ginsenosides[178]. Le même phénomène a

été observé avec l'accumulation de lycorine dans les bulbilles de *L. aestivum* mises en culture en présence de 100 µM d'éthéphon.

4 Conclusion du chapitre 5

Des études antérieures réalisées au laboratoire avaient montré que l'éthylène avait un effet stimulateur de la production de galanthamine et de lycorine dans des cultures d'embryons somatiques de *L. aestivum*. Les quantités de ce phytorégulateur de nature gazeuse peuvent être contrôlées *in vitro* par l'ajout de précurseur (ACC), d'inhibiteurs (STS, $AgNO_3$), d'adsorbant ($KMnO_4$) ou de relargueur (éthéphon) d'éthylène.

Dans nos travaux, l'effet de l'ajout de l'ACC un précurseur de l'éthylène, et de l'éthéphon un relargueur d'éthylène, a été étudié sur la biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine à la fois dans des bulbilles de *L. aestivum* et de *L. aestivum* 'Gravety Giant'. Les cultures ont été réalisées dans des bioréacteurs RITA®.

L'ACC ajouté à une concentration de 10 µM aux milieux de culture des deux espèces de *Leucojum* avait un effet stimulateur sur la voie de biosynthèse de la galanthamine (0,1 ± 0,01 et 0,6 ± 0,01 mg/g MS respectivement). Chez les bulbilles de *L. aestivum*, l'accumulation de la lycorine a été stimulée de 1,84 fois par rapport aux témoins (0,46 ± 0,02 mg/g MS v/s 0,25 ± 0,01 mg/g MS dans les bulbilles témoins) en présence de 10 µM d'éthéphon et inhibée en présence de 100 µM d'éthéphon. Notons que sous ces conditions de culture, la voie de biosynthèse de la lycorine a été favorisée par rapport à celle de la galanthamine. Chez les bulbilles de la variété Gravety Giant, la biosynthèse de la lycorine a été stimulée de 3,6 fois par rapport aux témoins (0,54 ± 0,01 mg/g MS v/s 0,15 ± 0,01 mg/g MS dans les bulbilles témoins) en présence de 10 µM d'ACC. Sous ces conditions de culture, la production de la galanthamine était presque égale à celle de la lycorine. Par contre, la voie de biosynthèse a été fortement inhibée en présence de 100 µM d'éthéphon. Des concentrations élevées en éthéphon dans les milieux de culture avaient un effet drastique sur la biosynthèse de la lycorine avec les deux variétés de bulbilles étudiées.

Chapitre 6 : Isolement de bactéries endophytes à partir d'Amaryllidaceae

Comme déjà évoqué dans le premier chapitre Synthèse Bibliographique, les endophytes sont des bactéries ou des champignons qui, durant tout ou une partie de leur cycle de vie, envahissent les tissus vivants des plantes[121]. L'association entre la plante et l'endophyte est, le plus souvent, mutualiste.

Des 300 000 espèces de plantes sur Terre, chaque plante est l'hôte d'un ou de plusieurs endophytes[22]. Ces derniers ont été isolés à partir de nombreuses familles de plantes et leur potentiel à produire des métabolites secondaires est actuellement largement étudié. Cependant, ce genre d'investigations n'a jamais été mené chez les individus de la famille des Amaryllidaceae.

Comme leur plante hôte, les endophytes produisent eux-aussi une grande variété de métabolites secondaires (alcaloïdes, benzopyranones, quinones, flavonoïdes, acides phénoliques, stéroïdes, terpenoïdes, tetralones, xanthones, etc[117-120]). Des composés, ayant des activités antibiotiques, antimycosiques, antivirales, antioxydantes, anticancéreuses et des composés suppresseurs de l'immunité, ont été isolés à partir d'endophytes[118, 128]. Ces métabolites sont impliqués dans plusieurs mécanismes parmi lesquels on peut citer la défense de la plante hôte contre l'attaque des insectes et des herbivores, l'absorption des nutriments par la plante, la production et la modulation des auxines et de l'éthylène. La production des métabolites secondaires nécessite parfois l'association de la plante et de l'endophyte.

L'accumulation des métabolites secondaires dans les cultures *in vitro* de plantes, nécessitent, d'une part, une connaissance minimale de leur voie de biosynthèse et, d'autre part, des bioréacteurs spécialisés pour la culture de tissus différenciés. La plupart du temps, les quantités de métabolites secondaires accumulées dans les tissus et relarguées dans les milieux de culture sont relativement faibles. La mise sur le marché de composés produits *in vitro* est ainsi limitée[11]. Rappelons que parmi tous les métabolites

secondaires commercialisés, seule la shikonine est entièrement produite par des cultures cellulaires de *Lithospermum erythrorhizon*[11].

Les cultures d'endophytes, quant à elles, sont relativement rapides, moins coûteuses et moins fastidieuse que les cultures végétales. Les bioréacteurs, offrant des conditions optimales de culture, permettent l'obtention plus aisée de métabolites secondaires précieux. Ainsi, la production de métabolites secondaires par la culture d'endophytes pourrait devenir réalisable. Les cultures *in vitro* de plantes pourraient être remplacées par les cultures de microorganismes et la production des composés désirés deviendrait économiquement viable et industrialisable.

La famille des Amaryllidaceae, reconnue pour ses divers alcaloïdes biologiquement actifs, représente une piste intéressante pour l'exploitation des endophytes et de leur potentiel métabolique.

1 Isolement d'endophytes à partir de plantes de la famille des Amarylidaceae

La présence potentielle d'endophytes a été recherchée dans des bulbes *in vivo* de *L. aestivum*, *N. pseudonarcissus* et *G. elwesii* ainsi que dans les bulbilles (issues de la culture *in vitro*) de ces trois genres de plantes.

1.1 Décontamination de la surface des explants primaires et test de stérilité

Le matériel de départ doit être frais. Les explants ont été prélevés de la partie centrale des bulbes sauvages. Cette partie du bulbe renferme les feuilles les plus jeunes qui n'ont jamais été au contact des microorganismes de la rhizosphère. Les explants ont été décontaminés comme décrit dans le paragraphe 4.1 du chapitre Matériels et Méthodes.

Une fois décontaminés et séchés, les explants ont été mis en culture sur un milieu MS solide. L'objectif de cette étape est de s'assurer que la surface des explants est stérile. Les cultures ont été maintenues pendant trois semaines à 25 ± 2°C. Un explant est considéré comme stérile s'il ne se développe aucun microorganisme sur le milieu gélosé.

1.2 Isolement des endophytes

Après avoir réalisé le test de stérilité, les explants primaires présentant une surface stérile ainsi que les explants provenant de la culture *in vitro* (cals et bulbilles) dont la surface est considéréé stérile (absence de contamination dans les cultures) ont été transférés sur des milieux de culture généraux NA (Nutrient Agar) et PDA (Potato Dextrose Agar) contenant ou non du chloramphénicol. Le milieu de culture NA est adapté à la culture des bactéries, alors que le milieu PDA est adapté pour le développement des champignons. Les cultures ont été placées à l'obscurité à 30°C et surveillées régulièrement.

Avec les bulbes *in vivo*, seuls les explants provenant de la partie centrale du bulbe ont été utilisés pour la recherche d'endophytes. Les racines, les bulbilles, les feuilles ainsi que les cals ont été étudiées chez les plantes *in vitro* de *L. aestivum*. Les cultures de *N. pseudonarcissus* et *G. elwesii*, étant plus jeunes et donc moins développées, ont permis l'étude uniquement des bulbilles. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 19.

Des colonies bactériennes sont apparues après 4 jours de culture avec tous les explants de bulbes et de bulbilles mis en culture sur les milieux NA et PDA dépourvus de chloramphénicol. Par contre aucune colonie ne s'est développée au niveau des cals de *L. aestivum* et au niveau des explants mis en culture sur les milieux NA et PDA contenant du chloramphénicol. Aucune colonie fongique n'a été observée quelles que soient les conditions de culture.

Les colonies se développent toutes à partir des explants (Figure 79). Les colonies bactériennes développées sur le même type d'explants déposés sur deux milieux de culture différents étaient morphologiquement différentes (Figure 79). Dans le but de faciliter l'identification des bactéries, les colonies ont toutes été référencées et repiquées sur des milieux NA de manière à les isoler en suivant la méthode des quadrants (Figure 80).

Tableau 19 : Résultats du dépistage d'endophytes. NA+ et PDA+ désignent les milieux Nutrient Agar et Potato Dextrose Agar additionnés de 0,5 g/L de chloramphénicol. Les signes (+) et (-) désignent respectivement présence et absence d'endophytes.

In vivo / in vitro	Genre espèce	Origine des explants	Milieu de culture	Présence d'endophytes	Nature des endophytes
Bulbes *in vivo*	*L. aestivum*	La partie centrale du bulbe	NA	+	bactérienne
			PDA	+	bactérienne
			NA +	-	
			PDA +	-	
	G. elwesii		NA	+	bactérienne
			PDA	+	bactérienne
			NA +	-	
			PDA +	-	
	N. pseudonarcissus		NA	+	bactérienne
			PDA	+	bactérienne
			NA +	-	
			PDA +	-	
Bulbilles *in vitro*	*L. aestivum*	Bulbilles	NA	+	bactérienne
			PDA	+	bactérienne
			NA +	-	
			PDA +	-	
		Racines	NA	+	bactérienne
			PDA	+	bactérienne
			NA +	-	
			PDA +	-	
		Feuilles	NA	+	bactérienne
			PDA	+	bactérienne
			NA +	-	
			PDA +	-	
		Cals	NA	-	
			PDA	-	
			NA +	-	
			PDA +	-	
	G. elwesii	Bulbilles	NA	+	bactérienne
			PDA	+	bactérienne
			NA +	-	
			PDA +	-	
	N. pseudonarcissus	Bulbilles	NA	+	bactérienne
			PDA	+	bactérienne
			NA +	-	
			PDA +	-	

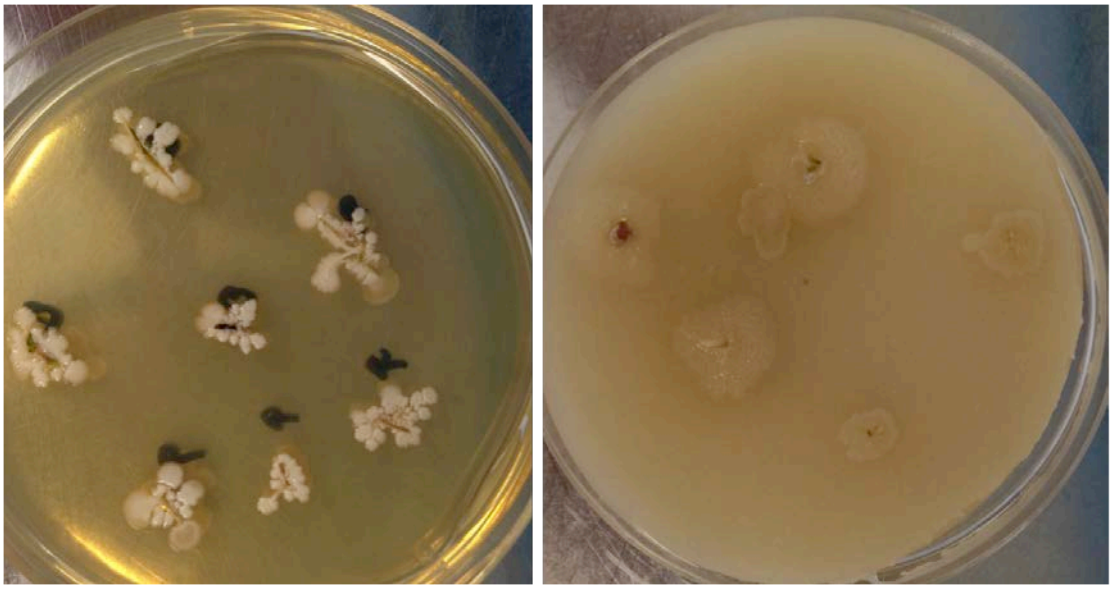


Figure 79: Développement de colonies bactériennes endophytes à partir d'explants de bulbilles de *L. aestivum* (à gauche les explants sont mis en culture sur un milieu NA, à droite sur un milieu PDA).

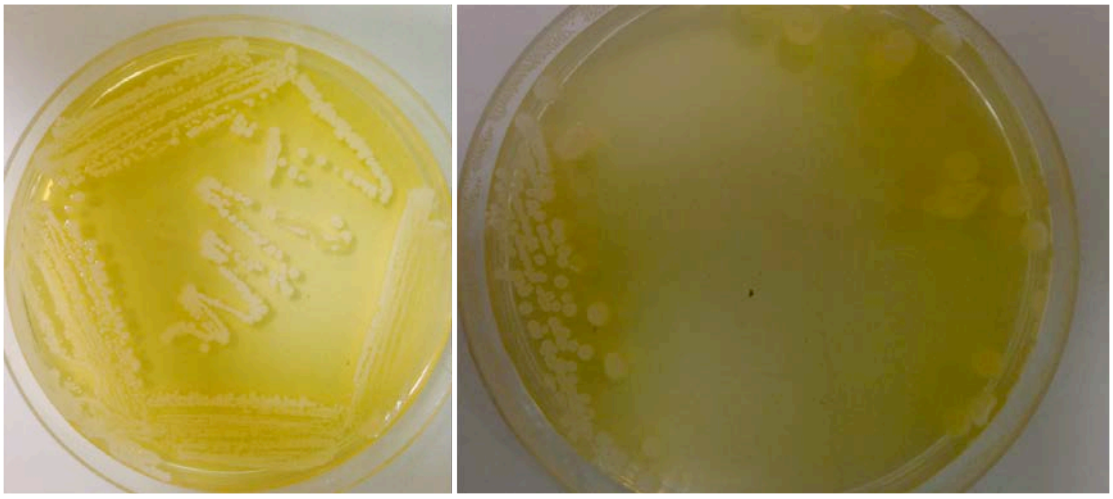


Figure 80: Repiquage des colonies selon la méthode des quadrants (à gauche sans dilution préalabale de la colonie, à droite avec 6 dilutions successives au 1/10^{e}).

2 Identification des bactéries endophytes isolées

L'identification des bactéries prend en compte plusieurs caractères, parmi lesquels : la morphologie de la colonie et de la cellule, la composition chimique des parois cellulaires, les activités biochimiques et les besoins nutritifs et finalement l'information génétique.

En vue d'une bonne identification bactérienne, il faut avoir une culture jeune et pure de colonies isolées.

2.1 Description morphologique des colonies isolées

Cette première étape consiste en une description macroscopique des colonies isolées. En effet, chaque colonie bactérienne a ses caractéristiques de taille, forme, bords, degré d'opacité et couleur. Les termes les plus généralement employés ont été résumés dans le tableau 4 (paragraphe 13.1 du chapitre Matériels et Méthodes).

Suite à cette étape, les colonies ayant les mêmes caractéristiques morphologiques ont été considérées identiques. Au final, 4 types de colonies ont été identifiés. Le Tableau 20 résume la description morphologique de ces 4 types de colonies.

Tableau 20 : Description morphologique des 4 types de colonies bactériennes endophytes.

Référence de la colonie	Couleur	Forme et surface	Relief	Contour	Taille
A	Blanc crème, brillante, dense	Circulaire Lisse	Convexe avec vagues concentriques	Régulier	Petite colonie (d=1 mm)
B	Blanc crème, brillante, dense	Circulaire Lisse	Convexe avec vagues concentriques	Régulier	Petite colonie (d=1,5 mm)
C	Blanc crème, peu brillante, translucide	Circulaire Lisse	Convexe avec vagues concentriques	Régulier	Petite colonie (d=2,5 mm)
D	Blanc crème, brillante, dense	Circulaire Lisse	Bossue	Régulier	Petite colonie (d=2 mm)

Notons que les colonies diffèrent par quelques aspects.

2.2 Composition biochimique des parois cellulaires: test de Gram

La coloration de Gram doit son nom au microbiologiste danois Han Christian Gram qui mit au point le protocole en 1884. Dans la méthode de Gram, basée sur la capacité de la cellule à retenir le cristal violet (première coloration employée), ce sont les propriétés de la paroi bactérienne qui sont mises en évidence.

Pour comprendre le principe de la coloration, rappelons d'abord la composition des deux types de parois bactériennes.

Le peptidoglycane est le principal composant structurel de la paroi bactérienne. Il lui confère sa rigidité grâce à une structure complexe à mailles losangées. Certaines bactéries ont une paroi épaisse composées de plusieurs couches de peptidoglycanes empilées les unes sur les autres. Ces bactéries sont dites à gram positif (+) et apparaissent en violet après la coloration de Gram (Figure 81). D'autres bactéries possèdent une fine couche de peptidoglycanes couverte par une autre membrane externe (membrane phospholipidique). Celle-ci est identique à la membrane interne qui enveloppe toutes les bactéries (Figure 81). Ces bactéries possèdent alors une double membrane et sont dites à gram négatif (-). Elles apparaissent en rose après le test de Gram.

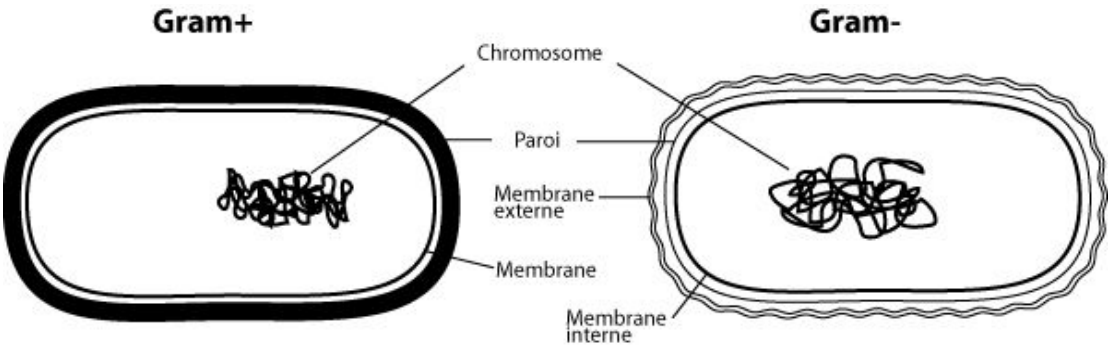


Figure 81 : Enveloppe de bactérie à gram + et à gram -.

