



HAL
open science

Etude de la biologie de plantes du genre *Psoralea* (légumineuses), productrices de furocoumarines à intérêt pharmaceutique: essais de cultures in-vitro

Frédéric Bourgaud

► To cite this version:

Frédéric Bourgaud. Etude de la biologie de plantes du genre *Psoralea* (légumineuses), productrices de furocoumarines à intérêt pharmaceutique: essais de cultures in-vitro. Biologie végétale. Institut National Polytechnique de Lorraine, 1990. Français. NNT: 1990INPL001N . tel-01776170

HAL Id: tel-01776170

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01776170>

Submitted on 24 Apr 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

136036 9022

[M] 1990 BOURGAUD F.

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE
ET DES INDUSTRIES ALIMENTAIRES

LABORATOIRE DE PHYTOTECHEINIE ASSOCIE INRA

THESE

présenté à
L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

en vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'I.N.P.L. "nouveau régime"

en sciences agronomiques

par

Frédéric BOURGAUD

ETUDE DE LA BIOLOGIE DE PLANTES DU GENRE PSORALEA (LEGUMINEUSES),

PRODUCTRICES DE FUROCOUMARINES A INTERET PHARMACEUTIQUE.

ESSAIS DE CULTURES IN-VITRO.

Soutenue publiquement le 4 Janvier 1990, devant un jury composé de :

A. GUCKERT
F. DALL'ACQUA

P. FORLOT

P. GIRARDIN

B. SANGWAN

Rapporteur

Rapporteur

Professeur à l'INPL (Nancy).
Professeur à la faculté de
pharmacie de Padoue.
Directeur de recherches des
Laboratoires Bergaderm.
Directeur de recherches à L'INRA
de Colmar.
Professeur à l'Université de
Picardie (Amiens).

A mon père.
Pour ma mère.
Pour Nathalie.

REMERCIEMENTS.

Ce mémoire est le résultat d'un travail qui a été entrepris à la fin de l'année 1987, au sein du laboratoire de phytotechnie-INRA de l'ENSAIA. Je tiens, avant toute chose, à exprimer mes plus sincères remerciements à l'ensemble des personnes qui ont contribué au meilleur déroulement possible de cette étude.

Je voudrais d'abord remercier Mr. A. Guckert, professeur à l'INPL, pour m'avoir proposé ce travail et fait marque de sa confiance. Ce sujet pouvait apparaître au départ comme une gageure puisqu'il concernait des plantes australiennes très peu étudiées. Aussi, je pense pouvoir dire que nous avons été associé dans cette découverte passionnante de la biologie des Psoralées qui s'est concrétisée par un voyage d'étude en Australie. Qu'il trouve aussi l'expression de ma gratitude pour m'avoir dirigé dans ce travail et prodigué ses conseils tout au long de ces deux années.

Je tiens à remercier chaleureusement Mr. P. Forlot, directeur de la recherche des Laboratoires Bergaderm S. A. qui a été l'instigateur de ce travail. Il m'a, lui aussi, témoigné sa confiance en me faisant contribuer aux travaux de recherche de l'entreprise par l'intermédiaire d'un contrat CIFRE. Il demeure un interlocuteur industriel très averti qui a participé activement, lors de réunions régulières, au développement de ce travail et à l'élaboration des protocoles expérimentaux. Il nous a, de plus, permis d'établir des relations scientifiques fructueuses avec d'autres équipes de recherche notamment à l'étranger. Ces contacts vont se concrétiser, dans un avenir, proche par un stage de recherche prolongé en Italie, grâce aux moyens qu'il met en oeuvre.

Je voudrais également exprimer ma reconnaissance à Mr. P. Girardin, directeur de recherches et responsable de la station d'agronomie à l'INRA de Colmar pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Je tiens à souligner ici qu'il nous a considérablement aidé pendant la phase d'expérimentation sur le dosage des furocoumarines en nous prêtant gracieusement un HPLC de la station d'agronomie de Colmar. Sans son geste, nos travaux en eurent été fortement retardés. Je souhaiterais associer à ces remerciements Mr. Maroke de l'INRA de Colmar pour avoir, lui aussi, accepté de nous prêter l'appareil.

Toute ma reconnaissance va également à Mme **B. Sangwan**, professeur au laboratoire d'androgénèse et biotechnologies de l'université de Picardie (Amiens), qui a bien voulu participer à ce jury en qualité de rapporteur. Elle nous a, de plus, apporté un soutien très appréciable lors des débuts de la culture *in-vitro* des Psoralées en nous faisant part de son expérience et en nous ouvrant son laboratoire.

J'exprime aussi toute ma gratitude à Mr. **F. Dall'Acqua**, professeur et directeur de la faculté de pharmacie de Padoue pour avoir accepté de se joindre à cette commission d'examen. Je tiens également à le remercier, lui, ainsi que le professeur **Innocenti**, pour m'avoir accueilli dans leur équipe de recherche et fait part de leur grande expérience sur la chimie et le dosage des furocoumarines. Je suis particulièrement heureux de poursuivre avec eux cette collaboration sous la forme d'un séjour prolongé à la faculté de pharmacie de Padoue.

Ce travail a été conduit grâce à l'appui matériel et amical de nombreuses personnes. Je tiens à associer dans ces remerciements Mr. **J. L. Morel** qui, entre autres aides, à ramené des Psoralées de Floride, Mr. **S. Plantureux**, pour ses conseils avisés, Mr. **B. Vignon** qui m'a permis d'accéder à l'HPLC du service de zootechnie et l'ensemble du personnel du laboratoire de phytotechnie.

Je souhaiterais, à cette occasion, témoigner du soutien dont j'ai pu bénéficier, auprès de **C. Robin** et **D. Schöntz**, par leurs conseils d'anciens thésards du laboratoire et auprès de **P. Martin**, camarade de promotion et de thèse, par sa franche amitié.

Je remercie également les étudiants qui, au cours de leur stage de fin d'étude, ont participé ou réalisé certaines expérimentations : **N. Allard** (DAA 1988), **M. C. Brunel** (DAA 1989), **F. Caron** (DAA 1989), **E. Mazillier** (DAA 1989) et **M. Rosensthiel** (DAA 1989).

A tous merci.

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION GENERALE.</u>	p 20
<u>CHAPITRE I : PRESENTATION DES FUROCOUMARINES ET DES RESSOURCES VEGETALES EN CES MOLECULES.</u>	p 22
I/ LES FUROCOUMARINES.	p 22
1/ Rappel historique.	p 22
2/ Structure chimique.	p 24
3/ Propriétés biologiques des furocoumarines.	p 24
4/ Ressources naturelles en furocoumarines.	p 26
5/ Comparaison des teneurs en furocoumarines.	p 30
II/ LES PSORALEES.	p 32
1/ Classification systématique et répartition géographique.	p 34
2/ Ecophysiologie des Psoralées.	p 34
a/ Aire de distribution.	p 34
b/ La nodulation chez les Psoralées.	p 36
c/ Utilisation des Psoralées comme fourrage.	p 37
3/ Cycle de développement.	p 38
<u>CHAPITRE II : ASPECTS BOTANQUES ET BIOLOGIQUES DE QUELQUES ESPECES DE PSORALEES AUSTRALIENNES.</u>	p 40
I/ INTRODUCTION.	p 40
II/ MATERIELS ET METHODES.	p 40
1/ Matériel végétal.	p 40
2/ Tests de germination.	p 41
3/ Culture de Psoralées.	p 41
4/ Etude de la vigueur des plantules.	p 42

III/ RESULTATS.	p 42
1/ Germination.	p 42
a/ Méthode manuelle.	p 42
b/ Méthode chimique.	p 44
2/ Etude de la vigueur des plantules.	p 46
3/ Aspects morphologiques et botaniques.	p 46
a/ Tiges.	p 46
b/ Feuilles.	p 49
c/ Inflorescences.	p 49
d/ Floraison et maturation des semences.	p 51
e/ Proposition de cycles de développement.	p 53
IV/ DISCUSSION.	p 53

**CHAPITRE III : EFFETS DE L'INOCULATION BACTERIENNE
ET DE LA FERTILISATION AZOTEE SUR LA CROISSANCE ET LE
RENDEMENT DE TROIS ESPECES DE PSORALEES.**

p 56

I/ INTRODUCTION.	p 56
II/ MATERIELS ET METHODES.	p 56
1/ Mise en place de l'expérience.	p 56
a/ Choix des espèces végétales.	p 56
b/ Choix des espèces de <i>Bradyrhizobium</i> .	p 58
c/ Protocole de l'expérience.	p 58
2/ Suivi de la croissance, estimation du rendement.	p 58
a/ Suivi de la croissance.	p 58
b/ Estimation du rendement.	p 59
3/ Analyses statistiques.	p 60