Le test de gram a été réalisé avec les différentes colonies isolées. Les bactéries ont été examinées sous microscope. Les résultats obtenus étaient tous identiques. Il s'agit de bactéries à gram + en forme de bacilles (Figure 82).

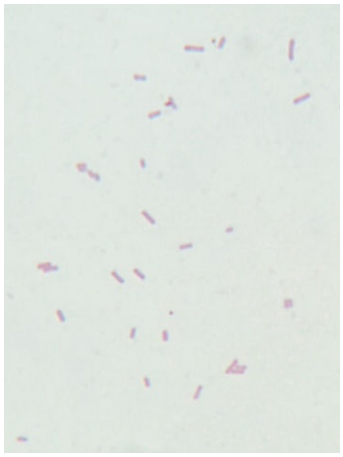


Figure 82 : Bactéries à gram + en forme de bacilles observées au microscope optique sous grossissement x1000.

2.3 Identification biochimique : API® 20 E™

Les galeries API® 20 E™ (Biomérieux, France) consistent en un test standardisé pour l'identification biochimique des Enterobacteriaceae et autres bacilles à gram négatif. Chaque galerie comprend 21 tests biochimiques facilitant l'identification des bactéries (Figure 83). Ces tests étudient le métabolisme protéique (présence d'uréase, production d'indole, dégradation du tryptophane), la fermentation des sucres (glucose, lactose, saccharose, etc.), la capacité d'utiliser le citrate, la présence d'enzymes (décarboxylase, désaminase), la production d'hydrogène sulfuré ou encore la formation de gaz.

D'après le test de Gram, les différentes souches bactériennes isolées sont des bacilles à gram +. Les galeries API® 20 E™ ont été utilisées puisqu'elles permettent l'identification des bacilles. Pour cela, il suffit de préciser dans le logiciel d'identification qu'il s'agit de bacilles.

Une fois l'inoculum bactérien préparé, il est réparti dans les différents tubes selon les instructions du fabricant. Les galeries sont ensuite incubées à 30°C pendant 24 h ou 36 h. Au bout de la période d'incubation, la lecture se fait comme décrit dans le tableau de lecture fournit par le fabriquant (Figure 83). Les tests nécessitant l'ajout des réactifs sont lus en dernier. Les résultats obtenus sont notés sur la fiche des résultats. Les étapes de réalisation de ce test sont détaillées dans le paragraphe 13.4 du chapitre Matériels et Méthodes.

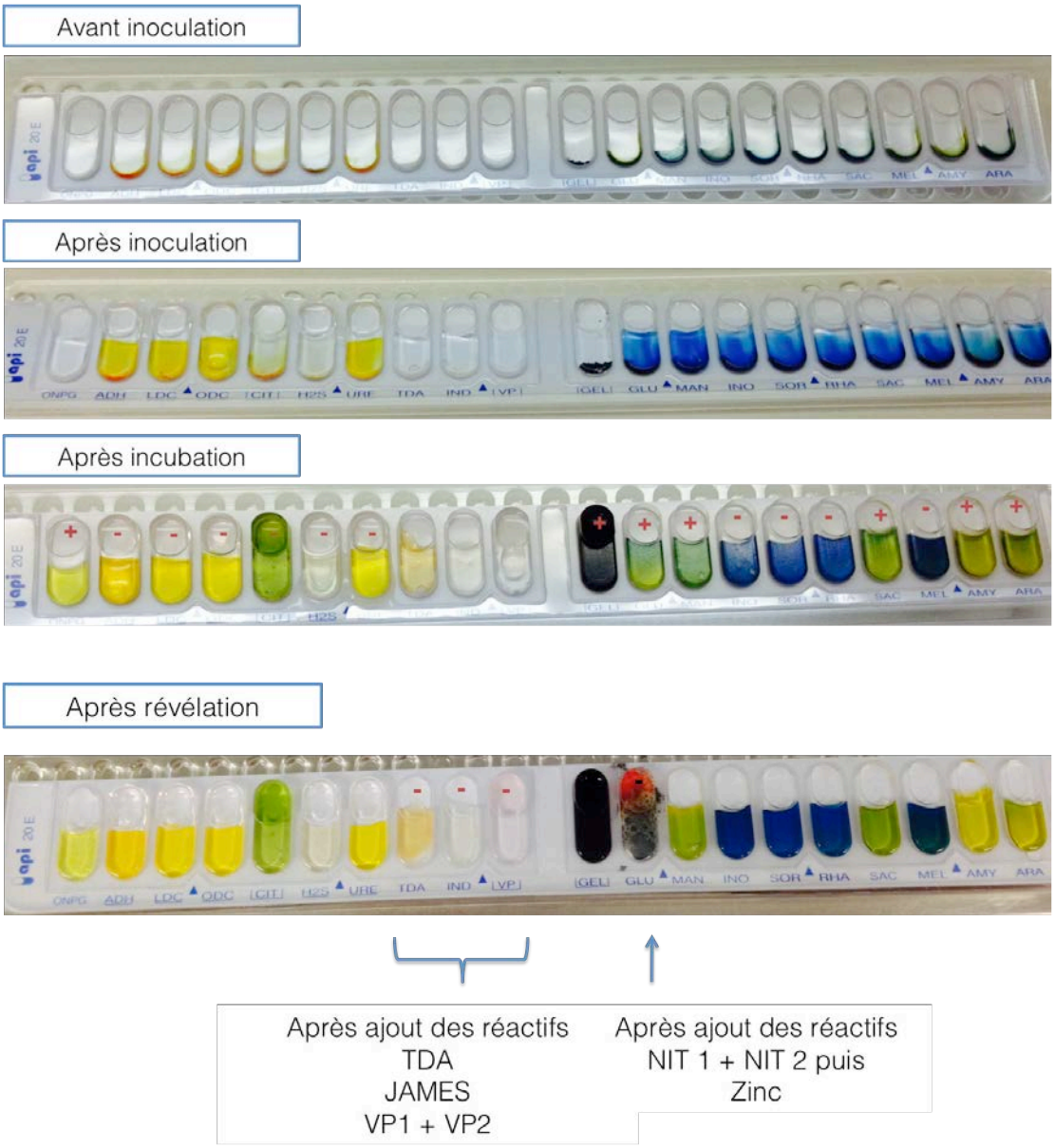


Figure 83 : Etapes de la réalisation du test API® 20 E™ depuis l'inoculation de la galerie jusqu'à la lecture.

Les tests négatifs étaient : les tests ADH, LDC, ODC, CIT, H_2S, URE, TDA, IND, VP, INO, SOR, RHA, MEL, NO_2/N_2. Les tests positifs étaient : les tests ONPG, GEL, GLU, MAN, SAC, AMY, ARA.

En termes biochimiques, les différentes souches bactériennes sont capables de dégrader le lactose (ONPG +) grâce à l'activité de la ß-galactosidase. Elles sont aussi capables de dégrader la gélatine (GEL +) grâce à la présence d'une protéase (gélatinase). Ces bactéries fermentent le glucose (GLU +), le mannitol (MAN +), le saccharose (SAC +), l'amylose (AMY +) et l'arabinose (ARA +).

Le code obtenu après lecture de toutes les galeries API® était 1006123. D'après le logiciel d'identification, le taxon *Bacillus pumilus* est probable (70%).

L'un des inconvénients des galeries API® est qu'il arrive que la lecture de certains tests puisse se révéler difficile. Un œil inexpérimenté peut aisément interpréter de faux positifs ou de faux négatifs, principalement avec les tests de métabolisation des sucres : un positif vrai étant jaune, et un négatif vrai étant bleu-vert, l'obtention d'une couleur verte foncée, somme toute relativement fréquente, est difficile à interpréter et dépendra du gradient de couleur obtenu. C'est la raison pour laquelle, seule une identification moléculaire permettra une identification correcte de la souche isolée.

2.4 Identification moléculaire : gène codant pour l'ARNr 16S (ADNr 16S)

Ce travail a été fait en collaboration avec le Dr. Alain Hehn, laboratoire Agronomie et Environnement-UMR 1121 de l'Univeristé de Lorraine.

Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique (composé de protéines et d'ARN) permettant la synthèse des protéines en utilisant l'ARN messager (ARNm) comme source d'information et les ARN de transfert (ARNt) associés aux acides aminés comme substrats (Figure 84). Cette synthèse protéique chez les cellules eucaryotes et procaryotes est appelée la traduction.

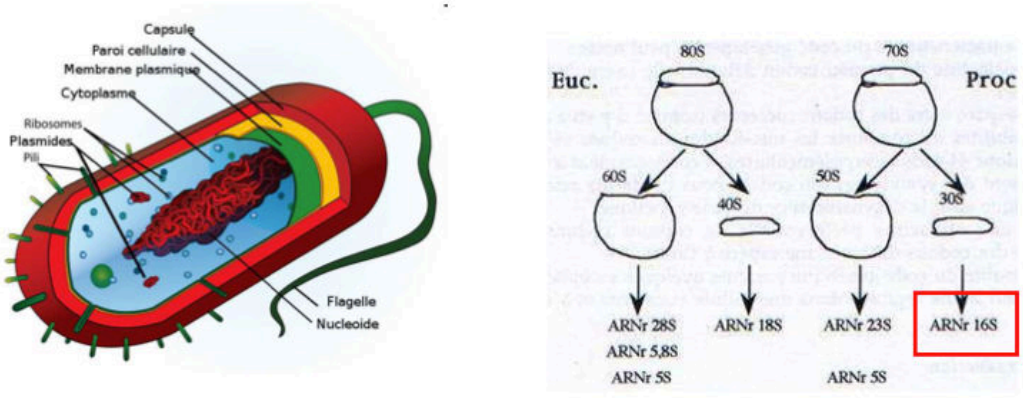


Figure 84 : L'ARN ribosomique 16S, un constituant de la petite sous-unité ribosomale des procaryotes.

Chez les bactéries, le ribosome est composé d'une grande sous-unité (50S) et d'une petite sous-unité (30S). L'ARN ribosomique (ARNr) 16S est un constituant de la petite sous-unité ribosomale des procaryotes (Figure 84).

En 1987, Carl Woese a démontré que les ARNr sont des molécules ayant évolué plus lentement que le reste du génome et constituent, de ce fait, une horloge moléculaire lente[182] et peuvent ainsi servir pour suivre les changements dans l'évolution bactérienne. Le gène codant pour cet ARNr est le « 16S rRNA gene ». Il est composé d'environ 1500 nucléotides et est constitué de 7 régions conservées et de 9 régions hypervariables[183]. L'ensemble permet d'utiliser ce gène pour identifier et détecter une espèce bactérienne. En 1991, Weisburg et al. ont décrit des amorces dites « universelles » permettant d'amplifier l'intégralité du gène codant pour l'ARNr 16S de la plupart des bactéries[184]. Depuis, de nombreuses amorces universelles ont été décrites dans la littérature. Ainsi, l'amplification de l'ARNr 16S suivie du séquençage a été utilisée pour identifier des souches bactériennes mal identifiées avec les méthodes conventionnelles.

Pour l'identification des 4 souches bactériennes isolées à partir des bulbes et bulbilles d'Amaryllidaceae, 4 suspensions bactériennes ont été préparées. Un volume précis de la suspension a été ajouté au mélange réactionnel. Après la PCR, les tubes ont été récupérés et stockés à -20°C jusqu'à leur envoie au séquençage. L'analyse des séquences a été faite avec la banque de données NCBI-BLAST. Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences des gènes ARN16S rapportées dans la banque de données GenBank. Les résultats obtenus indiquent 99% d'identité avec différentes souches de *Bacillus*, en particulier *B. safensis* et *B. pumilus*.

L'isolement de *Bacillus subtilis* à partir d'autres familles de plantes (*Castanea sativa*[185] et *Miquelia dentata*[186]) a été rapporté dans la littérature.

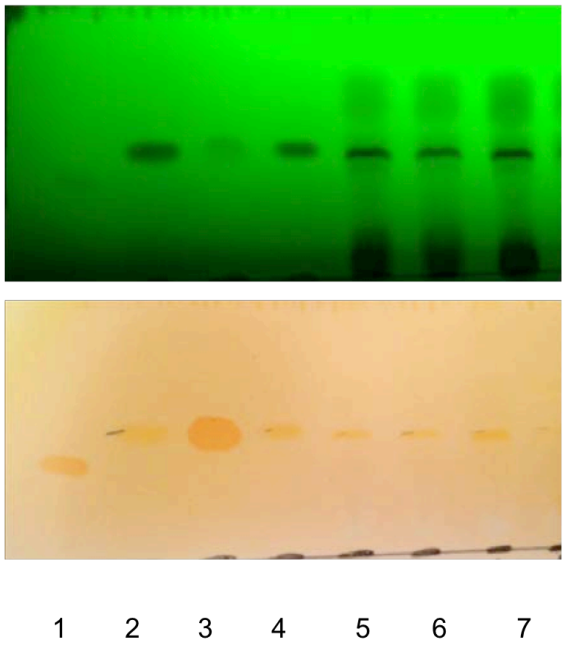
3 Dépistage chimique à la recherche d'alcaloïdes

Dans le but d'étudier la capacité des bactéries isolées à produire des alcaloïdes, des cultures bactériennes en milieu NA liquide ont été réalisées. Les cultures ont duré 72 h à 32°C et à l'obscurité. Au bout de la période de culture, les suspensions bactériennes ont été centrifugées pendant 10 min, à 10°C et à 100 000 rpm.

Les milieux de culture lyophilisés ainsi que les culots bactériens, ont été ensuite macérés respectivement dans du méthanol et dans de l'éthanol à 61%. La macération a duré 24 h intercalées d'1 h 30 min de sonication. Après extraction des éventuels alcaloïdes, les suspensions bactériennes ont été centrifugées. Le surnageant a été récupéré. L'éthanol a été retiré par évaporation rotative et l'eau a été lyophilisée. Le produit obtenu a été redissout dans du méthanol.

3.1 Criblage des alcaloïdes par CCM

Les extraits de milieux de culture, les extraits de bactéries endophytes ainsi que les standards de galanthamine, de lycorine, d'hyoscyamine et de norbelladine, ont été déposés sur des plaques en silice pour révéler la présence éventuelle d'alcaloïdes. La phase mobile consistait en un mélange d'acétate d'éthyle : acide acétique : acide formique : eau (100 mL:11 mL:11 mL:27 mL, v : v). Après migration et séchage, la plaque a été révélée avec le réactif de Dragendorff (Figure 85). Des tâches orange sont apparues avec les standards de galanthamine, de lycorine, d'hyoscyamine et de norbelladine ainsi qu'avec les extraits de bactéries. Les alcaloïdes produits par les bactéries ont migré avec un Rf un peu plus faible que ceux de la lycorine, de l'hyoscyamine et de la norballadine.



Lecture sous lumière UV à 254 nm

Révélation au réactif Dragendorff

Rf 1 = 0,364
Rf2 = 0,476
Rf3 = 0,475
Rf4 = 0,455
Rf5 =Rf6 = Rf7= 0,440

1 2 3 4 5 6 7

Figure 85 : Migration sur plaque de silice des standards de galanthamine (1), lycorine (2), hyoscyamine (3) et norbelladine (4) et des extraits de bactéries endophytes (5 à 7).

Ces résultats montrent que les bactéries endophytes extraites à partir des 3 espèces d'Amaryllidaceae étudiées, seraient capables de produire des alcaloïdes. Au bout de 72 h de culture, les alcaloïdes n'étaient pas encore relargués dans les milieux de culture.

3.2 Identification avec les réactifs de Bouchardat et Mayer

Afin de s'assurer de la présence des alcaloïdes, les réactifs de Bouchardat et de Mayer ont été utilisés. Pour cela, une petite quantité d'extrait bactérien lyophilisé a été dissoute dans de l'eau acide (5% H_2SO_4, pH 3). Ensuite, la phase aqueuse a été divisée en deux fractions. A la première et à la deuxième fraction une goutte du réactif de Bouchardat et une goutte du réactif de Mayer ont été ajoutées respectivement (Figure 86).

Un précipité de couleur rouge marron est apparu directement après l'ajout d'une goutte du réactif de Bouchardat. Avec le test de Mayer, un précipité blanc crème s'est formé instantanément après l'ajout d'une goutte de réactif.

Grâce à ces expériences, la présence d'alcaloïdes dans les extraits de bactéries endophytes a été mise en évidence avec les trois tests généraux des alcaloïdes (réactif de Dragendorff, réactif de Bouchardat et réactif de Mayer).

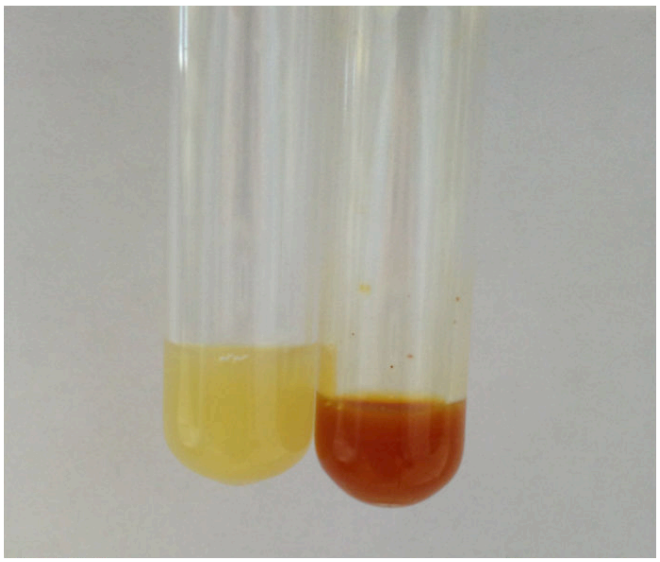


Figure 86 : Test de Mayer (à gauche) et test de Bouchardat (à droite).

4 Identification des alcaloïdes d'origine endophytique

4.1 Analyse des alcaloïdes par HPTLC-MS

Dans le but de déterminer la masse moléculaire de l'alcaloïde isolé ainsi que son rapport m/z, une analyse en HPTLC-MS a été réalisée. Le dépôt des échantillons a été réalisé avec l'appareil HPTLC semi-automatique CAMAG Linomat 5. L'interface de couplage à la spectrométrie de masse CAMAG TLC-MS Interface a permis l'analyse des composés en ESI-MS. Le protocole d'élution est décrit dans le paragraphe 16.1 du chapitre Matériels et Méthodes.

D'après les résultats obtenus, la masse moléculaire de l'alcaloïde est de 1336,4717 g/mol. Le pic majoritaire correspond à un m/z de 668,7489 avec un z = 2 (Figure 87). Le composé, dans les conditions de l'ESI est bichargé.

L'alcaloïde isolé n'est pas un alcaloïde connu chez les Amaryllidaceae. Sa masse moléculaire est trop importante pour cette famille de composés. Dans la littérature, de nombreuses bactéries appartenant au genre *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. mojavensis*, *B. marinus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*) ont été isolées à partir de plusieurs plantes médicinales et plantes marines. La diversité des métabolites secondaires, isolés à partir de ces bactéries (des alcaloïdes, des polykétides, des isocoumarines), est la preuve de la complexité du métabolisme bactérien[187].

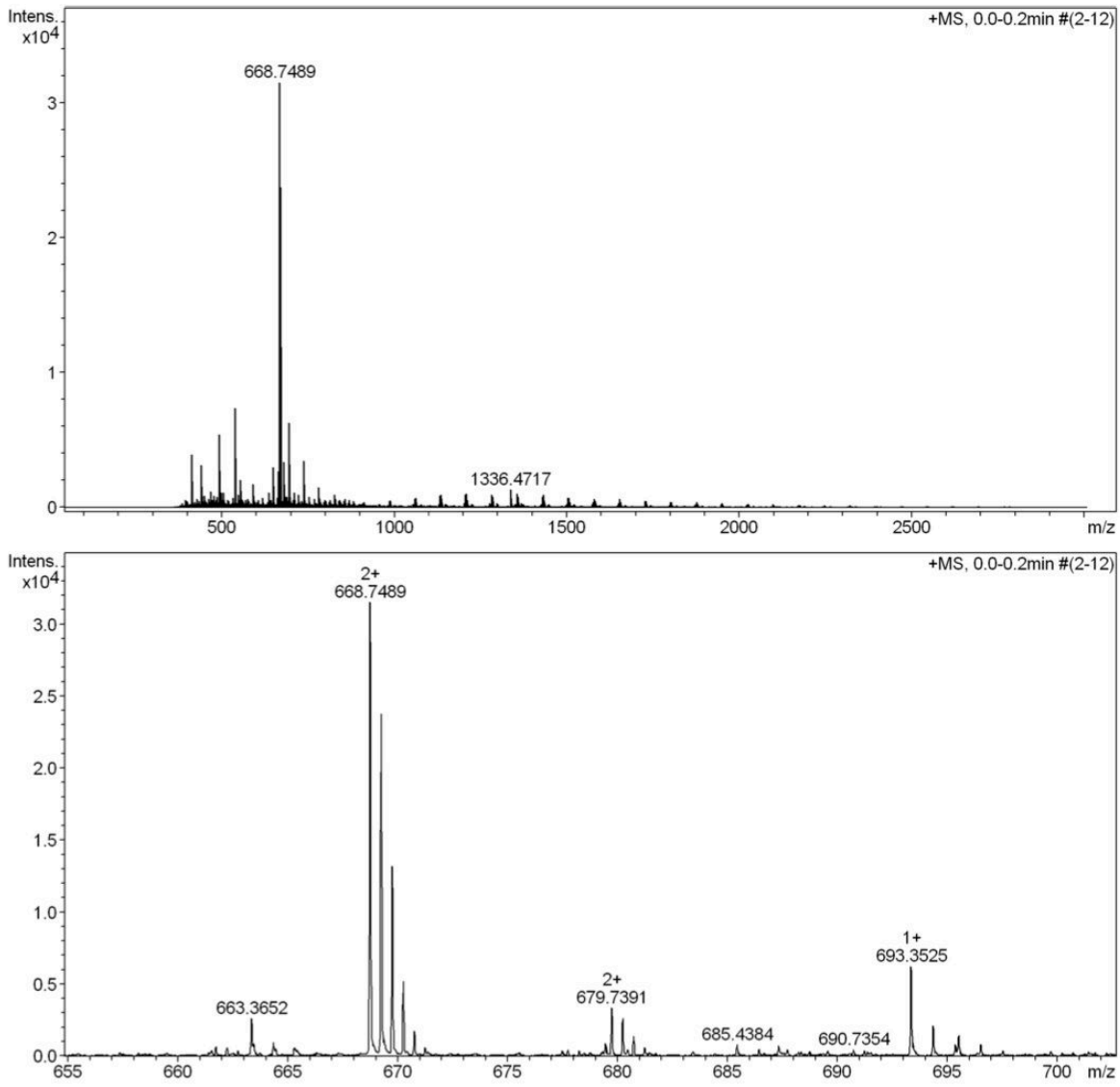


Figure 87 : Spectre de masse en ESI-MS de l'alcaloïde isolé à partir des endophytes. L'ion moléculaire est obtenu à m/z 1336,4717.

4.2 Purification de l'alcaloïde d'origine endophytique

Afin d'identifier l'alcaloïde produit par les bactéries endophytes, nous avons procédé tout d'abord à sa purification. L'appareil CombiFlash RF® a été utilisé. Les conditions d'élution sont décrites dans le paragraphe 16.2 du chapitre Matériels et Méthodes. Pour que l'appareil puisse définir les tubes renfermant l'alcaloïde élué à travers la colonne, la longueur d'onde à laquelle l'alcaloïde absorbe doit être définie. Pour cela, le spectre d'absorption UV de l'alcaloïde pur a été réalisé avec un spectrophotomètre SAFAS UV mc^2 (Figure 88). L'absorbance maximale a été atteinte à 205 nm.

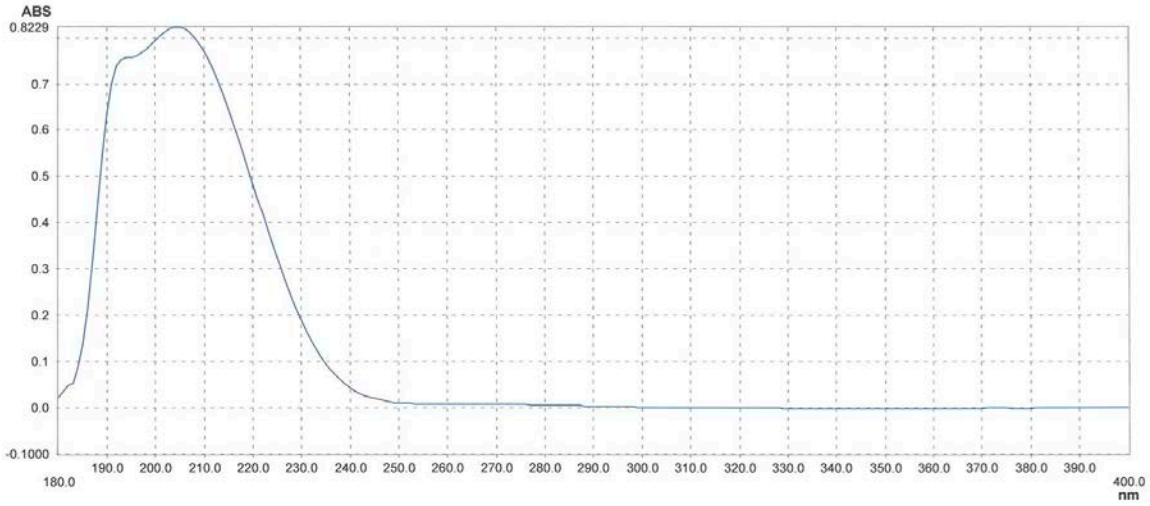


Figure 88 : Spectre UV de l'alcaloïde produit par les bactéries endophytes. L'absorbance maximale est atteinte à 205 nm.

La masse de l'extrait brut purifié était de 280 mg. Les fractions contenant l'alcaloïde (absorbance à 205 nm) étaient repérées par CCM. Ensuite, les fractions alcaloïdiques pures ont été récupérées et mélangées. L'acétate d'éthyle a été éliminé par évaporation rotative. La phase aqueuse a été lyophilisée. 44 mg de produit pur de couleur blanc crème ont été obtenus.

La résolution de la structure de l'alcaloïde est en cours.

5 Conclusion du chapitre 6

Des endophytes fongiques et bactériens, capables de produire une pléthore de composés biologiquement actifs, ont été isolés à partir de nombreuses familles de plantes. De plus, les cultures d'endophytes, relativement rapides, moins coûteuses et moins fastidieuses à réaliser que les cultures végétales, offrent un espoir pour la mise sur le marché de composés à haute valeur ajoutée.

Pour la première fois, la présence d'endophytes a été mise en évidence dans les bulbes et bulbilles de la famille des Amaryllidaceae. En particulier, trois genres d'Amaryllidaceae ont été étudiés : *L. aestivum*, *N. pseudonarcissus* et *G. elwesii*.

Grâce aux différentes techniques d'identification bactérienne (morphologique, cellulaire, biochimique et moléculaire), les endophytes

isolés à partir des bulbes *in vivo* et bulbilles *in vitro* ont pu être identifiés. Les résultats, obtenus à l'issu du séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, indiquent 99% d'identité avec différentes souches de *Bacillus*, en particulier *B. safensis* et *B. pumilus*.

Dans le but d'étudier la capacité des bactéries isolées à produire des alcaloïdes, des cultures bactériennes en milieu Nutrient Agar (NA) liquide ont été réalisées. Après 72 h de culture à 32°C, les suspensions bactériennes ont été récupérées et centrifugées. Le culot bactérien a été ensuite extrait par de l'éthanol à 61%.

Dans un premier temps, la présence des alcaloïdes a été mise en évidence avec les trois réactifs généraux des alcaloïdes (réactif de Dragendorff, réactif de Bouchardat et réactif de Mayer). Dans un second temps, la purification des alcaloïdes a été réalisée. Un composé pur a été isolé et sa masse moléculaire a été déterminée par de spectrométrie de masse, elle est égale à 1336,4717 g/mol. Dans les conditions de l'ESI, le composé est bichargé. Le peu d'informations dont nous disposons à l'heure actuelle nous orienterait vers l'identification d'un nouvel alcaloïde.

Les analyses RMN et la détermination structurale de ce composé sont en cours.

Partie 5 :

Conclusion Générale et Perspectives

Les alcaloïdes d'Amaryllidaceae constituent un groupe exclusif de composés doués d'activités biologiques diverses. Les plus connus sont la galanthamine et la lycorine. La galanthamine, grâce à ses propriétés antiacétylcholinestérasiques est utilisée pour le traitement palliatif de la maladie d'Alzheimer. La lycorine possède plusieurs activités biologiques, en particulier des activités antimalariques, antivirales, apoptotiques et analgésiques.

Les alcaloïdes, produits du métabolisme secondaire, sont synthétisés en faibles quantités par les plantes. Leur faible biodisponibilité, restreint ainsi leur commercialisation et leur utilisation thérapeutique. Les cultures *in vitro* appliquées avec succès chez d'autres plantes pour la production de métabolites à haute valeur ajoutée (par exemple la production de paclitaxel par les cultures cellulaires de *Taxus baccata*) représentent une alternative intéressante pour la production des alcaloïdes d'Amaryllidaceae. Cependant, la connaissance limitée de la voie de biosynthèse de ces alcaloïdes, tant au niveau biochimique que moléculaire, complique la tâche. Plusieurs travaux rapportés dans la littérature ont permis de définir plusieurs facteurs clés influençant la voie de biosynthèse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae, en particulier chez *L. aestivum*.

Par ailleurs, des endophytes fongiques et bactériens, capables de produire une large gamme de composés biologiquement actifs, ont été isolés à partir de nombreuses familles de plantes. Cependant, ce genre d'études n'a jamais été mené sur les plantes d'Amaryllidaceae.

Les principaux objectifs de ce travail étaient, premièrement, d'apporter plus d'informations concernant les facteurs exogènes pouvant influencer le rendement des cultures *in vitro* en termes de biomasse et d'alcaloïdes. Deuxièmement, nos travaux visaient à identifier des endophytes issus d'Amaryllidaceae producteurs d'alcaloïdes.

Dans le premier chapitre de la partie Résultats et Discussions, nous avons mis au point et validé les méthodes analytiques de chromatographies liquide et gazeuse couplées à la spectrométrie de masse (LCMS et GCMS). Les méthodes de séparation chromatographique utilisées par El Tahchy et al. (2010) ont été modifiées. Les nouveaux programmes d'élution ont permis de réduire le temps d'analyse tout en conservant une bonne séparation et une bonne résolution des pics. Pour la validation des méthodes

chromatographiques, une gamme étalon a été préparée à partir de dilutions successives d'une solution-mère de galanthamine, de lycorine et d'hyoscyamine. Une méthode d'étalonnage en interne a été mise au point. L'hyoscyamine, répondant à tous les critères qui définissent un bon étalon interne, a été choisie comme tel. Le domaine de linéarité a été ensuite déterminé pour les deux méthodes de dosage. En LCMS, l'intervalle de validité est compris entre 0,73 et 36,53 µg/mL pour la galanthamine et entre 0,65 et 32,55 µg/mL pour la lycorine. En GCMS, cet intervalle de linéarité est compris entre 14 et 92,5 µg/mL pour la galanthamine et entre 19 et 122,25 µg/mL pour la lycorine. La méthode LCMS, étant plus sensible que la GCMS est recommandée pour le dosage de faibles quantités d'alcaloïdes. Par contre, pour des valeurs relativement plus importantes, la méthode GCMS est la plus adéquate. Les limites de détection et de quantification, ainsi que la répétabilité de la méthode, sa spécificité et sa justesse ont été évaluées.

Au terme du deuxième chapitre, nous avons mis au point une technique de purification rapide et efficace des extraits complexes de plantes. En effet, l'étape du traitement de l'échantillon préalablement à son analyse chromatographique est primordiale. Elle permet l'élimination des composés interférents, l'augmentation de la sensibilité de la méthode d'analyse vis-à-vis des composés à analyser et la concentration de ces derniers dans l'échantillon. De faibles teneurs en alcaloïdes sont contenues dans les extraits complexes de végétaux, d'où l'importance de cette étape. De plus, la purification des extraits à analyser conduit à la réduction du nombre de pics apparaissant sur le chromatogramme, facilitant ainsi son interprétation. Elle permet aussi une meilleure quantification des alcaloïdes d'intérêt, un encrassement moins important des source d'ionisation, une réduction de l'endommagement des colonnes analytiques et une réduction du temps d'analyse. Dans un premier temps, la méthode traditionnelle de purification liquide-liquide a été testée. Une quantité connue d'hyoscyamine a été ajoutée aux extraits avant leur purification. Le calcul du taux de récupération a montré que seulement 40% des alcaloïdes étaient récupérés avec cette méthode. D'un point de vue analytique, l'ajout de l'étalon interne et le calcul du taux de récupération, permettent de remonter aux quantités initiales et exactes d'alcaloïdes. Cependant, le but de notre travail étant la stimulation de la voie de biosynthèse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae, la stimulation de la production serait vaine si le taux de récupération des alcaloïdes était considérablement réduit par l'étape de purification. Une autre méthode de purification, par extraction en phase solide (SPE), a été mise au point. La

méthode développée est efficace, simple et rapide. Elle permet de récupérer la totalité des alcaloïdes présents dans un extrait. Ainsi, pour la purification des extraits de bulbilles chlorophylliens, une phase normale de silice a été employée pour l'élimination des impuretés dont la chlorophylle. Tandis que pour la purification des milieux de culture aqueux et renfermant une grande quantité de sels, une phase 2H a été utilisée.

Dans les trois chapitres qui suivent, les effets de plusieurs facteurs exogènes ajoutés au milieu de culture liquide de bulbilles de *L. aestivum* ont été évalués à la fois sur la biomasse et sur l'accumulation en galanthamine et en lycorine.

Nous avons rapporté, dans le troisième chapitre, l'effet de l'ajout de 4'-*O*-méthylnorbelladine (MN), un précurseur de la voie de biosynthèse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae, dans les milieux de culture liquide de bulbilles de *L. aestivum*. Tout d'abord, la synthèse chimique du précurseur a été optimisée par rapport aux travaux de El Tahchy et al. (2010) (rendement de 47%). Ensuite, l'étude a porté sur l'effet de la MN sur des cultures de bulbilles de *L. aestivum* en conditions d'immersion temporaire. Les meilleures accumulations en galanthamine (0,781 ± 0,04 mg/g matière sèche) et en lycorine (0,537 mg/g MS) ont été obtenues en présence de 0,30 g/L de MN et après 30 jours de culture. Toujours dans le but de trouver de meilleurs individus producteurs de galantamine, la variété Gravety Giant de *L. aestivum* a été étudiée pour la première fois. Dans les mêmes conditions de culture, les bulbilles de cette variété ont accumulé une quantité supérieure de lycorine que celles des bulbilles de *L. aestivum*. La biosynthèse de la lycorine par cette variété a atteint 1,13 ± 0,1 mg/g MS soit une concentration 2,1 fois plus élevée que celle atteinte avec les bulbilles de *L. aetivum*.