III/ RESULTATS.	p 61
A/ Effets comparés de diverses inoculations et d'une fertilisation azotée de 50 uN/ha.	p 61
1/ Croissance végétative.	p 61
a/ Hauteur.	p 61
b/ Nombre total de feuilles.	p 61
2/ Etude de la production de biomasse et des rendements.	p 63
a/ Biomasse des parties végétatives.	p 63
b/ Rendements en semences et fruits immatures.	p 65
c/ Composantes du rendement en semences.	p 67
d/ Etude de la présence des nodosités sur les racines.	p 67
B/ Effets comparés d'une inoculation et d'une fertilisation azotée de 120 uN/ha.	p 67
1/ Croissance végétative.	p 69
2/ Production de biomasse.	p 69
IV/ DISCUSSION.	p 72
<u>CHAPITRE IV : ETUDE DE LA DISTRIBUTION ET DES TENEURS EN FUROCOUMARINES CHEZ TROIS ESPECES DE PSORALEES AUSTRALIENNES.</u>	p 75
I/ INTRODUCTION.	p 75
II/ MATERIELS ET METHODES.	p 76
1/ Matériel végétal.	p 76
2/ Traitements.	p 76
a/ Expérience "température".	p 76
b/ Expérience "phytoaléxines".	p 77
3/ Identification et dosage des furocoumarines des végétaux.	p 79

a/ Extraction des furocoumarines des fractions végétales.	p 79
b/ Identification et dosage des furocoumarines.	p 79
III/ RESULTATS.	p 81
1/ Dosage des furocoumarines.	p 81
a/ Etude de la précision de la méthode de dosage des furocoumarines.	p 81
b/ Etude de la répartition et de la teneur en furocoumarines de quelques espèces de Psoralées.	p 83
c/ Effets comparés de l'inoculation et d'une fertilisation azotée de 120 uN/ha sur les teneurs en furocoumarines.	p 86
2/ Effets de la température sur la synthèse de furocoumarines.	p 88
a/ Teneur en furocoumarines à la première récolte.	p 88
b/ Teneur en furocoumarines à la seconde récolte.	p 88
3/ Effets de traitements chimiques sur la concentration en furocoumarines.	p 91
4/ Etude de la quantité de furocoumarines produite par plante.	p 95
IV/ DISCUSSION.	p 100
1/ Adéquation de la méthodologie pour le dosage des furocoumarines dans les végétaux.	p 100
2/ Concentration en furocoumarines	p 100
3/ Intérêt d'une culture de Psoralées en vue de la production de furocoumarines.	p 102

**CHAPITRE V : ESSAIS DE CULTURES IN-VITRO
DE CELLULES DE MESOPHYLLE DE PSORALEES.**

p 104

I/ INTRODUCTION.

p 104

II/ RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.

p 104

1/ Choix du matériel végétal pour
l'établissement des souches.

p 104

2/ Obtention de cellules isolées.

p 105

3/ Choix du milieu de culture.

p 106

III/ MATERIELS ET METHODES.

p 107

1/ Cultures cellulaires en milieu liquide

p 107

a/ Matériel végétal.

p 107

b/ Matériel et milieu de culture.

p 108

c/ Stérilisation des feuilles.

p 108

d/ Dissociation des cellules foliaires
et mise en culture.

p 109

e/ Comptage des cellules.

p 109

f/ Protocoles expérimentaux.

p 109

2/ Culture de cals.

p 111

a/ Matériel végétal.

p 111

b/ Matériel et milieu de culture.

p 111

c/ stérilisation et mise en culture.

p 113

d/ protocoles expérimentaux.

p 113

IV/ RESULTATS.

p 113

1/ Influence de la concentration cellulaire
de départ sur la croissance cellulaire en
milieu liquide.

p 113

2/ Influence de la nature et de la
concentration en hormones sur la
croissance cellulaire en milieu liquide.

p 115

3/ culture de cals en milieu gélosé.	p 118
a/ Aptitude à la callogénèse des Psoralées.	p 118
b/ Influence de la nature et de la concentration d'hormones.	p 118
V/ DISCUSSION.	p 122
<u>CONCLUSION GENERALE.</u>	p 125
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.</u>	p 129
<u>ANNEXES</u>	p 136

LISTE DES FIGURES.

CHAPITRE I :

- Fig n°1 : structure chimique des furocoumarines les plus communes. p 23
- Fig n°2 : chaîne de biosynthèse des furocoumarines linéaires (d'après Brown, 1981). p 29
- Fig n°2bis : voie alternative de la synthèse de la xanthotoxine chez les Rutacées (d'après Brown, 1981). p 29

CHAPITRE II :

- Fig n°3 : efficacité de la scarification chimique par H_2SO_4 conc. chez *Psoralea cinerea*. p 43
- Fig n°4 : efficacité de la scarification chimique par H_2SO_4 conc. chez *Psoralea plumosa*. p 43
- Fig n°5 : cinétique de germination de semences de *Psoralea cinerea* après scarification chimique. p 45
- Fig n°6 : cinétique de germination de semences de *Psoralea plumosa* après scarification chimique. p 45
- Fig n°7 : comparaison du développement des plantules en fonction du rang foliaire. p 47
- Fig n°8a : cycle de développement de *Psoralea cinerea*. p 54
- Fig n°8b : cycle de développement de *Psoralea plumosa*. p 54
- Fig n°8c : cycle de développement de *Psoralea martinii*. p 54

CHAPITRE III :

Fig n°9 : croissance en hauteur des <i>P. cinerea</i> selon les traitements.	p 60
Fig n°10 : croissance en hauteur de <i>P. plumosa</i> selon les traitements.	p 60
Fig n°11 : croissance en hauteur de <i>P. martinii</i> selon les traitements.	p 60
Fig n°12 : évolution du nombre total de feuilles chez <i>P. cinerea</i> selon les traitements.	p 62
Fig n°13 : évolution du nombre total de feuilles chez <i>P. plumosa</i> selon les traitements.	p 62
Fig n°14 : évolution du nombre total de feuilles chez <i>P. martinii</i> selon les traitements.	p 62
Fig n°15 : effet des différents traitements sur le rendement de <i>P. cinerea</i> .	p 64
Fig n°16 : effet des différents traitements sur le rendement de <i>P. plumosa</i> .	p 64
Fig n°17 : effet des différents traitements sur le rendement de <i>P. martinii</i> .	p 66
Fig n°18 : croissance en hauteur de <i>P. cinerea</i> (expérience en serre).	p 70

Fig n°19 : évolution du nombre total de feuilles
de *P. cinerea* (expérience en serre). p 70

Fig n°20 : effet des différents traitements sur
le rendement de *P. cinerea* en serre. p 71

CHAPITRE IV :

Fig n°21 : protocole d'extraction des furocoumarines
des végétaux. p 78

Fig n°22 a : teneur en furocoumarines des feuilles
de *P. cinerea* (culture en phytotron). p 82

Fig n°22 b : teneur en furocoumarines des semences
de *P. cinerea* (culture en phytotron). p 82

Fig n°22 c : teneur en furocoumarines des fruits
immatures de *P. cinerea* (culture en phytotron). p 82

Fig n°23 : teneur en furocoumarines des feuilles
de *P. martinii* (culture en phytotron). p 84

Fig n°24 a : teneur en furocoumarines des tiges
de *P. plumosa* (culture en phytotron). p 84

Fig n°24 b : teneur en furocoumarines des semences
de *P. plumosa* (culture en phytotron). p 84

Fig n°25 a : teneur en furocoumarines des feuilles de
P. cinerea (culture en serre). p 85

Fig n°25 b : teneur en furocoumarines des semences de
P. cinerea (culture en serre). p 85

Fig n°25 c : teneur en furocoumarines des fruits
immatures de *P. cinerea* (culture en serre). p 85

- Fig n°26 : effet de la température sur la teneur en furocoumarines des feuilles chez *P. cinerea* (première récolte). p 87
- Fig n°27 : effet de la température sur la teneur en furocoumarines des feuilles chez *P. cinerea* (seconde récolte). p 87
- Fig n°28 : croissance en hauteur de *P. cinerea* selon le traitement thermique. p 89
- Fig n°29 : évolution du phyllochrone chez *Psoralea cinerea* selon les traitements thermiques. p 89
- Fig n°30 : évolution de la teneur en psoralène dans les feuilles de *P. cinerea* selon les traitements chimiques. p 90
- Fig n°31 : évolution de la teneur en angélicine dans les feuilles de *P. cinerea* selon les traitements chimiques. p 90
- Fig n°32 : effet des traitements chimiques sur la teneur en psoralène chez *P. cinerea* (seconde récolte). p 93
- Fig n°33 : effet des traitements chimiques sur la teneur en angélicine chez *P. cinerea* (seconde récolte). p 93
- Fig n°34 : croissance en hauteur de *P. cinerea* selon les traitements chimiques. p 94
- Fig n°35 : évolution du phyllochrone chez *P. cinerea* selon les traitements chimiques. p 94
- CHAPITRE V :**
- Fig n°36 : évolution du pourcentage de cellules de *P. cinerea* en pourcentage par rapport à l'inoculum de départ. p 112

- Fig n°37 : évolution du pourcentage de cellules de *P. martinii* en pourcentage par rapport à l'inoculum de départ. p 112
- Fig n°38 : évolution du nombre de cellules de *P. cinerea* selon l'inoculum de départ p 114
- Fig n°39 : évolution du nombre de cellules de *P. martinii* selon l'inoculum de départ. p 114
- Fig n°40 : influence des substances de croissance sur la division cellulaire de *P. martinii* (inoculum # $3,5 \cdot 10^5$ cellules/ml). p 116
- Fig n°41 : influence des substances de croissance sur la division cellulaire de *P. martinii* (inoculum # $1 \cdot 10^5$ cellules/ml). p 116
- Fig n°42 : influence des substances de croissance sur la division cellulaire de *P. cinerea* (inoculum # $3 \cdot 10^5$ cellules/ml). p 117
- Fig n°43 : influence des substances de croissance sur la division cellulaire de *P. cinerea* (inoculum # $1,5 \cdot 10^5$ cellules/ml). p 117
- Fig n°44 : cultures de cals sur milieu gélosé (0,2 mg/l NAA + 0,2 mg/l K, obscurité, 25°C). p 119
- Fig n°45 : cultures de cals sur milieu gélosé (0,2 mg/l NAA + 0,2 mg/l K, lumière, 25°C). p 119
- Fig n°46 : culture de cals sur milieu gélosé (*P. martinii*, obscurité, 25°C). p 121
- Fig n° 47 : culture de cals sur milieu gélosé (*P. cinerea*, obscurité, 25°C). p 121

LISTE DES TABLEAUX.