Dans le quatrième chapitre, nous avons étudié l'effet de deux éliciteurs, le méthyljasmonate (MeJa) et l'acide salicylique (AS), sur les voies de biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine. L'expérience a été menée avec les bulbilles de *L. aestivum* et *L. aestivum* 'Gravety Giant'. Les bioréacteurs RITA® offrant de meilleures conditions de culture ont été utilisées pour cette série d'expériences. Bien que la voie de biosynthèse de la lycorine ait été favorisée par rapport à celle de la galanthamine, le MeJa a élicité les deux voies de biosynthèse. Une durée d'incubation de 168 h en présence de 50 µM de MeJa a conduit à l'accumulation maximale en

galanthamine (0,1 ± 0,01 mg/g MS) et en lycorine (0,6 ± 0,03 mg/g LS) dans les bulbilles de *L. aestivum*. L'AS a seulement élicité la biosynthèse de la lycorine. La concentration maximale (1 ± 0,05 mg/g MS) a été obtenue après 10 h d'incubation en présence de 5 µM d'AS. L'AS est un meilleur éliciteur de la lycorine que le MeJA. Son action est immédiate mais brève. Avec les bulbilles de *L. aestivum* 'Gravety Giant', le MeJa et l'AS ont élicité les deux voies de biosynthèse d'intérêt. Les concentrations les plus élevées en galanthamine (0,8 ± 0,01 mg/g MS) et en lycorine (1,53 ± 0,01 mg/g MS) ont été obtenues après 10 h d'incubation en présence de 5 µM d'AS. Dans ces conditions de culture, l'AS est un meilleur éliciteur de la galanthamine et de la lycorine.

L'effet du précurseur de l'éthylène ACC et celui du relargueur d'éthylène éthéphon, sur la voie de biosynthèse de la galanthamine et celle de la lycorine, a été étudié dans le cinquième chapitre. Des bulbilles de *L. aestivum* et *L. aestivum* 'Gravety Giant' ont été mises en culture dans des bioréacteurs RITA®. Au bout de 4 semaines de culture, les bulbilles ont été récupérées et leur contenu en alcaloïdes a été déterminé. L'ACC ajouté à une concentration de 10 µM dans les milieux de culture a conduit à l'élictation de la galanthamine (0,1 ± 0,01 mg/g MS) avec les bulbilles de *L. aestivum*. La concentration maximale de lycorine (0,46 ± 0,02 mg/g MS) a été obtenue en présence de 10 µM d'éthéphon. Avec les bulbilles de la variété Gravety Giant, 100 µM d'ACC a conduit à l'accumulation maximale de galanthamine (0,6 ± 0,01 mg/g MS) et de lycorine (0,54 ± 0,01 mg/g MS). On peut noter que dans les mêmes conditions de culture, les bulbilles de la variété Gravety Giant ont accumulé plus de galanthamine que les bulbilles de *L. aestivum*.

Dans les chapitres 3, 4 et 5 de la partie Résultats et Discussions, l'effet de plusieurs facteurs exogènes sur la voie de biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine ont été étudiés. Ainsi, l'effet d'un précurseur de la voie de biosynthèse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae (4'-O-méthylnorbelladine), de deux éliciteurs (méthyljasmonate et acide salicylique) de la voie de biosynthèse, et d'un précurseur (ACC) ainsi qu'un relargueur (éthéphon) de l'éthylène ont été observés. Le tableau ci-dessous résume les meilleurs résultats obtenus.

Tableau 21 : Résumé des effets des différents facteurs stimulateurs étudiés durant cette thèse sur la croissance des bulbilles et sur la stimulation de la biosynthèse de galanthamine (G) et de lycorine (L).

Facteur Stimulateur	Effet cytotoxique	[G] mg/g MS	[L] mg/g MS	Stimulation par rapport aux témoins
4'-*O*-MN	Non	0,8	0,54	x 1,75
	Non	0,6	1,13	G : x 1,5 L : x 2,26
MeJa	Oui	0,1	0,6	L : x 3
	Oui	0,4	1,1	G : x 4 L : x 1,72
AS	Oui	-	1	L : x 5
	Non	0,8	1,53	G : x 8 L : x 2,4
ACC	Non	0,1	0,3	L : x 1,2
	Non	0,6	0,54	L : x 3,6
Etéphon	Non	-	0,46	L : x 1,84
	Non	-	-	-

Finalement, dans le sixième chapitre, il est décrit l'isolement d'endophytes bactériens ont été isolés à partir des bulbes et bulbilles de 3 espèces d'Amaryllidaceae (*L. aestivum*, *Narcissus pseudonarcissus* et *Galanthus elwesii*). Grâce aux techniques de la biologie moléculaire, et plus particulièrement au séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, les

endophyte bactériens ont été identifiés. Il s'agit de *Bacillus safensis* et *B. pumilus*. Un nouvel alcaloïde de masse moléculaire 1336,4717 mg/mol a été isolé à partir des cultures de ces bactéries en milieux liquide. La résolution de la structure de cet alcaloïde est en cours.

A l'issu de ce travail, un article a été publié dans le journal international Engineering in Life Sciences. Un autre article vient d'être soumis, et deux autres sont en cours de rédaction.

Les principales perspectives de recherche qui apparaissent à l'issue de cette thèse sont les suivantes :

- Chacun des facteurs exogènes ayant été testé séparément et agissant différemment sur la voie de biosynthèse des alcaloïdes d'Amaryllidaceae, il serait intéressant de les tester en combinaison afin de vérifier si des effets synergiques sont envisageables. Ainsi, les conditions optimales définies pour chacun des éliciteurs, constitueraient un point de départ pour cette étude.
- A l'issue des travaux réalisés dans le cadre de trois thèses de doctorat réalisées au sein du laboratoire dans l'unité, portant sur l'étude des alcaloïdes d'Amaryllidaceae, il s'avère indispensable de mieux connaître les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de ces alcaloïdes en vue de mieux maîtriser leur production.
- D'autre part, la structure de l'alcaloïde isolé à partir des cultures d'endohytes est d'ores et déjà en cours d'identification. Néanmoins, les activités biologiques de ce composé constituent une étude à part entière à envisager.
- Par ailleurs, l'isolement et l'identification d'autres endophytes chez les Amaryllidaceae pourraient être réalisés.
- Enfin, il serait intéressant d'évaluer la biotransformation de la MN deutérée ajoutée au milieu de culture liquide des bactéries endophytes. Celles-ci sont-elles capables de métaboliser le précurseur et de produire des alcaloïdes d'Amaryllidceae?

Partie 6 : Références Bibliographiques

1. Heinrich, M., Galanthamine from *Galanthus* and other Amaryllidaceae - Chemistry and biology based on traditional use. In *Akaloids*, Cordell, G. A., Ed. Elsevier: Evanston, Illinois, 2010; Vol. 68, pp 157-165.

2. Hochino, O., Amaryllidaceae Alkaloids. In *The Alkaloids, Chemistry and Biology*, Cordell, G. A., Ed. Academic Press: San Diego, CA, 1998; Vol. 51, pp 323-417.

3. Stanilova, M. I.; Molle, E. D.; Yanev, S., Galanthamine production by *Leucojum aestivum* cultures *in vitro*. In *The alkaloids*, Cordell, G. A., Ed. Elsevier: Evanston, Illinois, 2010; Vol. 68, pp 167-270.

4. Cedrón, J. C.; Del Arco-Aguilar, M.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, Ã. G., Chemistry and Biology of *Pancratium* Alkaloids. In *The Alkaloids*, Cordell, G. A., Ed. Elsevier: Evanston, Illinois, 2010; Vol. 68, pp 1-37.

5. Ieven, M.; Vean den Bergue, D. A.; Vlietinck, A., Plant antiviral agents. *Planta Med.* **1983,** 49, 109-114.

6. Fennell, C. W.; van Staden, J., *Crinum* species in traditional and modern medicine. *J. Ethnopharmacol.* **2001,** 78, 15-26.

7. Ghosal, S.; Saini, K. S.; Razdan, S., *Crinum* alkaloids: Their chemistry and biology. *Phytochemistry* **1985,** 24, 2141-2156.

8. Furusawa, E.; Furusawa, S.; Sokugawa, L., Therapeutic activity of pretazettine, standard drugs, and the combinations of intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in mice. *Chemotherapy* **1983,** 29, 294-302.

9. Szlávik, L.; Gyuris, A.; Minárovits, J.; Forgo, P.; Molnár, J.; Hohmann, J., Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med.* **2004,** 70, 871-873.

10. Evidente, A.; Andolfi, A.; Abou-Donia, A. H.; Touema, S. M.; Hammoda, H. M.; Shawky, E.; Motta, A., (-)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna*. *Phytochemistry* **2004,** 65, 2113-2118.

11. Verpoorte, R.; Contin, A.; Memelink, J., Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem. Rev.* **2002,** 1, 25.

12. El Tahchy, A. Étude de la voie de biosynthèse de la galanthamine chez *Leucojum aestivum* L. – Criblage phytochimique de quelques Amaryllidaceae. Université de Lorraine, Vandoeuvre-Lès-Nancy, 2010.

13. Singh A.; Desgagné-Penix, I., Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloids. *Plant Science Today* **2014,** 1, (3), 114-120.

14. Diop, M. F.; Hehn, A.; Ptak, A.; Chrétien, F.; Doerper, S.; Gontier, E.; Bourgaud, F.; Henry, M.; Chapleur, Y.; Laurain-Mattar, D., Hairy root and tissue cultures of *Leucojum aestivum* L.- Relationships to galanthamine content. *Phytochem. Rev.* **2007,** 6, 137-141.

15. Bourgaud, F.; Gravot, A.; Milesi, S.; Gontier, E., Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant Sci.* **2001,** 161, 839-851.

16. Smetanska, I., Production of secondary metabolites using plant cell cultures. In *Food Biotechnology*, Scheper, T., Ed. Springer: Verlag Berlin Heidelberg, 2008; Vol. 111, pp 187-228.

17. Laurain-Mattar, D., Production of alkaloids in plant cell and tissue cultures. In *Bioactive molecules and medicinal plants*, Ramawat K.G.; J.M., M., Eds. Springer: Verlag Berlin Heidelberg, 2008; pp 165-174.

18. Georgiev, V.; Berkov, S.; Georgiev, M.; Burrus, M.; Codina, C.; Bastida, J.; Ilieva, M.; Pavlov, A., Optimized nutrient medium for galanthamine production in *Leucojum aestivum* L. *in vitro* shoot system. *Z. Naturforsch* **2009,** 64c, 219-224.

19. El Tahchy, A.; Bordage, S.; Ptak, A.; Dupire, F.; Barre, E.; Guillou, C.; Henry, M.; Chapleur, Y.; Laurain-Mattar, D., Effects of sucrose and plant growth regulators on acetylcholinesterase inhibitory activity of alkaloids accumulated in shoot cultures of Amaryllidaceae. *Plant Cell Tiss. Organ Cutl.* 106, 381-390.

20. Schumann, A.; Torras-Claveria, L.; Berkov, S.; Claus, D.; Gerth, A.; Bastida, J.; Codina, C., Elicitation of galanthamine production by *Leucojum aestivum* shoots grown in temporary immersion system. *Biotechnol. Prog.* **2013,** 29, 311-318.

21. El Tahchy, A.; Ptak, A.; Boisbrun, M.; Barre, E.; Guillou, C.; Dupire, F.; Chrétien, F.; Henry, M.; Chapleur, Y.; Laurain-Mattar, D., Kinetic study of the rearragment of deuterium-labeled 4'-*O*-methylnorbelladine in *Leucojum aestivum* shoot cultures by mass spectrometry. Influence of precursor feeding on Amarylladaceae alkaloid accumulation. *J. Nat. Prod.* **2011,** 74, 2356-2361.

22. Muzzamal, H.; Sarwar, R.; Sajid, I.; Hasnain, S., Isolation, identification and screening of endophytic bacteria antagonistic to biofilm formers. *Pakistan J. Zool.* **2012,** 44, 249-257.

23. Demain, A. L.; Sanchez, S., Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot.* **2009,** 62, 5-16.

24. Jin, Z., Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **2013,** 30, 849-868.

25. Botineau, M., *Botanique systémique et appliquée des plantes à fleurs*. Lavoisier: 2010.

26. Website
actaplantarum.org. (21-01-2015),

27. Website
dicoverlife.org. (21-01-2015),

28. Website
en.wikipedia.org. (21-01-2015),

29. Website
commons.wikimedia.org. (21-01-2015),

30. Website
pacificbulbsociety.org. (25-01-2015),

31. Kilgore, M. B.; Augustin, M. M.; Starks, C. M.; O'Neil-Johnson, M.; May, G. D.; Crow, J. C.; Kutchan, T. M., Cloning and Characterization of a Norbelladine 4'-*O*-Methyltransferase Involved in the Biosynthesis of the Alzheimer's Drug Galanthamine in *Narcissus* sp. *aff. pseudonarcissus*. *Plos one* **2014,** 9, 1-11.

32. Barton, D. H. R.; Cohen, T., Festschrift Arthur Stoll. In *Festschrift Arthur StoU*, Stoll, A., Ed. Birkhäuser, Basel, 1957; p 117.

33. Wightman, R. H.; Stauton, J.; Battersby, A. R.; Hanson, K. R., Studies of enzyme-mediated reactions. Part I. Syntheses of deuterium-or tritium-labelled (3S)- and (3R)-phenylalanines: Stereochemical cause of the elimination catalysed by L-phenylalanine ammonia-lyase. *J. Chem. Soc.-Perkin Trans.* **1972**, I2355-2364.

34. Bastida, J.; Berkov, S.; Torras, L.; Belén Pigni, N.; de Andrade, J. P.; Martínez, V.; Codina, C.; Viladomat, F., Chemical and Biological Aspects of Amaryllidaceae Alkaloids. In *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*, Muñoz-Torrero, D., Ed. Transworld Research Network: Barcelona, Spain, 2011; pp 66-100.

35. Jeffs, P. W., In *The Alkaloids*, Manske, R. H. F.; Rodrigo, R. G. A., Eds. Academic Press: New York, 1981; Vol. 19, p 1.

36. Eichhorn, J.; Takada, T.; Kita, Y.; Zenk, M. H., Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine. *Phytochemistry* **1998,** 49, 1037-1047.

37. Kirby, G. W.; Tiwari, H. P., Phenol oxidation and biosynthesis. Part IX. The biosynthesis of norpluviine and galanthine. *J. Chem. Soc.-C* **1966**, 676-682.

38. Bruce, I. T.; Kirby, G. W., Stereochemistry of protonation and hydroxylation in the biosynthesis of norpluviine and lycorine. *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.* **1968**, 207-208.

39. Schmeda-Hirschmann, G.; Rodrigez, J. A.; Loyola, J. I.; Astudillo, L.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C., Activity of Amaryllidaceae alkaloids on the blood pressure of normotensive rats. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **2000,** 6, 309-312.

40. Bartus, R. T.; Beer, P.; Lippa, A. S., The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **1982,** 217, 408-414.

41. Holzgrabe, U.; Kapková, P.; Alptüzün, V.; Scheiber, J.; Kugelmann, E., Targeting acetylcholinesterase to treat neurodegeneration. *Expert Opin. Ther. Targets* **2007,** 11, 161-179.

42. Sramek, J. J.; Frackiewicz, E. J.; Cutler, N. R., Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine. *Expert Opin. Inv. Drug* **2000,** 9, 2393-2402.

43. Greenblatt, H. M.; Kriger, G.; Lewis, T.; Silman, I.; Sussman, J. L., Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution. *FEBS Lett.* **1999,** 463, 321-326.

44. Greenblatt, H. M.; Guillou, C.; Guenard, D.; Argaman, A.; Botti, S.; Badet, B.; Thal, C.; Silman, I.; Sussman, J. L., The complex of a bivalent derivative of galanthamine with torpedo acetylcholinesterase displays drastic deformation of the active-site gorge: Implications for stucture-based drug design. *J. Am. Chem. Soc.* **2004,** 126, 15405-15411.

45. Arrigoni, O.; Calabrese, G.; de Gara, L.; Bitonti, M. B.; Liso, R., Correlation between changes in cell ascorbate and growth of *Lupinus albus* seedlings. *J. Plant Physiol.* **1997,** 150, 302-308.

46. Arrigoni, O., Ascorbate system in plant development. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1994,** 26, 407-419.

47. Onofri, S.; Poerio, E.; Serangeli, P.; Tosi, S.; Garuccio, I.; Arrigoni, O., Influence of L-galactonic acid gamma-lactone on ascorbate production in some yeasts. *Antonie Leeuwenhoek* **1997,** 71, 277-280.

48. Ghosal, S.; Shanthy, A.; Kumar, A.; Kumar, Y., Palmilycorine and lycoriside: Acyloxy and acylglucosyloxy alkaloids from *Crinum asiaticum*. *Phytochemistry* **1985,** 24, 2703-2706.

49. Likhitwitayawuid, K.; Angerhofer, C. K.; Chai, H.; Pezzuto, J. M.; Cordell, G. A.; Ruangrungsi, N., Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. *J. Nat. Prod.* **1993,** 56, 1331-1338.