CHAPITRE I :

Tableau n°1 : principaux genres de plantes à furocoumarines (d'après Bourgaud, 1989). p 25

Tableau n°2 : répartition des principales furocoumarines dans quelques espèces de végétaux supérieurs (d'après Bourgaud et al, 1989). p 27

Tableau n°3 : teneur en furocoumarines (en ppm par poids de matière sèche de végétal) de quelques espèces de végétaux supérieurs (d'après Bourgaud et al, 1989). p 31

Tableau n°4 : Teneur en furocoumarines de quelques espèces de Psoralées (d'après Innocenti et al, 1984). p 33

CHAPITRE III :

Tableau n°5a : composantes du rendement en semence chez *P. cinerea*. p 68

Tableau n°5b : composantes du rendement en semences chez *P. plumosa*. p 68

CHAPITRE IV :

- Tableau n°6 : production de furocoumarines par plante pour l'espèce *P. cinerea* selon le type d'inoculation ou de fertilisation (résultats en g.plante⁻¹, expérience en phytotron). p 96
- Tableau n°7 : production de furocoumarines par plante pour l'espèce *P. martinii* selon le type d'inoculation ou de fertilisation (résultats en g.plante⁻¹, expérience en phytotron). p 97
- Tableau n°8 : production de furocoumarines par plante pour l'espèce *P. plumosa* selon le type d'inoculation ou de fertilisation (résultats en g.plante⁻¹, expérience en phytotron). p 98
- Tableau n°9 : production de furocoumarines par plante pour l'espèce *P. cinerea* selon le type d'inoculation ou de fertilisation (résultats en g.plante⁻¹, expérience en serre). p 99
- Tableau n°10 : extrapolation de la production de furocoumarines (en g.ha⁻¹) obtenue en conditions contrôlées. p 103

LISTE DES PHOTOGRAPHIES.

CHAPITRE I :

Photo n°1 : *P. cinerea*, individu à port érigé. p 35

Photo n°2 : *P. cinerea*, individu à port prostré. p 35

CHAPITRE II :

Photo n°3 : *Psoralea cinerea*. p 48

Photo n°4 : *Psoralea plumosa*. p 48

Photo n°5 : *Psoralea martinii*. p 48

Photo n°6 : détail des fleurs de *P. cinerea*. p 50

Photo n°7 : détail des fleurs de *P. plumosa*. p 50

Photo n°8 : fruits de *P. martinii*. p 52

Photo n°9 : fruits de *P. cinerea*. p 52

Photo n°10 : fruits de *P. plumosa*. p 52

CHAPITRE IV :

Photo n°11 : effets du traitement au CaOCl
sur les feuilles de *P. cinerea*. p 92

Photo n°12 : effets du traitement au CuSO₄
sur les feuilles de *P. cinerea*. p 92

CHAPITRE V :

Photo n°13 : cal de *P. obtusifolia* obtenu à la lumière. p 120

Photo n°14 : cal de *P. plumosa* obtenu à la lumière. p 120

Photo n°15 : cal de *P. cinerea* obtenu à l'obscurité. p 120

INTRODUCTION GENERALE.

Les 15 et 16 Avril 1988, s'est déroulé à Paris un colloque international intitulé : "Les psoralènes en 1988, actualités et perspectives". Ce congrès regroupant d'éminents dermatologues était entièrement consacré aux psoralènes, molécules encore appelées furocoumarines. A cette occasion, le constat a été dressé de leur intérêt considérable en dermatologie, en cosmétologie, et même, semble-t-il, en médecine psychiatrique.

Si le succès de ces molécules est croissant, leur production reste toutefois un problème. En effet, on dispose actuellement de très peu de ressources en psoralènes. Le principal moyen d'obtention est l'extraction à partir de l'huile de bergamote. Cependant, devant le besoin croissant en psoralène engendré par les nouvelles thérapeutiques, cette voie risque de devenir rapidement insuffisante. Quant aux processus de synthèse chimique, ils ont été élucidés mais la méthode demeure extrêmement coûteuse.

Une alternative pourrait être représentée par l'utilisation d'autres espèces végétales riches en furocoumarines. C'est l'objet de ce présent travail dans lequel nous nous sommes particulièrement intéressés à des plantes australiennes du genre *Psoralea* (Légumineuses).

La première partie de ce mémoire est consacrée à une étude bibliographique des furocoumarines et des plantes productrices, avec une attention plus précise portée au genre *Psoralea*. La deuxième partie rapporte les observations d'ordre botanique réalisées sur quelques espèces de Psoralées, chaque stade phénologique faisant l'objet d'une étude particulière.

Les Psoralées étant des Légumineuses, le troisième volet de ce travail analyse l'importance de la symbiose avec des bactéries du type *Rhizobium* sur la croissance des plantes considérées. On tente, en particulier d'y évaluer la production de biomasse et de semences en comparant les effets de l'inoculation bactérienne et de la fertilisation azotée.

L'étape suivante de notre mémoire se rapporte au dosage des furocoumarines chez les Psoralées. L'étude porte sur la distribution et les teneurs dans les différents organes. A ce propos, nous aborderons les facteurs qui interviennent sur les concentrations en furocoumarines dans les plantes. La production de furocoumarines par plante sera également discutée.

En dernier ressort, nous présenterons les travaux entrepris sur la culture *in-vitro* des Psoralées. Nous verrons ainsi si l'étude de la production de furocoumarines par des suspensions cellulaires peut être envisagée favorablement.

CHAPITRE I : PRESENTATION DES FUROCOUMARINES ET DES RESSOURCES VEGETALES EN CES MOLECULES, CAS PARTICULIER DES PSORALEES.

I/ LES FUROCOUMARINES.

1/ Rappel historique.

Les furocoumarines sont des molécules qui ont été utilisées depuis les temps les plus reculés de l'Antiquité pour le traitement de certaines affections de la peau. Le texte le plus ancien sur la question retrouvé à ce jour est un livre sacré hindou du nom d'Atharva veda (Fitzpatrick et al, 1959) datant de 1500 ans avant J.C.. On y trouve une thérapie du vitiligo (dépigmentation de la peau) à base d'une poudre de plante, maintenant répertoriée sous le nom de *Psoralea corylifolia* et dont le principe actif désormais reconnu est une furocoumarine (le psoralène). Selon le même principe, la médecine populaire de la vallée du Nil a utilisée pendant des siècles l'espèce végétale *Ammi majus* contre la même affection. On peut en retrouver la trace dans le livre d'un érudit arabe datant du 13^{ème} siècle (Fitzpatrick et al, 1959).

Dans la culture occidentale, la référence la plus ancienne aux furocoumarines que l'on connaisse, fait allusion à certains de leurs effets nocifs. Il s'agit d'un conte allemand du 18^{ème} siècle dans lequel le "petit Muck" est atteint d'une photodermatite après avoir mangé des figues, dont la richesse en furocoumarines est aujourd'hui bien connue, et s'être exposé au soleil (Scott et al, 1976).

Cependant, même si les furocoumarines ont été employées traditionnellement par les médecines populaires, la renaissance de leur intérêt au sein de la science moderne n'a même pas cinquante ans. Lors d'une première étape en 1834, un chercheur du nom de Kalbrunner avait isolé la molécule de bergaptène (ou 5-méthoxypsoralène) à partir d'huile de bergamote mais aucune relation n'avait encore été établie entre ce nouveau composé et les propriétés médicales potentielles qu'il possédait (Folwks, 1959). La véritable redécouverte des possibilités thérapeutiques des furocoumarines remonte aux années 1938-1940 où Kuske a pu les identifier comme agents chimiques responsables de photodermatites chez certains végétaux (Kuske, 1938).

2/ Structure chimique.

D'un point de vue chimique, les furocoumarines sont des hétérocycles oxygénés correspondant à l'adjonction d'un cycle furane sur un noyau benzo- α -pyrone (ou coumarine). Il existe 12 façons différentes de condenser un cycle furane et un noyau benzo- α -pyrone (Folwks, 1959). Mais les furocoumarines les plus communément rencontrées dérivent de la structure du psoralène pour les formes linéaires et de l'angélicine pour les formes angulaires (Scott et al, 1976). La figure n°1 représente les formules chimiques des furocoumarines les plus communes.

3/ Propriétés biologiques des furocoumarines.

L'une des principales caractéristiques des furocoumarines est leur capacité à réagir sous l'action de la lumière. Ces molécules peuvent, en effet, être photoactivées par certaines radiations U.V. proches du domaine du visible (Song et Tapley, 1979). Leurs propriétés réactives peuvent alors s'exprimer de multiples façons. Ainsi, les furocoumarines sont capables de se transformer spontanément par action de la lumière pour donner divers produits de photodégradation. Cependant, la propriété biologique la plus remarquable résultant de la photoactivation est leur fixation sur les bases pyrimidiques des acides nucléiques (ADN et ARN). Il en résulte des actions mutagènes sur le génome, surtout importantes pour les furocoumarines linéaires avec des effets particulièrement marqués chez les microorganismes (propriétés bactéricides et fongicides).

La cycloaddition des furocoumarines sur l'ADN est à l'origine de leur efficacité dans le cas de maladies de peau comme le psoriasis. Dans un épiderme atteint, on assiste à un accroissement important de la synthèse d'ADN et à un raccourcissement du cycle de vie des cellules (Rodighiero et Dall'Acqua, 1976). Une photothérapie associant la prise orale de furocoumarines et une exposition des zones atteintes aux U.V. longs (365 nm) assure un retour à la normale. Une autre action des furocoumarines associée à la lumière est l'activation de la mélanogénèse de la peau. Cette propriété est mise à profit en cosmétologie où certaines crèmes bronzantes (Bergasol) assurent une pigmentation rapide de la peau lors des premières expositions au soleil. C'est également le principe de l'utilisation des furocoumarines dans le cas de dépigmentation de la peau (vitiligo). Il faut signaler toutefois que les propriétés de photoactivation des furocoumarines peuvent avoir des effets négatifs. Ainsi, la manipulation de végétaux contenant ces produits peut être à l'origine d'inflammations de la peau à la suite d'exposition à la lumière

(photodermatites). C'est le cas classique de la dermatite des ramasseurs de céleri, espèce connue pour contenir ces molécules en quantité pourtant moyenne (Beier et Oertli, 1983).

bergaptène

Cependant, les furocoumarines manifestent des propriétés intéressantes même sans l'action conjointe de la lumière. On a pu mettre en évidence un effet de certaines furocoumarines sur la régulation des rythmes biologiques circadiens. Le 8MOP (xanthotoxine) a une action stimulante très spécifique sur une hormone produite par la glande pinéale : la mélatonine. Or cette hormone libérée normalement avant le sommeil fait défaut chez certaines personnes insomniaques ou en état dépressif. L'intérêt du 8MOP est alors de régulariser très rapidement la production de mélatonine et d'améliorer l'état des patients sans pour autant manifester les arrières effets classiques des somnifères et antidépresseurs (Souêtre et al, 1989).

On comprend bien l'implication médicale aujourd'hui croissante des furocoumarines tant dans le traitement de maladies largement répandues (psoriasis : 2 à 5 % de la population) que dans le traitement de véritables maladies de société qui touchent un nombre encore plus important de personnes (insomnies, dépressions). Il y a donc un intérêt particulier pour l'industrie pharmaceutique à disposer de quantités importantes de furocoumarines. La source d'approvisionnement actuel est essentiellement l'essence de bergamote (*Citrus bergamia*) dont on extrait le bergaptol (psoralène avec une fonction alcool sur le 5ème carbone). Cependant, les surfaces réservées à cette culture sont relativement réduites (Sicile et Côte d'Ivoire). Quant à la synthèse chimique, elle est possible mais n'est pas rentable en raison de son coût élevé (P. Forlot, comm. perso.). Il semble donc intéressant de rechercher de nouvelles ressources végétales en furocoumarines qui pourraient satisfaire la demande croissante de l'industrie pharmaceutique.

4/ Ressources naturelles en furocoumarines.

La plupart des furocoumarines naturelles ont été isolées à ce jour à partir de végétaux, bien que quelques champignons aient également la possibilité d'en synthétiser (Scott et al, 1976).

Les furocoumarines se rencontrent principalement chez quatre grandes familles de végétaux supérieurs : les Légumineuses, les Ombellifères, les Rutacées et les Moracées; auxquelles il faut ajouter à un moindre titre les Orchidées (Scott et al, 1976). Le tableau n°1 répertorie les principaux genres de plantes à furocoumarines. Ces molécules sont le plus largement distribuées chez les Ombellifères : elles sont présentes chez toutes les tribus et dans quelques 35 espèces (Crowden et al, 1969).

Chez les Légumineuses, les genres *Psoralea* et *Coronilla* ne contiennent généralement que du psoralène et de l'angélicine, correspondant respectivement aux furocoumarines linéaires et angulaires les plus simples. Signalons toutefois qu'une troisième furocoumarine a été répertoriée à deux reprises chez les espèces *P. corylifolia* et *P. canescens* (Pathak et al, 1962; Innocenti et al, 1989). Il s'agit de la psoralidine, un dérivé du coumestrol.

Les Ombellifères, au contraire, recèlent une grande variété de furocoumarines. On y dénombre plus d'une vingtaine de molécules différentes (tableau n°2), mais uniquement quatre d'entre elles sont très fréquentes : Le bergaptène (5-MOP), la xanthotoxine (8-MOP), l'isopimpinelline (5-8-MOP) et l'impératorine (8-isopentenylloxypsoralène). La présence de psoralène ou d'angélicine n'est que rarement mise en évidence chez les Ombellifères. Le psoralène, en effet, n'est qu'un composé intermédiaire des chaînes de biosynthèse qui président à l'élaboration des furocoumarines plus complexes. A ce titre, il n'est pas, en conditions normales, accumulé par les végétaux de cette famille.

Chez les Rutacées, les furocoumarines les plus communément rencontrées sont : bergaptène, xanthotoxine, isopimpinelline et bergaptol. Les Moracées renferment essentiellement le psoralène et le bergaptène.

Si l'on compare les types de furocoumarines synthétisés d'une famille à l'autre, les Ombellifères se rapprochent des Rutacées et les Moracées des Légumineuses. Les disparités de distribution des furocoumarines d'une famille ou d'une espèce à l'autre sont probablement le reflet d'aptitudes de biosynthèse différentes et d'équipements enzymatiques spécifiques.

A ce propos, il est aujourd'hui possible de présenter une chaîne de biosynthèse des furocoumarines. Les recherches ont principalement été conduites à partir d'espèces appartenant à la famille des Ombellifères (Floss et Paikert, 1969; Brown 1970; Dall'Acqua et al, 1975; Innocenti et al, 1977) et ont porté essentiellement sur les furocoumarines linéaires. Les molécules précurseurs du psoralène sont : l'acide cinnamique, l'umbelliferone, la déméthylsuberosine et la marmesine (Brown, 1981). Le psoralène est ensuite substitué par une fonction alcool puis méthoxy sur le carbone 5 ou 8 pour donner respectivement le bergaptène ou la xanthotoxine (figure n°2). Il faut cependant noter qu'une voie de synthèse alternative de la xanthotoxine existe chez les Rutacées (Caporale et al, 1971; Dall'Acqua et al, 1972) et consiste en la transformation de la marmesine en rutaretine (figure 2bis). Les mécanismes biochimiques impliqués dans la

formation des furocoumarines angulaires sont comparables : la columbiaténine joue le rôle de la marmésine et l'osthénol celui de la déméthylsuberosine (Brown, 1981).

De même que la nature des furocoumarines dépend du type de végétal, leur localisation au sein de la plante varie d'une espèce à l'autre. On note cependant chez les Ombellifères, famille la plus étudiée, qu'elles s'accumulent préférentiellement dans les organes fructifères (Ivie, 1978; Ceska et al, 1987; Enriquez et al, 1984). Elles peuvent aussi être mises en évidence dans les parties végétatives (feuilles, racines, rhizomes), mais à des concentrations plus faibles (Steck, 1970; Innocenti et al, 1976).

La concentration des furocoumarines dans les organes de la plante évolue, de plus, en fonction du stade de développement du végétal. Ces problèmes ont été abordés chez *Ammi majus* (Abu Mustafa et al, 1970) et *Angelica archangelica* (Steck et Bailey, 1969). Ces derniers auteurs ont clairement mis en évidence une augmentation des teneurs en furocoumarines dans les parties végétatives (aériennes et racinaires) lorsque la plante atteint le stade de fructification.

5/ Comparaison des teneurs en furocoumarines.