50. Lin, L. Z.; Hu, S. F.; Chai, H. B.; Pengsuparp, T.; Pezzuto, J. M.; Cordell, G. A.; Ruangrungsi, N., Lycorine alkaloids from *Hymenocallis littoralis*. *Phytochemistry* **1995,** 40, 1295-1298.

51. Min, B. S.; Gao, J. J.; Nakamura, N.; Kim, Y. H.; Hattori, M., Cytotoxic alkaloids and a flavan from the bulbs of *Crinum asiaticum* var. *japonicum*. *Chem. Pharm. Bull.* **2001,** 49, 1217-1219.

52. Griffin, C.; Sharda, N.; Sood, D.; Nair, J. J.; McNulty, J.; Pandey, S., Selective cytotoxicity of pancratistatin-related natural Amaryllidaceae alkaloids: Evaluation of the activity of two new compounds. *Cancer Cell. Int.* **2007,** 7, 7-10.

53. Li, S. Y.; Chen, C.; Zhang, H. Q.; Guo, H. Y.; Wang, H.; Wang, L.; Zhang, X.; Hua, S. N.; Yu, J.; Xiao, P. G.; Li, R. S.; Tan, X., Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. *Antiviral Res.* **2005,** 67, 18-23.

54. Renard-Nozaki, J.; Kim, T.; Imakura, Y.; Kihara, M.; Kobayashi, S., Effect of alkaloids isolated from Amaryllidaceae on *Herpex simplex* virus. *Res. Virol.* **1989,** 140, 115-128.

55. Osorio, E. J.; Robledo, S. M.; Bastida, J., Alkaloids with antiprotozoal activity. In *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Elsevier Inc.: Amsterdam, 2008; pp 113-190.

56. Çitoglu, G.; Tanker, M.; Gümüsel, B., Antiinflammatory effects of lycorine and haemanthidine. *Phytother. Res.* **1998,** 12, 205-206.

57. Evidente, A.; Kireev, A. S.; Jenkis, A. R.; Romero, A. E.; Steelant, W. F. A.; van Slambrouck, S.; Kornienko, A., Biological evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: Discovery of novel leads for anticancer drug design. *Planta Med.* **2009,** 75, 501-507.

58. Weniger, B.; Italiano, L.; Beck, J. P.; Bastida, J.; Bergoñon, S.; Codina, C.; Lobstein, A.; Anton, R., Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med.* **1995,** 61, 77-79.

59. Antoun, M. D.; Mendoza, N. T.; Rios, Y. R., Cytotoxicity of *Hymenocallis expansa* alkaloids. *J. Nat. Prod.* **1993,** 56, 1423-1425.

60. Schmeda-Hirschmann, G.; Astudillo, L.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C., DNA binding activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Bol. Soc. Chil. Quím.* **2000,** 45, 515-518.

61. Miyasaka, K.; Hiramatsu, Y., Pharmacological studies of lycorenine, an alkaloid of *Lycoris radiata* Herb.: II. Effects of blood pressure in rats and dogs and the mechanism of tachyphylaxis to the vasodepressor action of lycorenine in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* **1980,** 30, 655-664.

62. McNulty, J.; Nair, J. J.; Codina, C.; Bastida, J.; Pandey, S.; Gerasimoff, J.; Griffin, C., Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry* **2007,** 68, 1068-1074.

63. Adesanya, S. A.; Olugbade, T. A.; Odebiyi, O. O.; Aladesanmi, J. A., Antibacterial alkaloids in *Crinum jagus*. *Int. J. Pharmacogn.* **1992,** 30, 303-307.

64. Furusawa, E.; Furusawa, S.; Lee, J. Y. B.; Patanavanich, S., Therapeutic activity of pretazettine, a *Narcissus* alkaloid on Rauscher leukemia: Comparison with tazettine and sterptonigrin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1976,** 152, 186-197.

65. McLachlan, A.; Kekre, N.; McNulty, J.; Pandey, S., Pancratistatin: A natural anti-cancer compound that targets mitochondria specifically in cancer cells to induce apoptosis. *Apoptosis* **2005,** 10, 619-630.

66. Stoyanova, M.; Georgieva, L.; Petrov, N.; Badjakov, I.; Bogatzevska, N., Bacterial bulb decay of Summer Snowflake/ *Leucojum aestivum* L./. *Agriculture and Environmental Biotechnology* **2012,** 26, 3338-3344.

67. Yang, Y. L.; Liu, Z. Y.; Cai, L.; Hyde, K. D.; Yu, Z. N.; McKenzie, E. H. C., *Colletotrichum* anthracnose of Amaryllidaceae. *Fungal Diversity* **2009,** 39, 123-146.

68. Verpoorte, R.; van der Heijden, R.; ten Hoopen, H. J. G.; Memelink, J., Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnol. Lett.* **1999,** 21, 467-479.

69. Takos, A. M.; Rook, F., Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medicinal use. *Int. J. Mol. Sci.* **2013,** 14, 11713-11741.

70. Czollner, L. F. W.; Kuenburg, B.; Hedenig, U.; Froechlich, J.; Jordis, U., New kilogram-synthesis of the antialzheimer's drug (-)-galanthamine. *Tetrahedron Lett.* **1998,** 39, 2087-2088.

71. Ferri, C. P.; Brayne, C., Global prevalence of dimentia: A delphi consensus study. *Lancet* **2005,** 366, 2112-2117.

72. Zryd, J.P., *Cultures de cellules, tissus et organes végétaux*. Presses Polytechniques Romandes: Lausanne, 1988.

73. Lindsay, K.; Jones, M. G. K., *Plant Biotechnology in Agriculture*. Open University Press: Milton Keynes, 1989.

74. Constabel, F.; Kurz, W. G. W., Cell differentiation and secondary metabolite production. In *Morphogenesis in Plant Cultures*, Woong-Young Soh, S. S. B., Ed. Springer Science: Netherlands, 1999; pp 463-501.

75. Stefanov, Z., Ecobiological and Phytochemical Investigations of Natural Populations and Introduced Origins of Summer Snowflake (*Leucojum aestivum* L.) in Bulgaria. Sofia, Bulgaria, 1990.

76. Mulabagal, V.; Tsay, H. S., Plant cell cultures - An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. Int. J. *Appl. Sci. Eng.* **2004,** 2, 29-48.

77. Murashige, T.; Skoog, F., A revised medium for rapid growth bioassays with tobacco culture. *Physiol. Plant* **1962,** 15, 473-497.

78. El Tahchy, A.; Bordage, S.; Ptak, A.; Dupire, F.; Barre, E.; Guillou, C.; Henry, M.; Chapleur, Y.; Laurain-Mattar, D., Effects of sucrose and plant growth regulators on acetylcholinesterase inhibitory activity of alkaloids accumulated in shoot cultures of Amaryllidaceae. *Plant cell Tiss. Organ Cult.* **2011,**106, 381-390.

79. Merillon, J. M.; Rideau, M.; Cheneiux, J. C., Influence of sucrose on levels of ajmalicine, serpentine and tryptamine in *Catharanthus roseus* cells *in vitro*. *Planta Med.* **1984,** 50, 497-502.

80. Selles, M.; Bergonon, S.; Viladomat, F.; Bastida, J.; Codina, C., Effect of sucrose on growth and galanthamine production in shoot-clump cultures

of *Narcissus confusus* in liquid-shake medium. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **1997,** 49, 129-138.

81. Berkov, S.; Ivanov, I.; Georgiev, V.; Codina, C.; Pavlov, A., Galanthamine biosynthesis in plant *in vitro* systems. *Eng. Life Sci.* **2014,** 14, 643-650.

82. Ptak, A.; El Tahchy, A.; Wyzgolik, G.; Henry, M.; Laurain-Mattar, D., Effects of ethylene on somatic embryogenesis and galanthamine content in *Leucojum aestivum* L. cultures. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **2010,** 102, 61-67.

83. de Klerk, G. J.; van der Krieken, W.; de Jong, J. C., The formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **1999,** 35, 189-199.

84. Sage, O. D.; Lynn, J.; Hammat, N., Somatic embryogenesis in *Narcissus* cvs. Golden harvest and St Kerverne. *Plant Sci.* **2000,** 150, 209-216.

85. Diop, M. F.; Ptak, A.; Chrétien, F.; Henry, M.; Chapleur, Y.; Laurain-Mattar, D., Galanthamine content of bulbs and in vitro cultures of *Leucojum aestivum* L. *Nat. Prod. Comm.* **2006,** 6, 475-479.

86. Ptak, A.; Cierniak, O., Regeneration of summer snowflake (*Leucojum aestivum* L.) in *in vitro* cultures. *Biotechnologia* **2003,** 4, 239-245.

87. Ptak, A.; El Tahchy, A.; Dupire, F.; Boisbrun, M.; Henry, M.; Chapleur, Y.; Moś, M.; Laurain-Mattar, D., LCMS and GCMS for the screening of alkaloids in natural and *in vitro* extracts of *Leucojum aestivum*. *J. Nat. Prod.* **2009,** 72, 142-147.

88. Ptak, A.; El Tahchy, A.; Skrzypek, E.; Wójtowicz, T.; Laurain-Mattar, D., Influence of auxins on somatic embryogenesis and alkaloid accumulation in *Leucojum aestivum* callus. *Cent. Eur. J. Biol.* **2013,** 8, 591-599.

89. Ptak, A.; Simlat, M.; Kwiecień, M.; Laurain-Mattar, D., *Leucojum aestivum* plants propagated in *in vitro* bioreactor culture and on solid media containing cytokinins. *Eng. Life Sci.* 13, 261-270.

90. Georgiev, V.; Ivanov, I.; Berkov, S.; Pavlov, A., Alkaloids biosynthesis by *Pancratium maritimum* L. shoots in liquid culture. *Acta Physiol. Plant.* 33, 927-933.

91. Colque, R.; Viladomat, F.; Bastida, J.; Codina, C., Improved production of galanthamine and related alkaloids by methyljasmonate in *Narcissus confusus* shoot-clumps. *Planta Med.* **2004,** 70, 1180-1188.

92. Mu, H. M.; Wang, R.; Li, X. D.; Jiang, Y. M.; Wang, C. Y.; Quan, J. P.; Peng, F.; Xia, B., Effect of abiotic and biotic elicitors on growth and alkaloid accumulation of *Lycoris chinensis* seedlings. *Z. Naturforsch C.* **2009,** 64, 541-550.

93. Zhao, J.; Davis, L. C.; Verpoorte, R., Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* **2005,** 23, 283-333.

94. Ivanov, I.; Georgiev, V.; Pavlov, A., Elicitation of galanthamine biosynthesis by *Leucojum aestivum* liquid shoot cultures. *J. Plant Physiol.* **2013,** 170, 1122-1129.

95. El Tahchy, A.; Boisbrun, M.; Ptak, A.; Dupire, F.; Chrétien, F.; Henry, M.; Chapleur, Y.; Laurain-Mattar, D., New method for the study of Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis using biotransformation of deuterium-labeled precursor in tissue cultures. *Acta Biochim. Pol.* **2010,** 57, 75-82.

96. Barton, D. H. R.; Kirby, G. W.; Taylor, J. B.; Thomas, G. M., Phenol oxidation and biosynthesis. Part IV. The biogenesis of Amaryllidaceae alkaloids. *J. Chem. Soc.* **1963**, 4545-4558.

97. Bergoñon, S.; Codina, C.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Melé, E., Galanthamine production in shoot-clumps culture of *Narcissus confusus* in liquid-shake medium. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **1996,** 45, 191-199.

98. Beaudoin-Eagan, L. D.; Thorpe, T. A., Shikimate pathway activity during shoot initiation in tobacco callus cultures. *Plant Physiol.* **1983,** 73, 228-232.

99. Berkov, S.; Pavlov, A.; Georgiev, V.; Bastida, J.; Burrus, M.; Ilieva, M.; Codina, C., Alkaloid synthesis and accumulation in *Leucojum aestivum* i*n vitro* cultures. *Nat. Prod. Commun.* **2009,** 4, 1-6.

100. Georgiev, V.; Schumann, A.; Pavlov, A.; Thomas, B., Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Eng. Life Sci.* **2014,** 14, 607-621.

101. Debnath, S., Bioreactors and molecular analysis in berry crop micropropagation - A review. *Can. J. Plant Sci.* **2011,** 91, 147-157.

102. Yassen, M.; Ahmad, T.; Sablok, G.; Standardi, A.; Hafiz, I. A., Review: Role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. *Mol. Bio. Rep.* **2013,** 40, 2837-2849.

103. Afreen, F., Temporary immersion bioreactor. In *Plant tissue culture engineering*, Ibaraki, Y., Ed. Springer: The Netherlands, 2006; pp 187-201.

104. Weathers, P.; Liu, C.; Towler, M.; Wyslouzil, B., Mist reactors: Principles, comparison of various systems, and case studies. *Electron. J. Integr. Biosci.* **2008,** 3, 29-37.

105. Weathers, P.; Towler, M.; Xu, J., Bench to batch: Advances in plant cell culture for producing useful products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010,** 85, 1339-1351.

106. Georgiev, V.; Bley, T.; Pavlov, A., Bioreactors for the cultivation of red beet hairy roots. In *Red beet biotechnology*, Neelwarne, B., Ed. Springer: New York, 2012; pp 251-281.

107. Georgiev, V.; Marchev, A.; Berkov, S.; Pavlov, A., Plant *in vitro* systems as sources of tropane alkaloids. In *Natural products*, Ramawat K.G., M. J.M., Ed. Springer: Berlin, Heidelberg, Germany, 2013; pp 173-211.

108. Cuello, J. L.; Yue, L. C., Ebb-and-Flow bioreactor regime and electrical elicitation: Eovel strategies for hairy root biochemical production. *Electron. J. Integr. Biosci.* **2008,** 3, 45-56.

109. Georgiev, M.; Weber, J., Bioreactors for plant cells: Hardware configuration and internal optimization as tools for wider commercialization. *Biotechnol. Lett.* **2014,** 36, 1359-1367.

110. Steingroewer, J.; Bley, T.; Georgiev, V.; Ivanov, I.; Lenk, F.; Marchev, A.; Pavlov, A., Bioprocessing of differentiated plant *in vitro* systems. *Eng. Life Sci.* **2013,** 13, 26-38.

111. Albarrán, J.; Bertrand, B.; Lartaud, M.; Etienne, H., Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **2005,** 81, 27-36.

112. Curtis, W.; Tuerk, A., Oxygen transport in plant tissue culture systems. In *Plant tissue culture engineering*, Gupta, S. D., Ibaraki, Y., Ed. Springer: The Netherlands, 2006; pp 173-186.

113. Georgiev, V.; Ivanov, I.; Berkov, S.; Pavlov, A., Temporary immersion systems for Amaryllidaceae alkaloids biosynthesis by *Pancratium maritimum* L. shoot culture. *J. Plant Biovhem. Biotechnol.* **2013,** 23, 389-398.

114. Ivanov, I.; Georgiev, V.; Berkov, S.; Pavlov, A., Alkaloid patterns in *Leucojum aestivum* shoot culture cultivated at temporary immersion conditions. *J. Plant Physiol.* 169, 206-211.

115. Ivanov, I.; Georgiev, V.; Georgiev, M.; Ilieva, M.; Pavlov, A., Galanthamine and related alkaloids production by *Leucojum aestivum* L. shoot culture using a temporary immersion technology. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 163, 268-277.

116. Ptak, A.; Gądek, J., Micropropagation of *Leucojum aestivum* L. in bioreactor RITA. *Biotechnologia* **2010,** 2, 165-171.

117. Joseph, B.; Priya, R. M., Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical effects: A review. *Am. J. Biochem. Mol. Biol.* **2011,** 1, 291-309.

118. Strobel, G. A.; Daisy, B., Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003,** 67, 491-502.

119. Leslie Gunatilaka, A. A., Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity, and implecations of their occurence. *J. Nat. Prod.* **2006,** 69, 509-526.

120. Verma, V.; Sudan, P.; Kour, A., Endophytes: A novel source for bioactive molecules. *Proc. Indian natn. Acad.* **2008,** 74, 73-86.

121. Wilson, D., Endophyte - The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* **1995,** 73, 274-276.

122. Sturz, A. V.; Christie, B. R.; Nowak, J., Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit. Rev. Plant Sci.* **2000,** 19, 1e30.

123. Compant, S.; Clement, C.; Sessitsch, A., Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.* **2010,** 42, 669-678.

124. Brader, G. N.; Compant, S. P.; Mitter, B.; Trognitz, F.; Sessitsch, A., Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opin. Biotechnol.* 27, 30-37.

125. Raaijmakers, J. M.; de Bruijn, I.; Nybroe, O.; Ongena, M., Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* **2010,** 34, 1037-1062.

126. Lopez, M. A.; Bannenberg, G.; Castresana, C., Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2008,** 11, 420-427.

127. Zabetakis, I., Enhancement of flavour biosynthesis from strawberry (*Fragaria* x *ananassa*) callus cultures by *Methylobacterium* species. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* **1997,** 50, 179-218.

128. Ryan, R. P.; Germaine, K.; Franki, A.; Ryan, D. J.; Nowling, D. N., Bacterial endophytes: recent development and applications. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007,** 278, 1-9.

129. Guan, S.H.; Sattler, I.; Lin, W.H.; Guo, D.A.; Grabley, S., p-Aminoacetophenonic acids produced by a mangrove endophyte: *Streptomyces griseus* subsp. *J. Nat. Prod.* **2005,** 68, 1198-1200.

130. Castillo, A. T.; Strobel, G. A.; Ford, E. J.; Hess, W. M.; Porter, H.; Jensen, J. B.; Albert, H.; Robinson, R.; Condron, M. A.; Teplow, D. B.; Sevens, D.; Yaver, D., Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. *Microbiology* **2002,** 148, 2675-2685.

131. Strobel, G. A.; Ii, J. Y.; Sugawara, F.; Koshino, H.; Harper, J.; Hess, W. M., Oocydin A, a chlorinated macrcyclic lactone with potent anti-oomycete activity from *Serratia marcescens*. *Microbiology* **1999,** 145, 3557-3564.

132. Miller, R. V.; Miller, C. M.; Garton-Kinney, D.; Redgrave, B.; Sears, J.; Condron, M.; Teplow, D.; Strobel, G. A., Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava*. *J. Appl. Micobiol.* **1998,** 84, 937-944.

133. Strobel, G. A.; Miller, R. V.; Miller, C. M.; Condron, M.; Teplow, D.; Hess, W. M., Cryptocandin, a potent antimycotic from endophytic fungus *Creptosporiopsis cf. quercina*. *Microbiology* **1999,** 145, 1919-1926.

134. Harper, J.; Ford, E. J.; Strobel, G. A.; Arif, A.; Grant, D. M.; Porco, J.; Tomer, D. P.; Oneill, K., Pestacin: a 1,3,-dihydro isobenufuran from *Pestalotipsis microspora* possessing antioxydant and antimycotic activities. *Tetrahedron* **2003,** 59, 2471-2476.

135. Li, J. Y.; Harper, J. K.; Grant, D. M.; Tombe, B. O.; Bashyal, B.; Hess, W. M.; Strobel, G. A., Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. *Phytochemistry* **2001,** 56, 463-468.

136. Zou, W. X.; Meng, J. C.; Chen, G. X.; Shi, G. X.; Zhang, T. Y.; Tan, R. X., Metabolites from *Colletotrichum gloesporioides*, an endophyte fungus in *Artemisia mongolica*. *J. Nat. Prod.* **2000,** 63, 1529-1530.

137. Brady, S. F.; Clardy, J., CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. *J. Nat. Prod.* **2000,** 63, 1447-1448.

138. Ezra, D.; Castillo, U. F.; Strobel, G. A.; Hess, W. M.; Porter, H.; Jensen, J. B.; Condron, M. A.; Teplow, D. B.; Dears, J.; Maranta, M.; Hunter, M.; Weber, B.; Yaver, D., Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces sp.* (MSU-2110) endophytic on *Monstera sp.* *Microbiology* **2004,** 150, 785-793.

139. Weber, D.; Gorzalczany, S.; Martino, V.; Acevedo, C.; Sterner, O.; Anke, T., Metabolites from endophytes of the medicinal plant *Erythrina cristagalli*. *Z. Naturforsch* **2005,** 60 c, 467-477.

140. Daisy, B. H.; Strobel, G. A.; Castillo, U.; Ezra, D.; Sears, J.; Weaver, D. K.; Runyon, J. B., Naphtalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology* **2002,** 148, 3737-3741.

141. Sun, L.; Lu, Z.; Bie, X.; Lu, F.; Yang, S., Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *World J. Microb. Biot.* **2006,** 22, 1259-1266.

142. Liu, J. Y.; Song, Y. C.; Zhang, Z.; Wang, L.; Guo, Z. J.; Zou, W. X.; Tan, R. X., *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. *J. Biotechnol.* **2004,** 114, 279-287.

143. Stierle, A.; Strobel, G. A.; Stierle, D., Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific Yew. *Science* **1993,** 260, 214-216.

144. Strobel, G. A.; Daisy, B.; Castillo, U.; Harper, J., Natural products from endophytic micoorganisms. *J. Nat. Prod.* **2004,** 67, 257-268.

145. Lee, J. C.; Strobel, G. A.; Lobkovsky, E.; Clardy, J., Torreyanic acid: A selectively cytotoxic quinine dimmer from the endohytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. *J. Org. Chem.* **1996,** 61, 3232-3233.

146. Kumar, A.; Patil, D.; Rajamohanan, P. R.; Ahmad, A., Isolation, purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. *Plos One* **2013**. DOI: 10.1371/journal.pone.0071805.

147. Li, J. Y.; Strobel, G. A.; Sidhu, R.; Hess, W. M.; Ford, E., Endophytic taxol producing fungi from Bald Cypress *Taxodium distichum*. *Microbiology* **1996,** 142, 2223-2226.

148. Tan, R. X.; Zou, W. X., Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **2001,** 18, 448-459.

149. Kohut, E.; Ordogh, M.; Jbmbor-Benczr, E.; Mathe, A., Results with the establishment of *in vitro* culture of *Leucojum aestivum*. *Int. J. Hortic. Sci.* **2007,** 13, 67.

150. Szewczyk, J.; Lewin, A. H.; Carroll, F. I., An improved synthesis of galanthamine. *J. Heterocyclic Chem.* **1988,** 25, 1809-1811.

151. Website
http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm073384.pdf (24/03/2015),

152. Website
csen.free.fr. (30-01-2014),

153. Francis Rouessac; Rouessac, A., *Analyse chimique*. Paris, 2009.

154. Website
atechimie.univ-lille1.fr. (24/03/2015),

155. MRABET, K. E. Développement d'une méthode d'analyse de résidus de pesticides par dilution isotopique associée à la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem dans les matrices céréalières après extraction en solvant chaud pressurisé Université Pierre et Marie Curie, Paris, 2007.

156. Kreh, M.; Matusch, R.; Witte, L., Capillary gas chromatography-mass spectrometry of Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry* **1995,** 38, 773-776.

157. Website
fr.wikipedia.org. (25-03-2015),

158. Berkov, S.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C., Development and validation of a GC-MS method for rapid determination of galanthamine in *Leucojum aestivum* and *Narcissus ssp.:* A metabolomic approach. *Talanta* **2011,** 83, 1455-1465.

159. Mitra, S.; Brukh, R., Sample preparation: An analytical perspective. In *Sample preperation techniques in Analytical chemistry,* Mitra, S., Ed. Wiley-Intersciences: Hoboken, New Jersey, 2003; Vol. 162, pp 1-35.

160. Website
interchim.eu.

161. López, S.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C., Solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography of the five major alkaloids in *Narcissus* confusus. *Phytochem. Analysis* 2002, 13, 311-315.

162. Mroczek, T.; Gowniak, K.; Kowalska, J., Solid-liquid extraction and cation-exchange solid-phase extraction using a mixed-mode polymeric sorbent of *Datura* and related alkaloids. *J. Chromatogr. A* 2006, 1107, 9-18.

163. Moreira, L. M.; Lima, A.; Soares, R. R. S.; Batistela, V. R.; Gerola, A. P.; Hioka, N.; Bonacin, J. A.; Severino, D.; Baptista, M. S.; de Hora Machado, A. E.; Rodrigues, R. M.; Codognoto, L.; de Oliveira, H. P. M., Metallochlorophylls of magnesium, copper and zinc: Evaluation of the influence of the first coordination sphere on their solvatochromism and aggregation properties. *J. Braz. Chem. Soc.* 2009, 20, 1653-1658.

164. Mroczek, T., Highly efficient, selective and sensitive molecular screening of acetylcholinesterase inhibitors of natural origin by solid-phase extraction-liquid chromatography/electrospray ionisation-octopole-orthogonal acceleration time-of-flight-mass spectrometry and novel thin-layer chromatography-based bioautography. *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 2519-2528.

165. Heinrich, M.; Lee Teoh, H., Galanthamine from snowdrop - The development of a modern drug against Alzheimer's diseasefrom local caucasian knowledge. *J. Ethnopharmacol.* 2004, 92, 147-162.

166. Pavlov, A.; Berkov, S.; Courot, E.; Gocheva, T.; Tuneva, D.; Pandova, B.; Georgiev, M.; Georgiev, V.; Yanev, S.; Burrus, M.; Ilieva, M., Galanthamine production by *Leucojum aestivum in vitro* systems. *Process Biochem.* 2007, 42, 734-739.

167. Zhao, J.; Zhu, W. H.; Hu, Q.; He, X. W., Imroved indole alkaloid production in *Cataranthus roseus* suspension cell culture by various chemicals. *Biotechnol . Lett.* 2000, 22, 1221-1226.

168. Trujillo-Villanueva, K.; Rubio-Pina, J.; Monforte-Gonzalez, M.; Vazquez-Flota, F., *Fusarium oxysporum* homogenates and jasmonate induce limited sanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* cell cultures. *Biotechnol. Lett.* 2010, 32, 1005-1009.

169. Vazquez-Flota, F.; Hernandez-Dominguez, E.; Miranda-Ham, M.; Monforte-Gonzalez, M., A differential response to chemical elicitors in *Catharanthus roseus in vitro* cultures. *Biotechnol. Lett.* 2009, 31, 591-595.

170. Kai, G.; Yang, S.; Zhang, Y.; Luo, X.; Fu, X.; Zhang, A.; Xiao, J., Effects of different elicitors on yield of tropane alkaloids in hairy roots of *Anisodus acutangulus*. *Mol. Bio. Rep.* **2012,** 39, 1721-1729.

171. Abd El-Mawla, A., Effect of certain elicitors on production of pyrrolizidine alkaloids in hairy root cultures of *Echium rauwolfii*. *Pharmazie* **2010,** 65, 224-226.

172. Hatanaka, T.; Sawabe, E.; Azuma, T.; Uchida, N.; Yasuda, T., The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaves discs of *Coffea canephora*. *Plant Sci.* **1995,** 107, 199-204.

173. Nissen, P., Stimulation of somatic embryogenesis in carrot by ethylene: Effect of modulators of ethylene biosynthesis and action. *Physiol. Plant* **1994,** 92, 397-403.

174. Biddington, N. L., The influences of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regul.* **1992,** 11, 173-187.

175. Duncan, D. R.; Widholm, J. M., Improved plant regeneration from maize callus cultures using $AgNO_3$. *Plant Physiol.* **1987,** 83, suppl. 35:208.

176. Chen, J. T.; Chang, W. C., 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic amid enhanced direct somatic embryogenesis from *Oncidium* leaf cultures. *Biol. Plant.* **2003,** 46, 455-458.

177. Yahia, A.; Kevers, C.; Gaspar, T.; Chénieux, J. C.; Rideau, M.; Crèche, J., Cytokinins and ethylene stimulate indole alkaloids accumulation in cell suspension cultures of *Catharantus roseus* by two distinct mechanisms. *Plant Sci.* **1998,** 133, 9-15.

178. Bae, K. H.; Choi, Y. E.; Shin, C. G.; Kim, Y. S., Enhanced ginsenoside productivity by combination of etephon and methyljasmonate in ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) adventitious root cultures. *Biotechnol. Lett.* **2006,** 28, 1163-1166.

179. Goyal, S.; K.G., R., Ethrel treatment enhanced isoflavonoides accumulation in cell suspension cultures of *Pueraria tuberose*, a woody legume. *Acta Physiol. Plant.* **2008,** 30, 849-853.

180. Tabata, H., Paclitaxel production by plant cell-culture technology. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2004,** 7, 1-23.

181. Touno, K.; Tamaoka, J.; Ohashi, Y.; Shimomura, K., Ethylene induced shikonin biosynthesis in shoot culture of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant. Physiol. Biochem.* **2005,** 43, 101-105.

182. Woese, C. R., Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **1987,** 51, 222-270.

183. Chakravorty, S.; Helb, D.; Burday, M.; Connell, N.; Allan, D., A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods* **2007,** 69, 330-339.

184. Weisburg, W. G.; Barns, S. M.; Pelletier, D. A.; Lane, D. J., 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **1991,** 173, 697-703.

185. Wilhelm, E.; Arthofer, W.; Schafleitner, R.; Krebs, B., *Bacillus subtilis* an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*) as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **1998,** 52, 105-108.

186. Shweta, S.; Hima Bindu, J.; Raghu, J.; Manjunatha, B. L.; Mohana Kumara, P.; Ravikanth, G.; Nataraja, K. N.; Ganeshaiah, K. N.; Shaanker, R., Isolation of endophytic bacteria producing the anti-cancer alkaloid camptothecine from *Miquelia dentata* Bedd. (Icacinaceae). *Phytomedicine* **2013,** 913-917.

187. Yu, H.; Zhang, L.; Li, L.; Zheng, C.; Guo, L.; Li, W., Sun, P. Qin, L., Recent developments and furure prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiol. Res.* **2010,** 165, 437-449.

Partie 7 : Annexes

Annexe 1 : Composition du milieu de culture MS

1 Préparation de la solution-mère de macroéléments

Pour 100 mL de solution-mère de macroéléments (chauffer pour dissoudre) :

Composés	Quantité en g
NH_4NO_3	16,5
KNO_3	19
$MgSO_4$, 7 H_20	3,7
KH_2PO_4	1,7

2 Préparation de la solution-mère de micro-éléments

Pour 100 mL de solution-mère de micro-éléments (ajouter quelques gouttes de HCl pour dissoudre):

Composés	Quantités en mg
H_3BO_3	620
$MnSO_4$, H_20	1690
$ZnSO_4$, 7 H_2O	860
Na_2MoO_4, 2 H_2O	25
$CuSO_4$, 5 H_2O	2,5
$CaCl_2$, 6 H_2O	2,5

3 Préparation de la solution-mère d'iodure de potassium

Pour 100 mL de solution-mère d'iodure de potassium:

Faire dissoudre 75 mg de KI dans 100 mL d'eau distillée. Utiliser un flacon opaque et stocker à l'abri de la lumière.

4 Préparation de la solution-mère de chlorure de calcium

Pour 100 mL de solution-mère de chlorure de potassium:

Faire dissoudre 15 g de $CaCl_2$, 2 H_2O dans 100 mL d'eau distillée.

5 Solution-mère de vitamines

Pour 100 mL de solution-mère de vitamines (chauffer pour dissoudre):

Composés	Quantités en mg
Acide nicotinique	100
Thiamine, HCl	1000
Pyridoxine, HCl	100
Inositol	10 000

6 Solution-mère de Fer EDTA

Pour 100 mL de solution-mère de fer EDTA:

Faire dissoudre 557 mg de $FeSO_4$, 7 H_2O et 745 mg d'EDTA disodique dans 100 mL d'eau distillée. Chauffer pour dissoudre.

7 Préparation du milieu MS standard

Pour 1 L de milieu MS standard:

Solutions mères	Volume à ajouter en mL
Solution de macroéléments	10
Solution de Fe-EDTA	5
Solution de micro-éléments	1
Solution de KI	1
Solution de vitamines	1
Solution de $CaCl_2$	2,9

Ajouter 30 g de saccharose et ajuster le pH à 5,5.

Pour un milieu MS solide, ajouter 8g d'agar-agar.

Pour un milieu additionné de phytorégulateurs (ANA, BAP, picloram, etc), un volume précis est prélevé de la solution-mère de phytorégulateurs et ajouté au milieu de culture MS avant l'autoclavage. Le pH est ensuite ajusté et le milieu autoclave.

Annexe 2 : Les solutions de la coloration de Gram

Préparation des solutions de coloration:

- Solution de cristal violet :

Préparation de la solution-mère de cristal violet : dissoudre 20 g de cristal violet dans 100 mL d'éthanol à 95%.

Préparation de la solution-mère d'oxalate d'ammonium : dissoudre 1 g d'oxalate d'ammonium dans 100 mL d'eau distillée.

Préparation de la working solution : Mélanger 1 mL de la solution mère de cristal violet avec 40 mL de la solution-mère d'oxalate d'ammonium et 10 mL d'eau distillée.

- Solution de lugol : dissoudre 0,33 g d'iode, 0,66 g d'iodure de potassium et 1 g de bicarbonate de sodium dans 100 mL d'eau distillée.

- Solution de décoloration : mélanger des volumes égaux d'éthanol à 95% et d'acétone.

- Solution de safranine : dissoudre 2,5 g de safranine dans 100 mL d'éthanol à 95% pour obtenir la solution-mère. Préparer la working solution en diluant 1 mL de la solution-mère dans 5 mL d'eau distillée.

Annexe 3 : Composition des réactifs généraux des alcaloïdes

Composition du réactif de Dragendorff :

Solution A : faire dissoudre 0.85 g de nitrate de bismuth basique dans 10 mL d'acide acétique et 40 mL d'eau en chauffant.

Solution B : faire dissoudre 8 g d'iodure de potassium dans 30 mL d'eau.

Juste avant pulvérisation sur la plaque de silice, mélanger 1 mL de chaque solution avec 4 mL d'acide acétique et 20 mL d'eau.

Un précipité tétra-iodobismuthate de potassium de couleur rouge orangé apparait indiquant la présence d'alcaloïdes.

Composition du réactif de Bouchardat :

Faire dissoudre 2,5 g d'iode et 5 g d'iodure de potassium dans 100 mL d'eau distillée.

Un précipité iodo-ioduré de couleur brune apparaît indiquant la présence d'alcaloïdes.

Composition du réactif de Mayer :

Faire dissoudre 1,36 g de chlorure mercurique et 25 g d'iodure de potassium dans 100 mL d'eau distillée.

Un précipité tétra-iodomercurate de potassium de couleur blanc crème apparaît indiquant la présence d'alcaloïdes.