La teneur en furocoumarines des plantes concernées est très variable :

- Elle dépend de l'espèce végétale. Le tableau n°3 reprend les teneurs en furocoumarines totales dosées chez différentes espèces. Les concentrations indiquées ne doivent être considérées qu'à titre indicatif, les protocoles d'extraction variant considérablement selon les auteurs. Une dizaine d'espèces sont naturellement bien pourvues en furocoumarines (teneurs supérieures à 1000 ppm par POIDS DE MATIERE SECHE de végétal) et pourraient constituer des ressources végétales de choix pour l'industrie pharmaceutique. Il s'agit de:

* *Psoralea corylifolia*, *Psoralea plumosa*, *Coronilla scorpioides*, *Coronilla glauca*, *Ammi majus*, *Angelica archangelica*, *Pastinaca sativa*, *Casimiroa edulis*, *Citrus bergamia* pour leurs fruits,

* *Heracleum lanatum* et *Ficus carica* pour leurs feuilles.

- La teneur en furocoumarines est aussi fonction de l'état sanitaire et physiologique de la plante, notamment chez certaines Ombellifères. Innocenti et al (1976) ont enregistré chez le persil (*Petroselinum sativum*) des teneurs en furocoumarines totales variant de 20 à 200 ppm selon le mois de récolte. Les plantes récoltées en automne et ayant subi les fortes températures estivales présentaient les concentrations les plus fortes, montrant, de

fait, que les furocoumarines sont produites de manière plus intensive quand la plante est soumise à certains facteurs de stress (déficit hydrique). Chaudhary et al (1985) ont enregistré des teneurs en furocoumarines totales jusqu'à 5 fois plus fortes pour *Apium graveolens* (céleri) infesté par un *Sclerotinia* par rapport à des individus sains. Le même phénomène a été observé chez le panais, *Pastinaca sativa* (Johnson et al, 1973) face à une attaque de *Ceratocystis*. Il semble que les furocoumarines linéaires (psoralènes, 5MOP, 8MOP et 5-8MOP) soient particulièrement impliquées dans la défense de la plante contre certains pathogènes chez les *Ombellifères* et jouent donc le rôle de phytoalexines (Beier et Oertli, 1983; Surico et al, 1987).

Ces molécules peuvent également avoir d'autres implications dans la plante : elles constituent des inhibiteurs de germination. Ainsi, les semences de persil ne peuvent germer que si ces composés hydrosolubles agissant comme régulateurs de dormance diffusent dans le sol. Une fois hors de la graine, les furocoumarines peuvent être à l'origine de phénomènes d'allélopathie : elles sont susceptibles d'inhiber la germination, puis la croissance des graines des espèces environnantes concurrentes (Kato et al, 1978). La berce (*Heracleum laciniatum*) utilise la même stratégie de lutte interspécifique (Juntilla 1976). Dans le sol comme au sein de la plante, les furocoumarines ont des propriétés fongicides et bactéricides désinfectant la zone de germination et contribuent ainsi à un bon état phytosanitaire des plantules (Juntilla 1976, Beier et Oertli, 1983).

En ce qui concerne les *Psoralées*, on signale aussi que les furocoumarines, et en particulier le psoralène, sont à l'origine d'inhibition de germination et d'allélopathie (Baskin et al, 1967), mais aucune donnée ne mentionne un rôle en tant que phytoalexine dans cette famille. Il en est de même chez les *Rutacées* et les *Moracées*.

II/ LES PSORALEES

L'intérêt représenté par les concentrations élevées contenues dans les plantes du genre *Psoralea* n'est pas récent, on a pu l'évaluer avec l'exemple historique de la *Psoralea corylifolia*. Il convient toutefois de signaler l'intérêt subit qu'ont pris les plantes australiennes du genre *Psoralea* suite aux travaux d'Innocenti et al (1984). Ces chercheurs italiens ont, en effet, réalisé des dosages de furocoumarines sur divers lots de semences. Ils ont pu montrer que certaines espèces recelaient des concentrations tout à fait intéressantes ; en particulier l'espèce *P. plumosa* dont les teneurs avoisinent celles de la légendaire *P. corylifolia* (voir tableau n° 4). La publication de ces résultats a été le point de départ de nos travaux et la raison de notre intérêt porté exclusivement aux *Psoralées* australiennes.

1/Classification systématique et répartition géographique.

D'un point de vue systématique, le genre *Psoralea*, L. appartient à la famille des Légumineuses, sous-famille des Papilionacées et tribu des *Psoraleae* (Boardley et al, 1986). Le genre comprend approximativement 120 espèces principalement réparties en Afrique du Sud, 45 espèces (Engler, 1906); en Amérique du Nord, 30 espèces (Torrey et Gray, 1838-43) et en Australie, 15 espèces (Keighery et Dixon, 1981). Cependant, les Psoralées sont également représentées en Asie, Amérique du Sud et dans tout le bassin méditerranéen. En France, on ne trouve qu'une seule espèce : *Psoralea bituminosa*, très courante dans tout le midi méditerranéen et qui tient son nom de la forte odeur de bitume qu'elle dégage lorsqu'on triture ses feuilles.

Il demeure d'importants problèmes de classification au sein du genre *Psoralea*. En effet, ces plantes sont en partie issues des "nouveaux mondes" : Amériques et Australie. Ces continents n'ont pas été l'objet d'études botaniques aussi exhaustives que la vieille Europe et les classifications établies par les botanistes des siècles passés à partir des végétaux européens s'adaptent parfois mal aux réalités de ces nouveaux pays (Boardley et al, 1986). Ainsi Lee (1980) s'est intéressée à un ensemble de Psoralées de l'Australie de l'Est traditionnellement classées en six espèces : *P.pallida*, *P. Patens*, *P. australasica*, *P. eriantha*, *P. dietrichae* et *P. discolor*. D'après son étude il semble inopportun de distinguer les trois dernières espèces qu'elle propose de regrouper avec les trois premières : *P.pallida*, *P. Patens*, *P. australasica*. A l'origine des confusions taxonomiques concernant les Psoralées australiennes, il faut aussi invoquer la grande variabilité morphologique au sein d'une même espèce encore compliquée par la possibilité de fécondations interspécifiques : entre *P. patens*, *P. australasica* et *P. pallida* par exemple (de Lacy et Britten, 1970).

2/ Ecophysiologie des Psoralées.

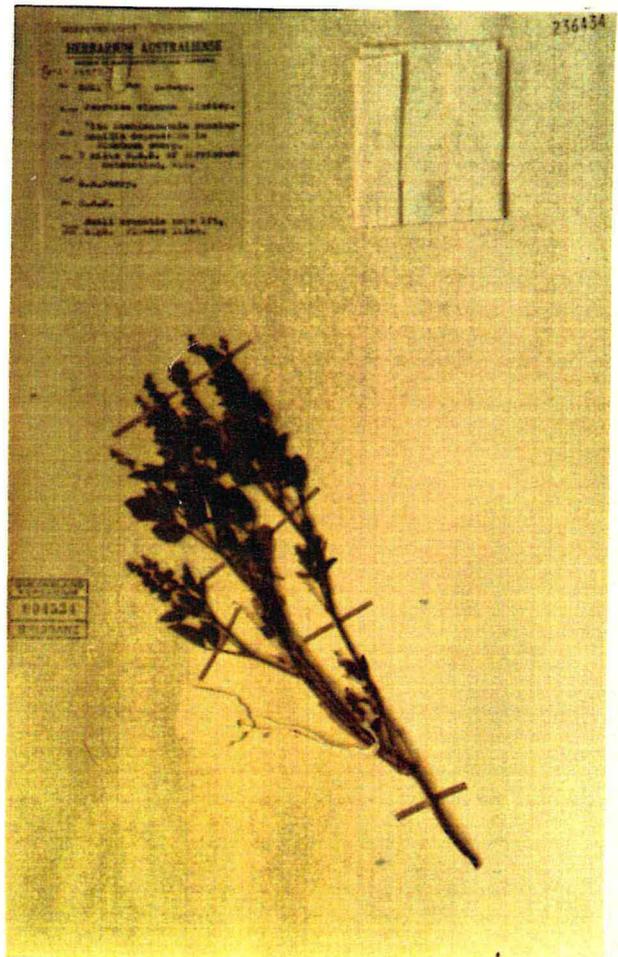
a/ Aire de distribution

D'une manière générale, les Psoralées peuvent être considérées comme des plantes de milieux difficiles. Les Psoralées australiennes se distribuent principalement dans les savanes boisées à *Eucalyptus* et à *Acacias* qui recouvrent la majorité du continent (Diels, 1906). Ce sont des zones semi-arides recevant 250 à 500 mm d'eau par an. Les précipitations se répartissent presque exclusivement durant le printemps austral. La période de végétation active des Psoralées correspond donc à cette saison où les températures sont élevées (moyennes minimales environ 18°C, moyennes maximales



Photo 1 : *P. cinerea*
individu à port erigé

Photo 2 : *P. cinerea*
individu à port prostré



environ 30°C) et l'humidité suffisante. Notons toutefois que certaines espèces se rencontrent jusque dans les zones semi-désertiques comme *P. martinii* et *P. plumosa* et également dans les régions côtières plus humides pour *P. cinerea*. Ce sont en définitive des plantes particulièrement bien adaptées au continent australien. La grande variabilité morphologique décrite précédemment a, en partie, pour origine l'extrême diversité des écosystèmes dans lesquels elles poussent et en particulier les différences de pluviométrie (de Lacy comm. perso.). La majorité des Psoralées australiennes affectionne des sols de type sableux à latéritique bien que les espèces plus tempérées comme *P. cinerea* et *P. australasica* correspondent plutôt à des sols brunifiés plus riches et proches de la neutralité. Les photographies n°1 et 2 représentent deux individus de *P. cinerea* récoltés dans deux régions différentes de l'Australie de l'Est et illustrent bien les phénomènes de variabilité.

En Afrique du Sud, les lieux de prédilection des Psoralées s'étendent de la région Nord-Ouest du Cap jusqu'au Natal et Transvaal. On peut trouver certaines d'entre elles dans des pâturages herbacés, d'autres affectionnent un milieu un peu plus sec constitué de formations buissonnantes (Engler, 1906).

Les Psoralées d'Amérique du Nord se rencontrent surtout dans les états du sud des Etats-Unis (Caroline du Nord, du Sud, Floride, Georgie, Tennessee, Missouri et jusqu'aux les Montagnes Rocheuses). Elles poussent généralement sur des sols sableux et pauvres (Torrey et Gray, 1838-43). Certaines espèces de Psoralées américaines ont la particularité de présenter un bulbe racinaire. Tel est le cas de *P. canescens*, *P. esculenta*, *P. megalantha* ou *P. mephitica* par exemple. Ces bulbes une fois cuits sont comestibles et étaient consommés traditionnellement par les Indiens et les premiers colons américains (Kirk, 1970).

L'espèce pérenne méditerranéenne *P. bituminosa* pousse sur des sols calcaires qui subissent de fortes sécheresses en été. Elle correspond donc bien, elle aussi, au profil des Psoralées que l'on rencontre dans des milieux difficiles.

b/ La nodulation chez les Psoralées.

Les Psoralées, en tant que Légumineuses, ont la possibilité de former des nodosités fixatrices d'azote lorsqu'elles sont associées à des bactéries symbiotiques du type *Rhizobium*. Cette aptitude est d'ailleurs connue depuis fort longtemps puisque Laurent en 1891 a décrit l'isolement des germes responsables des nodosités d'une espèce de Psoralée et les a utilisés pour des inoculations croisées sur des pois. Par la suite, les Psoralées ont souvent été décrites comme des Légumineuses nodulées (Bowen, 1956,

Grobbelaar et Clarke, 1972; Corby, 1974). Il semble désormais acquis que les symbiotes naturels des Psoralées sont des *Rhizobium* tropicaux à croissance lente maintenant classés parmi le genre *Bradyrhizobium* (Allen et Allen, 1981; Dorbec, 1985).

La contribution à la fixation d'azote par la symbiose Légumineuse-*Bradyrhizobium* a été peu étudiée sur le continent australien. Beadle (1964) rapporte cependant des exemples d'associations avec trois espèces de Psoralées australiennes. Les observations des systèmes racinaires ont révélé des différences dans la taille des nodules suivant les espèces végétales. *P. eriantha* possède peu de nodules et de petite taille (1 à 2 mm de diamètre); Beadle conclut d'ailleurs à l'inefficacité de cette association pour l'enrichissement des sols en azote. En revanche, les espèces *P. patens* et *P. tenax* sont plus largement nodulées et les nodules de plus grande taille (respectivement jusqu'à 7 mm et 5 mm de diamètre). Selon lui la contribution à la fixation d'azote atmosphérique est notable dans les écosystèmes où l'on rencontre ces espèces. Il semble donc impossible de se prononcer à priori sur le degré d'efficacité de l'association Psoralées-*Bradyrhizobium* vis à vis de la fixation de l'azote atmosphérique.

Les références bibliographiques sur le degré de spécificité de la symbiose Psoralées-*Bradyrhizobium* sont encore plus réduites. Appleman et Sears (1942) sont les seuls, à notre connaissance, à avoir tenté des inoculations croisées de diverses souches rhizobiales sur une Psoralée. L'espèce retenue a été une Psoralée d'Amérique du Nord : *P. onobrychis* et les souches rhizobiales ont été prélevées à partir de cette Psoralée et de 17 autres espèces appartenant chacune à des genres différents de Légumineuses. Les seules nodulations obtenues l'ont été avec des souches issues de : *P. onobrychis*, *Amorpha fruticosa* ("faux Indigo") et *Lespedeza stipulacea* (Lespedeza de Corée). L'expérience complémentaire consistant à inoculer les 18 espèces de Légumineuses à partir de la souche isolée de *P. onobrychis* n'a donné des nodules qu'avec cette même espèce. Il semble donc qu'une certaine spécificité de symbiose opère entre les Psoralées et les autres genres de Légumineuses. Cette spécificité n'est toutefois pas absolue. Il n'existe en revanche aucune donnée sur le degré de spécificité de la symbiose au sein même du genre *Psoralea*.

c/ Utilisation des Psoralées comme fourrage.

Outre leur utilisation en médecine traditionnelle, les Psoralées présentent un certain intérêt agronomique. La *Psoralea bituminosa*, plante spontanée des garrigues possède une bonne valeur pastorale et correspond à une plante intéressante pour la valorisation des zones arides méditerranéennes (Dorbec, 1985).

De la même manière, l'espèce australienne *P. eriantha* a été étudiée du point de vue de ses possibilités agronomiques. En effet, les pâtures australiennes tropicales et subtropicales sont généralement constituées d'espèces fourragères introduites artificiellement. Or ces espèces ont souvent une tolérance faible vis à vis des climats arides et semi-arides (Gutteridge et Whiteman, 1975). La recherche d'espèces locales plus résistantes semble donc une voie intéressante. A ce titre, des tentatives de production de fourrages ont été conduites en serres et en plein champ pour l'espèce *P. eriantha* (Kerridge et Skerman, 1968; Gutteridge et Whiteman, 1975). Après trois coupes, les rendements de matière sèche par plantes s'échelonnaient de 170 g à 390. g soit un rendement équivalent hectare de 1,7 à 3,9 t. Malheureusement ces expériences n'ont jamais été concrétisées par une application directe pour l'agriculture. Le problème majeur a été l'insuffisance de la production de semences en vue d'une extension des semis (Gutteridge, comm. perso.).

3/ Cycle de développement.

Les Psoralées ont fait l'objet de quelques études du point de vue de leur cycle de développement.

Baskin et al (1967) ont abordé les problèmes de la germination des semences d'une espèce de Psoralée américaine : *P. subacaulis*. Les graines manifestent, en effet, une double inhibition de germination :

-inhibition mécanique : causée par l'épaisseur et l'imperméabilité du tégument de la semence.

-inhibition chimique : due aux furocoumarines elles mêmes (en particulier le psoralène) contenues dans les semences. Pour l'espèce indienne *P. corylifolia*, ces produits sont essentiellement localisés dans le péricarpe du fruit et le tégument de la semence, on en trouve peu dans l'embryon (Cappelletti et al, 1984).

Innocenti et al (1984) ont également réalisé diverses observations au microscope électronique sur plusieurs espèces de Psoralées australiennes : *P. leucantha*, *P. lachnostachys*, *P. pustulata*, *P. martinii*, *P. cinerea*, et *P. plumosa*. Comme pour toutes les Psoralées, le fruit est une gousse uniloculaire monosperme indehiscente réniforme. Les fruits examinés montrent un épicarpe avec des excroissances en forme de dôme en relation avec des cavités sécrétrices. Seules *P. leucantha* et *P. martinii* parmi les espèces

étudiées présentent des semences glabres.

Les problèmes de floraison ont été abordés indirectement lors des essais de fourrage de *P. eriantha*. Les quantités faibles de semences récoltées proviennent d'une mauvaise fécondation. Les fleurs de cette espèce sont relativement fermées et une auto-incompatibilité pollinique a été mise en évidence. Elle peut être levée artificiellement en coupant la partie supérieure du stigmate (Gutteridge, comm. perso.).

La longueur des cycles de végétation des Psoralées est très variable. Certaines des espèces australiennes comme *P. martinii*, *P. lachnostachys*, *P. pustulata* sont pérennes. Elles adoptent alors un port buissonnant et peuvent atteindre des tailles importantes (jusqu'à 3 mètres de haut). D'autres, telles que *P. cinerea*, *P. australasica* ou *P. plumosa*, sont assimilées à des plantes de cycle annuel bien qu'elles puissent survivre pendant plusieurs années si les conditions rencontrées sont favorables. Ces espèces ont généralement un port herbacé et des tailles plus modestes qui ne dépassent pas 1,5 m de hauteur (Keighery et Dixon, 1981).

CHAPITRE II : ASPECTS BOTANQUES ET BIOLOGIQUES DE QUELQUES ESPECES DE PSORALEES AUSTRALIENNES

I/ INTRODUCTION.

Avant d'envisager l'emploi des Psoralées comme ressources végétales en furocoumarines, il nous a semblé primordial de connaître leur mode de croissance et de développement.