Communications scientifiques

Engineering in Life Sciences

Eng. Life Sci. **2015**, *15*, 640–645 www.els-journal.com

Sahar Saliba[1]
Agata Ptak[2]
Dominique Laurain-Mattar[1]

[1]SRSMC, UMR 7565, CNRS, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

[2]Department of Plant Breeding and Seed Science, Agricultural University, Krakow, Poland

Research Article

4′-*O*-Methylnorbelladine feeding enhances galanthamine and lycorine production by *Leucojum aestivum* L. shoot cultures

Galanthamine and lycorine are Amaryllidaceae alkaloids that exhibit a wide range of pharmacological activities. Organic synthesis and plant extraction are the two main commercial sources of galanthamine. Since total organic synthesis is low yielding and complex, and the harvesting of plant biomass is causing wild plant depletion, in vitro cultures offer an alternative approach. Amaryllidaceae alkaloids can be regarded as derivatives of the common precursor 4′-*O*-methylnorbelladine via intramolecular oxidative phenol coupling. The aim of this work was to enhance the biosynthetic pathway of these alkaloids using in vitro techniques. The precursor 4′-*O*-methylnorbelladine was incorporated into the liquid medium of *Leucojum aestivum* shoot cultures at different concentrations (0, 0.05, 0.1, or 0.2 g/L). The cultures were conducted for various periods of time (15, 30, and 40 days). After alkaloid extraction and according to LC-ESI-MS analysis, the precursor highly stimulated the biosynthesis of both galanthamine (0.5 mg/g dry weight [DW], V/S 0.01 mg/g DW in the control sample, i.e. without precursor) and lycorine (0.2 mg/g DW, V/S 0.04 mg/g DW in the control sample) after its biotransformation by the shoot cultures. The optimal culture conditions for the production of both alkaloids were 0.1 g/L of precursor and 15 days of culture.

Keywords: Amaryllidaceae alkaloids / Biosynthesis / In vitro cultures / *Leucojum aestivum* / Precursor

Received: January 22, 2015; *revised:* March 5, 2015; *accepted:* March 30, 2015

DOI: 10.1002/elsc.201500008

1 Introduction

Amaryllidaceae alkaloids, among which galanthamine and lycorine (Fig. 1), are known for their important pharmacological properties. Galanthamine is currently used for the treatment of the early stages of Alzheimer's disease owing to its acetylcholinesterase inhibition properties [1]. Lycorine displayed strong antiviral effect against poliovirus, measles, and Herpex simplex type 1 viruses, as well as high antiretroviral [2], antimalarial [3], strong antimitotic and cytotoxic activities [4, 5]. Organic synthesis and plant extraction are the two main commercial sources of galanthamine. Plants of the Amaryllidaceae family, mainly those belonging to *Galanthus*, *Leucojum*, *Narcissus*, and *Lycoris* genera, are mostly used as extraction raw materials. A study of the biosynthetic pathway of galanthamine provided clues to the feasibility of the biotechnological production of this alkaloid [6–9] for which the organic total synthesis is low yielding and complex [10, 11]. Studies aiming for the improvement of galanthamine and lycorine accumulation in in vitro cultures of *Leucojum aestivum* have been carried out in recent years. They showed that the level of Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis is influenced by several factors among which cellular differentiation [12–17] in relation with growth regulators added to the culture medium [18]. Enhanced synthesis of galanthamine accompanied the development of somatic embryos [19] and also regenerated plant from somatic embryos [16]. Another interesting factor is feeding with deuterium-labeled 4′-*O*-methylnorbelladine (MN) [20, 21]. In fact, Amaryllidaceae alkaloids are regarded as derivatives of the common precursor norbelladine via intramolecular oxidative phenol coupling [22]. Recently, we reported the study of Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis using the biotransformation of this deuterium-labeled precursor in *L. aestivum* shoot cultures. The labeled precursor was incorporated in the alkaloid biosynthesis pathway and metabolized into three types of labeled

Correspondence: Dr. Agata Ptak (mfptak@cyf-kr.edu.pl), Department of Plant Breeding and Seed Science, Agricultural University, 31-140 Krakow, Poland

Abbreviations: BAP, 6-benzylaminopurine; **DW**, dry weight; **FW**, fresh weight; **MN**, 4′-*0*-methylnorbelladine; **NAA**, α-naphthaleneacetic acid

© 2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

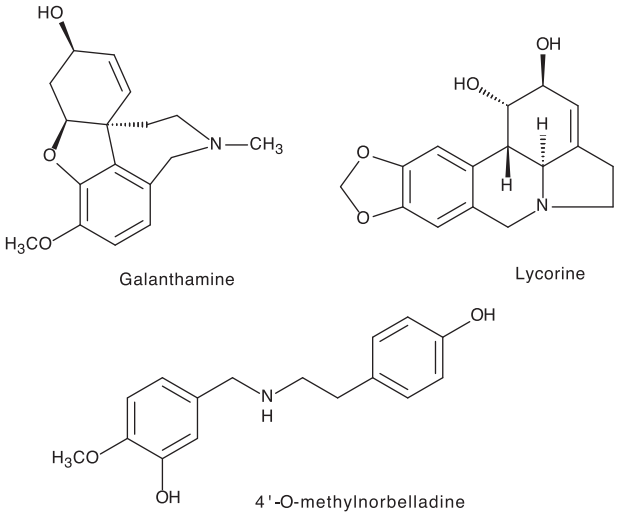


Figure 1. Structures of galanthamine, lycorine, and 4′-*O*-methylnorbelladine.

Amaryllidaceae alkaloids. Labeled galanthamine and lycorine, crinine, *N*-demethylnarwedine, demetylgalanthamine, narwedine, *N*-formylgalanthamine, anhydrolycorine, trisphaeridine, and demethylmaritidine were found in shoot cultures of *L. aestivum*. Feeding with the precursor highlight stimulated alkaloid biosynthesis [20, 21]. Both deuterated and native galanthamine and lycorine were found in the tissues and in the culture media.

In this study, we describe the process of galanthamine and lycorine biosynthesis by *L. aestivum* shoot cultures combining three parameters which have shown previously highlighted effects on alkaloid accumulation, i.e. differentiated tissues such as shoot cultures, liquid-shake cultures, and feeding with the common nondeuterated precursor MN. Galanthamine and lycorine were quantitatively analyzed by LC-ESI-MS.

2 Materials and methods

2.1 General

Melting point was measured on a Reichert Kofler apparatus and is uncorrected. Infrared spectra were recorded on a Perkin-Elmer Spectrum 1000 FT-IR spectrometer. ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded on an AC 250 Bruker spectrometer (250 and 62.9 MHz, respectively). MS analysis of MN was performed using a micrOTOF-QTM (Bruker Daltonics) apparatus operating in the ESI mode. Elemental analyses were performed on a Thermofinnigan FlashEA 1112 apparatus, at the Service Commun de Microanalyse (Nancy, France). The synthesis of MN was carried out under argon with dry solvent. All commercially available reagents were used without further purification. Triethylammonium acetate buffer, galanthamine, lycorine, 6-benzylaminopurine (BAP), inositol, agar–agar, magnesiumsulphate heptahydrate (98%), manganesesulphate, potassiumnitrate, and ethylenediaminetetraacetic acid iron (III) sodium salt were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Stennheim, Germany). Ammoniumbicarbonate, ironsulphate, zincsulphate, copper(II)sulphate pentahydrate (99%), thiaminehydrochloride, α-naphthaleneacetic acid (NAA), absolute ethanol, and methanol (Hipersolv Chromanorum for HPLC–Isocratic Grade) were purchased from Prolabo VWR international bvba/sprl. Pyridoxolhydrochloride, nicotinic acid, potassium dihydrogenophosphate, and calciumchloride dehydrate were obtained from Merck AG Darmstadt (Germany). ACN was acquired from Carlo Erba Reagenti.

2.2 Plant material

Leaves isolated from *L. aestivum* L. bulbs (obtained from commercial sources) were surface-sterilized and cut into explants as previously described [20]. Professor Max Henry (Université de Lorraine, Nancy, France) identified the plant and a voucher specimen (NCY013687) is deposited at the herbarium of the Jardin Botanique, Nancy, France.

2.3 Shoot cultures

Initial explants (thin slices of leaves) were cultivated on Murashige and Skoog solid medium [23] supplemented with auxin: NAA (10 μM) and cytokinin: BAP (5 μM). The medium was supplemented with 3% sucrose, adjusted to pH 5.5 before autoclaving. The cultures were maintained at 25 ± 2°C under white fluorescent light with a 16 h photoperiod (Tungsram lamp, 40 WF, 90 μmol $m^{-2}s^{-1}$) and subcultured every 4 weeks. Twelve-month-old shoot cultures were transferred to Murashige and Skoog liquid medium containing 60 g/L of sucrose, 10 μM of NAA, and 5 μM of BAP. The experiment was conducted in 100 mL Erlenmeyer flasks on a rotary shaker (150 rpm) where 2 g of shoots were submerged in 20 mL liquid-shake medium containing precursor MN at various concentrations (0, 0.05, 0.1, and 0.2 g/L). They were incubated at 25 ± 2°C under white fluorescent light with a 16 h photoperiod (Tungsram lamp, 40 WF, 90 μmol $m^{-2}s^{-1}$) for various periods of time (15, 30, and 40 days). Three replicates of each condition were done. A stock solution for feeding experiments was prepared from 50 mg of MN solubilized in 10 mL of H_2O. Solutions at appropriate concentrations of the precursor were filter-sterilized directly into the flasks.

After each culture step, the shoots were harvested and the growth rates were calculated according to the following formula: final fresh weight (FW) – inoculum FW/inoculum FW.

2.4 Synthesis of the precursor MN

The precursor was synthesized according to Szewczyk et al. [24].

2.5 Alkaloid extraction

Shoots were rinsed three times in ultra-pure water before the alkaloid extraction step, in order to eliminate any compound trace that can be fixed on their external membrane. Alkaloids were

© 2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

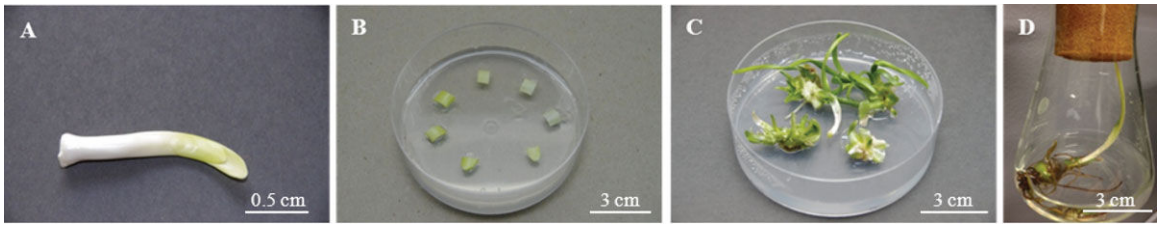


Figure 2. The steps of *L. aestivum* shoot culture establishment: (A) leaves isolated from an in vivo bulb, (B) initial explants derivate from in vivo leaves, (C) formation and multiplication of shoots on solid medium, and (D) shoot cultures in Erlenmeyer flask.

extracted from plant material and culture media as described by El Tahchy et al. [21]. The total methanol extracts were analyzed using LC-ESI-MS.

2.6 LC-ESI-MS analysis

The LC consisted of a U3000-Dionex system, an injector with a 1 μL loop and a UV detector at 280 nm. The analytical column used was an Acclain PepMap C18 ID 1 mm column (150 mm $\times$ 3 μm $\times$ 100 μm). The alkaloids were separated following the elution program described by Ptak et al. [15].

A HPLC coupled with high-resolution MS was used in order to confirm the identity of lycorine (25.5 min), galanthamine (32.2 min), and MN (33.5 min) in sample extracts. Galanthamine and lycorine displayed $[M+H]^+$ at *m/z* of 288.1609 and 288.1235, respectively, as previously described by Georgiev et al. [17] and Laurain-Mattar [19]. MN displayed $[M+H]^+$ at *m/z* of 274.1634. Quantitative analytical procedures of native alkaloids were performed after a calibration method with standards of galanthamine, lycorine, and MN. An 8-point calibration curve, with standard solutions of galanthamine, lycorine, and MN at different concentrations (0.5, 1, 5, 10, 30, 50, 75, and 100 μg/mL) with $R^2 = 0.99$, was defined.

3 Results and discussion

Shoots of *L. aestivum* were grown and developed on initial explants for 12 month. The steps for the establishment of shoot cultures are shown in Fig. 2.

In view to enhance the biosynthetic pathway of galanthamine and lycorine as previously shown [20, 21], shoots of *L. aestivum* were subcultured in Murashige and Skoog liquid medium supplemented with the same growth regulators as for the solid Murashige and Skoog medium described above, and containing precursor MN at various concentrations (0.05, 0.1, and 0.2 g/L). They were incubated for various periods of time (15, 30, and 40 days). First, the growth rates of the shoot cultures were calculated and the corresponding results are shown in Fig. 3. In the control shoots, the growth rate after 15 days of culture was 0.34 $\pm$ 0.07, and it increased until 40 days of culture, where it reached a maximum of 1.03 $\pm$ 0.15. Whatever the concentration of precursor used, the growth kinetics of the shoot cultures were quite similar until 15 days of culture, although the growth rates of the treated shoot cultures were lower than those of the control cultures. After 30 days of culture, the

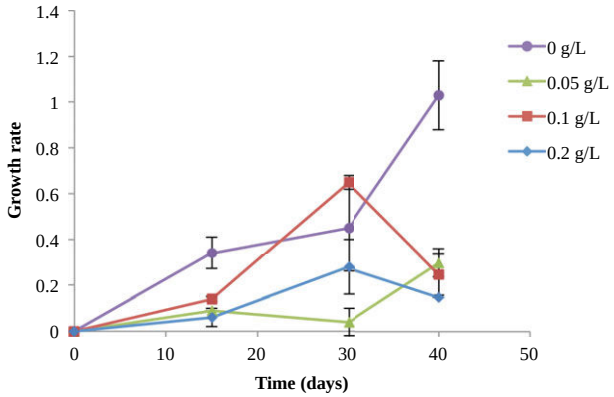


Figure 3. Time-course of *L. aestivum* shoot culture growth in 100-mL flasks containing medium enriched with precursor at various concentrations (0, 0.05, 0.1, and 0.2 g/L). The data represent the average of three replications with standard deviations.

highest growth rate of 0.65 $\pm$ 0.06 was obtained with 0.1 g/L of precursor. However, taking into account the standard deviations, the values of the growth rates obtained with shoot cultures in the presence of 0, 0.1 and 0.2 g/L of MN were close. Until 30 days of culture, the curves obtained with the latter concentrations of MN followed the same trends, which was not the case with 0.05 g/L of MN. In fact, with the lowest concentration of MN (0.05 g/L), the growth rates of the shoots were the slowest and reached their minimum (0.04) after 30 days of culture. This phenomenon was previously observed when a deuterated precursor was added [21]. The growth rates of the shoot cultures decreased after 40 days of culture with the concentrations 0.1 and 0.2 g/L of MN, while they increased with control and 0.05 g/L of MN. This can be due to a correlation between shoot culture growth and the alkaloid synthesis in these tissues incubated with the precursor.

After harvesting the shoot cultures, the alkaloids were extracted from the tissues as well as from the liquid medium and the compounds were identified using HPLC coupled with high-resolution MS (ESI/QTOF). Galanthamine and lycorine were identified by comparison with authentic compounds as previously described [21, 25] and quantified.

The concentrations of MN both in *L. aestivum* shoot cultures and in the culture medium were measured (Fig. 4A and B). After the addition of 0.05, 0.1, and 0.2 g/L of MN to the culture media at day 0, the amounts of MN decreased until 15 days of culture. Only traces remained in the culture media until 40 days of culture. In parallel, the concentrations of MN in the shoots

© 2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

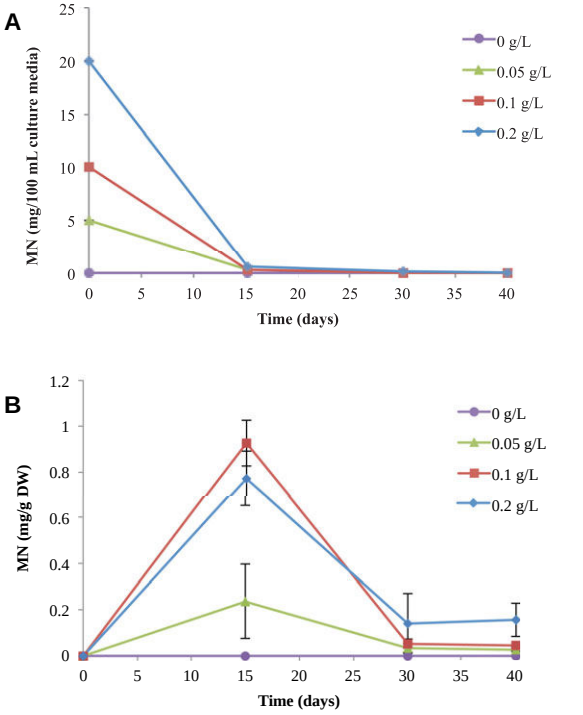


Figure 4. Profile of MN (A) in liquid medium and (B) in shoot cultures of *L. aestivum* during feeding with various concentrations of precursor (0, 0.05, 0.1, and 0.2 g/L) in flasks. The data represent the average of three replications with standard deviations.