Dans cette étude, nous avons d'abord cherché à maîtriser la germination de quelques espèces de Psoralées. Puis, nous avons étudié, en conditions contrôlées, le cycle de développement avec un intérêt particulier pour la phase de floraison-maturation. L'obtention de semences nous est apparue capitale pour deux raisons essentielles :

- Il importait d'une part de pouvoir entretenir et même d'augmenter notre stock de semences en vue des essais futurs.
- Les semences, on l'a vu dans le cas des Ombellifères, sont souvent les organes privilégiés du stockage des furocoumarines et à ce titre il était important d'obtenir un cycle de végétation jusqu'à la fructification.

II/ MATERIELS ET METHODES.

1/ Matériel végétal.

Le jardin botanique de Perth (Australie) nous a fait parvenir des lots de semences de 7 espèces différentes de Psoralées : 6 d'origine australienne et 1 provenant d'Afrique du Sud. Les espèces australiennes étaient : *P. plumosa*, *P. martinii*, *P. lachnostachys*, *P. cinerea*, *P. pustulata* et l'unique espèce africaine : *P. obtusifolia*. Les récoltes de ces semences ont été effectuées entre 1975 et 1978. Nous nous sommes focalisés sur trois d'entre elles : *P. plumosa*, *P. martinii*, *P. cinerea*. Plusieurs critères nous ont guidé dans ce choix. *P. plumosa* avaient été identifiées comme particulièrement intéressante du point de vue des concentrations en furocoumarines (Innocenti et al, 1984). Les deux autres espèces, ont été choisies en considérant la longueur des cycles de végétation. *P. plumosa*,

étant une espèce annuelle, il nous a semblé intéressant d'étudier une autre espèce à cycle court (*P. cinerea*) et une de type pérenne (*P. martinii*).

2/ Tests de germination

Dans un premier temps, nous nous sommes inspiré du protocole de germination proposé par Baskin et al (1967) que nous avons modifié. Les semences, fournies par le jardin botanique de Perth ont été placées pendant 4 heures dans de l'eau chaude (60°C°), puis leur tégument a été entaillé en prenant garde de ne pas blesser les cotylédons (la semence étant exalbuminée). Les semences ainsi traitées ont été placées sur papier filtre humide, à 25°C et à l'obscurité.

Dans un second temps, nous avons expérimenté une scarification de type chimique. L'expérience a été conduite uniquement avec les espèces *P. cinerea* et *P. plumosa* pour des raisons d'économie de semences. Pour *P. cinerea*, nous avons réalisé 11 lots de 20 semences et chaque lot ont été mis à tremper dans 5ml d'acide sulfurique concentré pendant des temps variables. Les temps appliqués ont été : 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60 et 80 mn. Ces résultats acquis, nous n'avons testés que 5 temps de trempages différents sur l'espèce *P. plumosa* : 0, 25, 40, 60, 80 mn toujours sur des lots de 20 semences.

Le temps de trempage écoulé, la solution d'acide a été fortement diluée afin de stopper la scarification. Les semences ont été récupérées et rincées deux fois avec 200 ml d'eau distillée pendant 5 mn. Une fois séchées, les graines ont été mises à germer dans une étuve à 25°C à l'obscurité. Le taux de germination a été relevé tous les jours pendant une semaine.

3/ Culture des Psoralées

Les observations d'ordre biologique et botanique ont été effectuées avec des plantes obtenues par la méthode de scarification manuelle. Les semences une fois germées ont été disposées sur de la vermiculite humidifiée avec le milieu nutritif de Wood et al (1983). Au stade deux feuilles, les plantules ont été repiquées dans des pots individuels en plastique (10*10*11 cm) contenant 150 g de gravier et de sable dans le fond et 600 g de terre sableuse. La texture du sol a été choisie de manière à se rapprocher des conditions naturelles de croissance.

Les pots ont été placés dans un phytotron dont les conditions étaient les suivantes : température diurne de 25°C, température nocturne de 18°C, photopériode 15 heures, humidité 70%, éclairage 400 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. La terre des pots a été maintenue à une humidité correspondant à 2/3 de la capacité au champs.

NB: Les plantes de *P. cinerea*, *P. plumosa* et *P. martinii* qui nous ont servi pour les observations biologiques et botaniques rapportées dans ce chapitre sont en fait les mêmes plantes qui ont été utilisées pour l'expérience ~~en~~ d'inoculation croisée décrite dans le chapitre 3. Les problèmes de symbiose seront abordés ultérieurement mais il faut savoir que les descriptions qui vont suivre correspondent à des plantes de *P. cinerea* et *P. plumosa* inoculées avec la souche bactérienne CB 2063 et des plantes de *P. martinii* inoculées avec la souche USDA 3451.

4/ Etude de la vigueur des plantules

En cours d'expérience nous avons enregistré une hétérogénéité assez importante de la vigueur des plantules, surtout marquée pour l'espèce *P. cinerea*. Nous en avons recherché l'origine possible. Nous avons fait pousser 5 plantes mères de l'espèce *P. cinerea* en phytotron dans les mêmes conditions que précédemment. Nous avons alors récolté sur ces plantes les semences matures en fonction du rang de la feuille dont elles provenaient et déterminé les poids de 1000 grains correspondants à chaque rang foliaire. Des lots de 25 de ces semences issus des rangs foliaires 7 à 11 ont été mis à germer puis les plantes ont été repiquées comme précédemment dans des pots individuels au stade 2 feuilles. Au 20^{ème} jour après la germination, les hauteurs de plantes ainsi que le rang de la dernière feuille ont été mesurés.

III/ RESULTATS

1/ Germination

a/ Méthode manuelle.

En utilisant le premier protocole précédemment décrit pour des lots de 50 semences par espèce, nous avons obtenu des taux de germination de 90% pour *P. cinerea*, 96% pour *P. plumosa* et 80% pour *P. martinii* après 48h de séjour à l'étuve. Les seules semences qui n'ont pas germé présentaient des cotylédons ou embryons endommagés par des attaques d'insectes. En parallèle, nous avons testé la possibilité de germination de

lots de graines des trois espèces sans traitement à l'eau chaude ni scarification. Dans ce cas, le papier filtre présentait des auréoles brunes à la périphérie des semences, montrant effectivement la diffusion d'un composé hydrosoluble correspondant vraisemblablement au psoralène (Baskin et al, 1967). Toutefois, au bout de 15 jours, aucune germination n'a été constatée. Nous avons alors repris ces trois lots de 20 semences pour les scarifier manuellement. La germination s'est alors manifestée en 24 h (95%).

La méthode proposée par Baskin s'avère donc très efficace sur les deux *Psoralées* testées, et l'on peut confirmer la nécessité des deux interventions : trempage dans l'eau chaude et scarification.

En complément de ces observations, nous avons testé l'existence d'une dormance autre que les dormances chimique et mécanique déjà évoquées (en référence à la dormance physiologique thermodépendante d'un blé par exemple). Dans ce but, nous avons utilisé les semences récoltées après la première saison de végétation pour les espèces *P. cinerea* et *P. plumosa* uniquement. Cinquante semences par espèce ont ainsi été mises à germer moins d'un mois après leur récolté. Après traitement à l'eau chaude et scarification, nous avons enregistré des taux de germination de 95%. En conséquence, les graines obtenues dans nos conditions sont aptes à la germination et, il ne semble pas y avoir d'autre type d'inhibition de germination (dormance physiologique).

La méthode de scarification manuelle, si elle est très efficace, présente le désavantage d'être longue et fastidieuse (travail sous la loupe binoculaire). Elle nous a semblé particulièrement inadaptée au cas où nous voudrions réaliser des cultures de *Psoralées* à une plus grande échelle qu'en pots. Nous nous sommes donc intéressés à la méthode de scarification chimique.

b/ Méthode chimique.

Nous avons relevé le taux de germination (après 7 jours) pour chaque espèce et chaque temps de scarification. Pour *P. cinerea*, nous avons déterminé l'optimum de temps d'attaque à l'acide (95% de germination), qui se situe entre 40 et 45 minutes (figure n°3). En ce qui concerne *P. plumosa* (figure n°4), nous avons obtenu également un très bon taux de germination à 80 mn (95%) mais nous n'avons pas jugé nécessaire de tester des temps d'attaque plus longs. Par rapport à la scarification manuelle, il faut noter que la germination s'étale sur environ une semaine et non pas uniquement pendant les premières 48 heures (figures n° 5 et 6 pour respectivement *P. cinerea* et *P. plumosa*).

2/ Etude de la vigueur des plantules.

La figure n°7 représente la moyenne des hauteurs et stades foliaires pour les lots de 25 plantes issues des rangs foliaires 7 à 11. Nous avons également mesuré le poids moyen de 1000 grains correspondant à chaque rang foliaire.

Nous pouvons constater que le développement des plantules se fait d'autant mieux que les semences proviennent des fleurs de rang inférieur. Il semble que l'on puisse attribuer la différence de vigueur juvénile à des classes de poids différentes des semences selon leur situation sur la tige feuillée. Dans le cas de cette expérience, les plantes mères ont permis un remplissage correct des fruits pour les fleurs situées sur les niveaux foliaires les plus bas.

3/ Aspects morphologiques et botaniques.