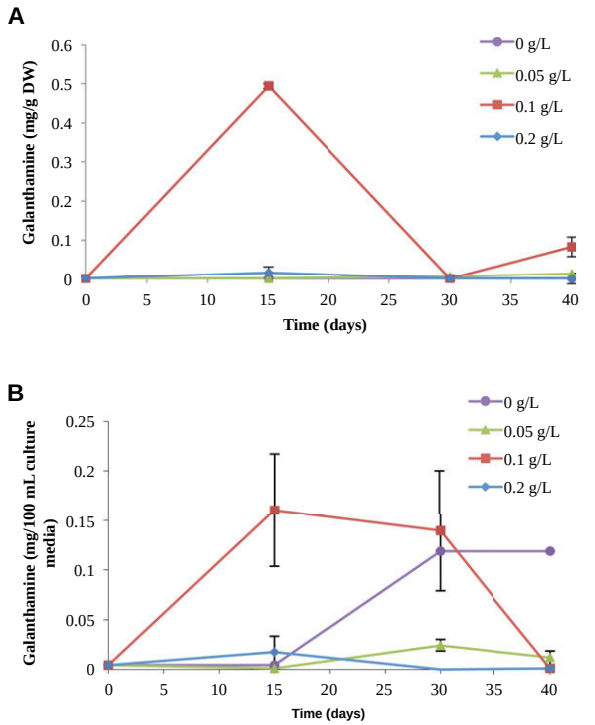


Figure 5. Profile of galanthamine contained (A) in shoot cultures and (B) in liquid culture medium during feeding with various concentrations of precursor (0, 0.05, 0.1, and 0.2 g/L) in flasks. The data represent the average of three replications with standard deviations.

increased until 15 days of culture, where it reached its maximum (0.9 mg/g dry weight [DW]), then decreased until 30 days of culture. These results show the uptake of the precursor by the shoots. At 0.1 g/L, the absorption of MN was higher than at 0.2 g/L. This might be explained by a faster metabolization of the precursor occurring with 0.2 g/L of MN. After 15 days of culture, the amounts of MN decreased drastically until 30 days of culture showing the biotransformation of MN into Amaryllidaceae alkaloids. Comparing the kinetic of the metabolization of the precursor to the shoot culture growth rates, the accumulation of MN in the shoots resulted in slow growth rates until 15 days of culture. In contrary, the decrease of MN in the shoots led to an increase of the growth rates between 15 and 30 days of culture.

The kinetics of the accumulation of galanthamine and lycorine were measured over a 40-day period during which the shoot cultures were fed with various concentrations of the precursor (Fig. 5 and 6). In control cultures and in the treated shoot cultures (Fig. 5A) with 0.05 and 0.2 g/L of the precursor, the accumulation of galanthamine was too low to be detected in the tissues during the whole culturing period. However, feeding with MN at 0.1 g/L induced a significant increase of the accumulation of galanthamine in the shoot cultures where the highest amount of galanthamine (0.5 mg/g DW) was reached after 15 days of culture. After that, the amounts of galanthamine decreased and no galanthamine was detected in the tissues after 30 days of culture. These results suggest that the precursor enhanced the galanthamine accumulation. In the culture medium, the highest concentration of galanthamine (0.16 mg/100 mL) was detected from day 15 to day 30 (Fig. 5B) earlier than for control shoots where the highest concentration occurs only after 30 days of culture. These results showed that only at 0.1 g/L, the precursor enhanced the galanthamine accumulation in the shoot cultures. This latter alkaloid was either partially released into the liquid medium or partially transformed in other compounds as shown in a previous study [20], where labeled narwedine and *N*-formylgalanthamine were found in the shoot cultures.

In control shoot cultures, lycorine was detected in the tissues (0.04 mg/g DW) at a constant level throughout the whole culturing period. Only traces were detected in the liquid medium until 15 days of culture (Fig. 6A and B), and reached a maximum of 0.09 mg/100 mL between 30 and 40 days of culture. The synthesis of lycorine in shoot cultures was enhanced by the addition of 0.05 or 0.1 g/L of the precursor to the liquid medium. At day 15, maximal accumulations of lycorine in the shoot cultures (0.2 and 0.1 mg/g DW) were obtained with 0.1 and 0.05 g/L of the precursor, respectively. After day 15 in the presence of MN, the accumulation of lycorine started to decrease and reached at day 30, a level similar to the controls. At day 40, the accumulation of this alkaloid increased again up to 0.2 and 0.17 mg/g DW in the presence of 0.2 and 0.1 g/L of the precursor, respectively. Accordingly, adding 0.05 or 0.1 g/L of the precursor not only enhanced the production of lycorine but also induced its accumulation 15 days earlier than in the controls. In the liquid medium treated with 0.1 g/L of the precursor, the highest amount

© 2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

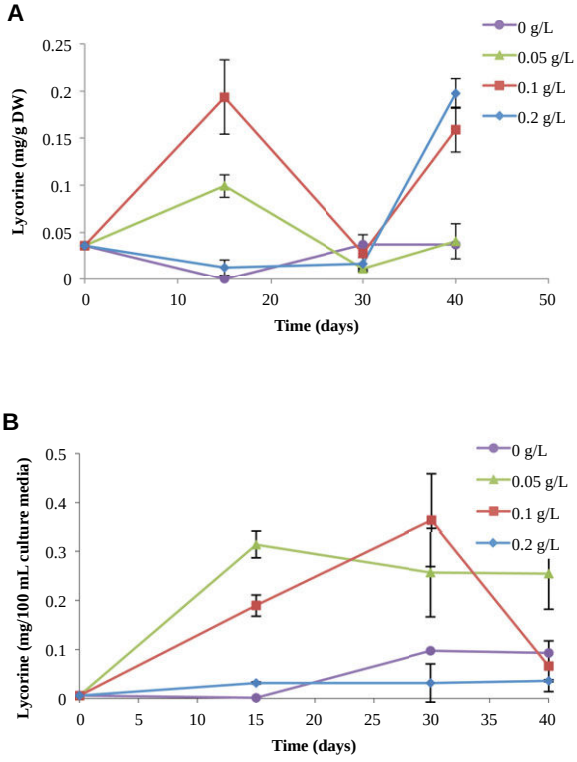


Figure 6. Profile of lycorine contained (A) in shoot cultures and (B) in liquid culture medium during feeding with various concentrations of precursor (0, 0.05, 0.1, and 0.2 g/L) in flasks. The data represent the average of three replications with standard deviations.

of lycorine (0.36 mg/100 mL) was observed at day 30, while the concentration of lycorine was the lowest in shoot cultures. After 30 days of culture, the precursor was almost totally metabolized by the shoots and resulted, in parallel, in high amounts of both galanthamine and lycorine released in the liquid medium.

Therefore, these results demonstrate that MN has a double effect on the accumulation of galanthamine and lycorine. First, production of galathamine was 50 times greater and lycorine five times greater than in control sample. Second, the precursor led to earlier alkaloid accumulation and released a part into the culture media.

In previous studies, we showed the effect of several auxins, cytokinins, and ethylene on the yield of galanthamine in vitro [15, 25]. Growth regulators significantly affect galanthamine biosynthesis by affecting cellular differentiation. However, as concluded by Berkov et al., growth regulators affect secondary metabolism differently in various in vitro cultures derived from the same plant [18]. Their effect is specific to each individual culture. Furthermore, in literature, reported studies have shown that the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids was enhanced using *L. aestivum* shoots cultivated in Erlenmeyer flasks with various elicitors, among which jasmonic acid [13]. In fact, phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine decarboxylase are the first enzymes involved in the metabolic pathway of Amaryllidaceae alkaloids. They lead, respectively, to cinnamic acid and tyramine, the precursors of MN. The boosting effect of jasmonic acid on galanthamine and lycorine biosynthesis was due to the induction of the activity of tyrosine decarboxylase. On the other hand, in a previous study [21], when labeled MN was added to the liquid culture media of *L. aestivum* shoot cultures, we noticed that the precursor was metabolized into labeled alkaloids (mainly galanthamine and lycorine), which were present at low concentrations in the tissues and culture media. More importantly, the precursor enhanced greatly the biosynthesis of native alkaloids; it stimulated the shoots to use first the natural precursor and then the deuterated one. Therefore, it might be interesting to test the effect of the elicitation with both jasmonic acid and MN feeding since they are both good stimulators of Amaryllidaceae alkaloids biosynthesis.

4 Concluding remarks

In conclusion, the addition of the precursor MN to the liquid medium led to a significant enhancing effect on the accumulation of both galanthamine and lycorine. The presented results enable new perspectives in effective cultivation of shoot cultures which could be used for development of a larger scale galanthamine and lycorine biosynthesis based on bioreactor combined with MN feeding.

Practical application

In this manuscript, liquid shoot cultures of *Leucojum aestivum* were fed with different concentrations of 4'-*O*-methylnorbelladine, a common precursor of Amaryllidaceae alkaloids. According to the obtained results, the precursor (i) was absorbed by the shoots, and (ii) it enhanced the biosynthetic pathway of both galanthamine and lycorine compared to control samples (i.e. without precursor feeding). In practice, we developed a rapid and simple method using continuous immersion liquid-shake cultures to enhance galanthamine and lycorine biosynthesis within 15 days of culture. These results enable future work using precursor feeding along with bioreactors for larger scale production of galanthamine and lycorine.

The authors thankfully acknowledge the CNRS and the Ministère de l'Enseignement Supérieur for the financial support.

The authors have declared no conflicts of interest.

5 References

[1] Luttmann, E., Linnemann, E., Fels, G., Galanthamine, as bisfunctional ligand for the acetylcholinesterase. *J. Mol. Model.* 2002, *8*, 208–216.

[2] Szlavik, L., Gyuris, A., Forgo, P., Molnar, J. et al., Alkaloids from *Leucojum vernum* and antiretroviral activity of Amaryllidaceae alkaloids. *Planta Med.* 2004, *70*, 871–873.

© 2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

[3] Osorio, E., Robledo, S. M., Bastida, J., Alkaloids with antiprotozoal activity, in: Cordell, G. A. (Ed.), *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, Vol. *65*, Elsevier Scientific, Amsterdam, The Netherlands 2008, pp. 113–190.

[4] Bastida, J., Lavilla, R., Viladomat, F., Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids, in: Cordell, G. A. (Ed.), *The Alkaloids*, Vol. *63*, Elsevier Scientific, Amsterdam, The Netherlands 2006, pp. 87–179.

[5] Liu, J., Hu, W. X., He, L. F., Ye, M. et al., Effects of lycorine on HL-60 cells via arresting cell cycle and inducing apoptosis. *FEBS Lett.* 2004, *578*, 245–250.

[6] Eichhorn, J., Takada, T., Kita, Y., Zenk, M. H., Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine. *Phytochemistry* 1998, *49*, 1037–1047.

[7] Kaya, G. I., Sarikaya, B., Onur, M. A., Somer, N. U. et al., Antiprotozoal alkaloids from *Galanthus trojanus*. *Phytochem. Lett.* 2011, *4*, 301–305.

[8] Kilgore, M. B., Augustin, M. M., Starks, C. M., O'Neil-Johnson, M. et al., Cloning and characterization of a norbelladine 4'-*O*-methyltransferase involved in the biosynthesis of the Alzheimer's drug galanthamine in *Narcissus* sp. aff. Pseudonarcissus. *PLoS One* 2014, *9*, e103223.

[9] Singh, A., Desgagné-Penix, I., Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloids. *Plant Sci. Today* 2014, *1*, 114–120.

[10] Guillou, C., Beunard, J. L., Gras, E., Thal, C., An efficient total synthesis of (±) galanthamine. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, *40*, 4745–4746.

[11] Magnus, P., Sane, N., Fauber, P. B., Lynch, V., Concise syntheses of (-)-galanthamine and (±)-codeine via intramolecular alkylation of a phenol derivative. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, *131*, 16045–16047.

[12] Ivanov, I., Georgiev, V., Berkov, S., Pavlov, A., Alkaloid patterns in *Leucojum aestivum* shoot culture cultivated at temporary immersion conditions. *J. Plant Physiol.* 2012, *169*, 206–211.

[13] Ivanov, I., Georgiev, V., Pavlov, A., Elicitation of galanthamine biosynthesis by *Leucojum aestivum* liquid shoot cultures. *J. Plant Physiol.* 2013, *170*, 1122–1129.

[14] Pavlov, A., Berkov, S., Courot, E., Gocheva, T. et al., Galanthamine production by *Leucojum aestivum* in vitro systems. *Process Biochem.* 2007, *42*, 734–739.

[15] Ptak, A., Simlat, M., Kwiecien, M., Laurain-Mattar, D., *Leucojum aestivum* plants propagated in in vitro bioreactor culture and on solid media containing cytokinins. *Eng. Life Sci.* 2013, *13*, 261–270.

[16] Schumann, A., Torras-Claveria, L., Berkov, S., Claus, D. et al., Eliciation of galanthamine production by *Leucojum aestivum* shoots grown in temporary immersion system. *Biotechnol. Prog.* 2013, *24*, 311–318.

[17] Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., Bley, T., Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Eng. Life Sci.* 2014, *14*, 607–621.

[18] Berkov, S., Ivanov, I., Georgiev, V., Codina, C. et al., Galanthamine biosynthesis in plant in vitro systems. *Eng. Life Sci.* 2014, *14*, 643–650.

[19] Laurain-Mattar, D., Production of alkaloids in plant cell and tissue cultures, in: Ramawat, K. G., Mérillon, J. M. (Eds.), *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 2008, pp. 165–174.

[20] El Tahchy, A., Boisbrun, M., Ptak, A., Dupire, F. et al., New method for the study of Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis using biotransformation of deuterium-labeled precursor in tissue cultures. *Acta Biochim. Pol.* 2010, *57*, 75–82.

[21] El Tahchy, A., Ptak, A., Boisbrun, M., Barre, E. et al., Kinetic study of the rearrangement of deuterium-labeled 4'-*O*-methylnorbelladine in *Leucojum aestivum* shoot cultures by mass spectrometry. Influence of precursor feeding on Amaryllidaceae alkaloid accumulation. *J. Nat. Prod.* 2011, *74*, 2356–2361.

[22] Barton, D. H. R., Cohen, T., Some biogenetic aspects of phenol oxidation, in: Stoll, A. (Ed.), *Festschrift Arthur Stoll*, Birkhäuser, Basel 1957, pp. 117.

[23] Murashige, T., Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant* 1962, *15*, 473–497.

[24] Szewczyk, J., Lewin, A. H., Carroll, F. I., An improved synthesis of galanthamine. *J. Heterocycl. Chem.* 1988, *25*, 1809–1811.

[25] Ptak, A., El Tahchy, A., Dupire, F., Boisbrun, M. et al., LCMS and GCMS for the screening of alkaloids in natural and in vitro extracts of *Leucojum aestivum*. *J. Nat. Prod.* 2009, *72*, 142–147.

© 2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Communications orales:

Journée scientifique de l'école doctorale S.E.S.A.M.E.S., 25 Juin 2013 – Faculté des Sciences et Techniques, Vandœuvre-lès-Nancy, France.

9th International Symposium on Chromatography of Natural Products, 26-29 Mai, 2014 - Lublin, Pologne.

Journée de rentrée de l'école doctorale S.E.S.A.M.E.S., Novembre 2014 - Campus Bridoux, Metz, France.

Posters

International Symposium of AFERP & STOLON, 21-24 Mai 2013 - Bruxelles, Belgique.

Journée de rentrée de l'école doctorale S.E.S.A.M.E.S., Novembre 2013 – Campus Bridoux, Metz, France.

Les Doctoriales de l'Université de Lorraine, 18 - 23 Mai 2014-Ventron, France.

Résumé

Plus de 300 alcaloïdes d'Amaryllidaceae doués d'activités biologiques ont été isolés à partir des plantes appartenant à cette famille. De nos jours, seule la galanthamine, utilisée pour le traitement palliatif de la maladie d'Alzheimer, est commercialisée. L'accumulation de ces alcaloïdes dans les plantes est limitée. La culture *in vitro* est une méthode alternative intéressante pour l'obtention plus aisée de ces alcaloïdes à haute valeur ajoutée. Le premier objectif de ce travail vise à développer une méthode de purification efficace, simple et rapide des extraits de plantes préalablement à leur analyse en LCMS et GCMS. Le second objectif est d'étudier l'effet de plusieurs facteurs exogènes, ajoutés au milieu de culture de bulbilles de *Leucojum aestivum* et de sa variété Gravety Giant en bioréacteurs RITA®, sur les voies de biosynthèse de la galanthamine et de la lycorine. La variation des paramètres exogènes a permis une accumulation accrue en galanthamine et en lycorine (0,814 mg/g et 1,54 mg/g de matière sèche respectivement) dans les bulbilles. Le troisième objectif porte sur l'isolement et l'identification d'endophytes à partir de bulbes *in vivo* et *in vitro* de trois espèces d'Amaryllidaceae (*L. aestivum*, *Narcissus pseudonarcissus* et *Galanthus elwesii*). Des bactéries endophytes du genre *Bacillus* ont été identifiées. Un nouvel alcaloïde a été isolé à partir des cultures bactériennes.

Mots-clés : Amaryllidaceae, analyse phytochimique, galanthamine, lycorine, voie de biosynthèse, culture *in vitro*, Bioréacteur RITA®, endophyte.

Abstract

Over 300 Amaryllidaceae alkaloids possessing a wide range of biological activities have been isolated from plants belonging to this family. Galanthamine, used for the palliative treatment of Alzheimer's disease, is the only one commercialized. The biodisponiblity of these alkaloids is low. *In vitro* culture offers an alternative yet interesting approach for the biotechnological production of these valuable alkaloids. The aim of this work was, first, to develop a fast, efficient and easy purification method of plant extracts prior to their phytochemical analysis both in LCMS and GCMS. Second, the combined effects of bioreactor RITA® culture and feeding with different exogenous factors on the biosynthetic pathway of both galanthamine and lycorine were studied. The experiments were conducted both with *Leucojum aestivum* and *L. aestivum* 'Gravety Giant' bulblets. The variation of several exogenous parameters resulted in a better accumulation of galanthamine and lycorine (0.814 mg/g and 1.54 mg/g dry weight respectively) in the bulblets. The third aim was to isolate and identify alkaloid producing endophytes from *in vivo* and *in vitro* bulbs of three Amaryllidaceae species (*L. aestivum*, *Narcissus pseudonarcissus* and *Galanthus elwesii*). Bacterial endophtes belonging to the *Bacillus* genus were identified. A new alkaloid was isolated from bacterial liquid cultures.

Keywords: Amaryllidaceae, phytochemical analysis, galanthamine, lycorine, biosynthetic pathway, *in vitro* culture, bioreactor RITA®, endophyte.