La description des trois espèces de Psoralées a été faite à partir des plantes cultivées en chambre phytotronique. Le suivi des plantes a été réalisé sur une période de 4 à 5 mois selon les espèces : les données sur *P. martinii*, plante pérenne, correspondent donc à la 1ère année de végétation.

Les trois espèces présentent un port dressé : *P. cinerea* (photographie n°3) atteint une taille allant jusqu'à 60 cm. La hauteur de *P. plumosa* (photographie n°4) est de 30 cm, et celle de *P. martinii* (photographie n°5) légèrement inférieure après 5 mois.

a/ Tiges.

Psoralea cinerea possède une tige herbacée simple, rarement ramifiée. *P. plumosa*, en revanche, forme une tige herbacée ramifiée, lui donnant un aspect plus buissonnant. *P. martinii*, enfin, présente une tige qui se lignifie très vite et qui se ramifie de façon importante.

Les tiges sont pleines, à section ronde, à pourtour légèrement cannelé. Leur diamètre varie de 2 à 3 mm pour *P. cinerea* et *P. plumosa* à 5 mm pour *P. martinii*.

Alors que la tige de *P. cinerea* est recouverte de poils noirs épars, celle de *P. plumosa* et plus encore celle de *P. martinii* présente d'abondants poils blancs.



Photo 3 : *Psoralea cinerea*



Photo 4 : *Psoralea plumosa*



Photo 5 : *Psoralea martinii*

b/ Feuilles

Les feuilles sont caulinaires et adoptent une disposition alterne sur la tige. La longueur des entre-nœuds est importante pour *P. cinerea* (3 à 5 cm) mais faible pour les deux autres espèces (1 à 2 cm, voire 3 pour *P. plumosa*). La préfoliation est conduplicuée.

P. cinerea et *P. plumosa* présentent des feuilles imparipennées, à trois folioles inégales à partir de la 5^{ème} feuille, ovales, à bord denté. Les folioles de *P. cinerea* sont glabres et d'une couleur vert franc avec une surface de 2 à 4 cm². *P. plumosa* présente des folioles de surface plus petite (0.5 à 3 cm²) auxquelles l'abondance de poils blancs donne une couleur verte moins soutenue. Ces feuilles sont également glanduleuses et les nervures sont plus incurvées dans le limbe.

P. martinii se distingue des deux autres espèces par des feuilles simples, ovales, à bord denté dont la surface varie de 2 à 6 cm². Elles sont très velues, ce qui leur donne une couleur grisâtre.

Alors que *P. cinerea* possède un pétiole couvert de poils noirs épars, de section ronde à pourtour cannelé et d'une longueur de 2 à 5 cm, les pétioles de *P. plumosa* et *P. martinii* sont velus, à section ronde, mais plus courts (1 à 3 cm dans le 1^{er} cas et 1 à 1,5 cm dans le second).

Les trois espèces sont pourvues de deux stipules libres, triangulaires, persistants, d'une longueur de 2 mm. Chez *P. cinerea*, ces stipules sont partiellement soudés au pétiole et chez les deux autres espèces, ils sont velus.

c/ Inflorescences

Les inflorescences sont latérales sans bractées. Pour *P. cinerea* et *P. plumosa*, il s'agit d'épis composés dont les bourgeons latéraux donnent chacun trois fleurs. L'inflorescence peut regrouper de 15 à 60 fleurs chez *P. cinerea*, alors qu'il n'y en a que 12 à 30 chez *P. plumosa*. Les fleurs de *P. cinerea* (photographie n°6) sont de petite taille (3 à 4 mm), d'une couleur rose à violette, alors que celles de *P. plumosa* (photographie n°7) présentent une couleur mauve et une dimension de 5 à 8 mm. Les inflorescences sont acropètes. En ce qui concerne *P. martinii*, l'inflorescence est une ombelle composée de 6 fleurs violettes et blanches, de 0.8 à 1 cm de long.



Photo 6 : detail des fleurs de *P. cinerea*



Photo 7 : detail des fleurs de *P. plumosa*

Les pédoncules floraux sont longs pour *P. cinerea* (2 à 4 cm) et recouverts de poils noirs épars ; ils sont plus courts pour les deux autres espèces (1 à 2 cm chez *P. plumosa* et quelques mm chez *P. martinii*) et abondamment recouverts de poils blancs. Les trois espèces présentent une bractéole pour chaque groupe de trois fleurs.

Les fleurs sont zygomorphes, caractéristique des fleurs de Papilionacées. Le calice est campanulé, gamosépale, l'un des pétales étant plus long que les quatre autres. Il est recouvert de poils blancs et noirs chez *P. cinerea* et velu chez les autres espèces. La corolle est dialypétale, zygomorphe, les deux pétales de la carène étant soudés au niveau de leur bord supérieur. Les carènes sont très fortement appliquées aux ailes par leur partie médiane.

Les étamines sont diadelphes. L'ovaire est subsessile, supère, et ne contient qu'un seul ovule. Il est très poilu chez *P. plumosa* et *P. martinii*.

Le fruit est une gousse ovale indéhiscente ne contenant qu'une seule graine dépourvue d'albumen. Glabre pour *P. cinerea* (photographie n°9), il est très poilu chez *P. plumosa* (photographie n°10), couvert de quelques poils seulement chez *P. martinii* (photographie n°8). Le fruit de l'espèce *P. cinerea* est petit (3 mm de long), de même longueur que le calice. En ce qui concerne *P. plumosa*, il mesure 3 à 4 mm de long et les poils dépassent le calice. Pour *P. martinii*, les fruits légèrement plus volumineux atteignent 4 à 5 mm de long, et sont plus courts que le calice.

d/ Floraison et maturation des semences.

Les premiers bourgeons floraux sont apparus à l'aisselle des feuilles 40 jours après la germination chez *P. cinerea*, 70 jours chez *P. plumosa* et 90 jours chez *P. martinii*. L'émission des bourgeons, la floraison ainsi que la maturation des semences sont basifuges le long de la tige. En moyenne, il faut compter de 10 à 15 jours depuis l'apparition des bourgeons jusqu'à leur floraison.

Chez *P. cinerea*, les bourgeons sont apparus à l'aisselle des feuilles ; ils se sont développés normalement et les fruits sont arrivés à maturité 21 jours après la floraison.

Le premier bourgeon, chez *P. plumosa*, s'est développé à l'aisselle de la 6ème feuille mais les 2 ou 3 premiers bourgeons apparus par plante ont avorté. Nous avons observé une floraison à partir des rangs foliaires 8 ou 9, et ces fleurs ont fructifié normalement. Les semences sont arrivées à maturité 25 jours après la floraison.

Pour *P. martinii*, les bourgeons floraux issus des 9 ou 10 èmes feuilles ont fleuri et fructifié normalement, et les semences sont arrivées à maturité une vingtaine de jours après la floraison. Pour les autres niveaux foliaires, on a constaté une floraison abondante, comparable à celle observée sur les deux autres espèces. Cependant, très peu



Photo 8: Fruits de *P. martinii*



Photo 9: fruits de *P. cinerea* Photo 10: fruits de *P. plumosa*

de ces fleurs ont fructifié.

e/ Proposition de cycles de développement.

Les observations recueillies depuis la germination jusqu'à la floraison et la maturation des fruits permettent de proposer un cycle de développement pour les trois espèces étudiées (figures n° 8a, 8b, 8c). Dans nos conditions de culture, la phase de croissance végétative s'est étendue sur 40 jours pour *P. cinerea*, 90 jours pour *P. martinii*, soit plus du double pour l'espèce pérenne. *P. plumosa* occupe une position intermédiaire avec une phase végétative de 70 jours. Il est possible d'interpréter ces chiffres en termes de sommes de températures positives. Dans ce cas, les périodes de croissance végétative correspondent à environ 900 degrés jours pour *P. cinerea*, 1600 degrés jours pour *P. plumosa*, et 2000 degrés jours pour *P. martinii*. Si l'on s'intéresse à l'ensemble de la période de végétation, depuis la germination jusqu'à la fin de la fructification on obtient alors des sommes de températures de 2900 degrés jours pour *P. cinerea* et 3600 degrés jours pour *P. plumosa* et *P. martinii*.

IV/ DISCUSSION.

Après observation complète des cycles de développement des trois espèces : *P. cinerea*, *P. plumosa* et *P. martinii*, plusieurs points peuvent être soulignés.

En ce qui concerne la germination, il est intéressant de noter que les semences de Psoralées conservent leur pouvoir germinatif pratiquement intact sur une longue période. En effet, les semences de *P. cinerea* et *P. martinii* ont germé sans problème respectivement 10 et 13 ans après leur récolté. La double inhibition de germination combinée à la relative pérennité du pouvoir germinatif constitue, sans doute, comme le notaient déjà Baskin et al (1967) une adaptation aux conditions naturelles difficiles. La germination intervient vraisemblablement après une période où les semences ont été lessivées par de l'eau de pluie (assurant la diffusion du psoralène hors de la graine) doublée d'une alternance d'humectations et deshydratations qui doit faire céder le tégument, gage pour la plante que la réserve en eau du sol est suffisamment reconstituée.

Figure 8a **CYCLE DE DEVELOPPEMENT DE**
PSORALEA cinerea

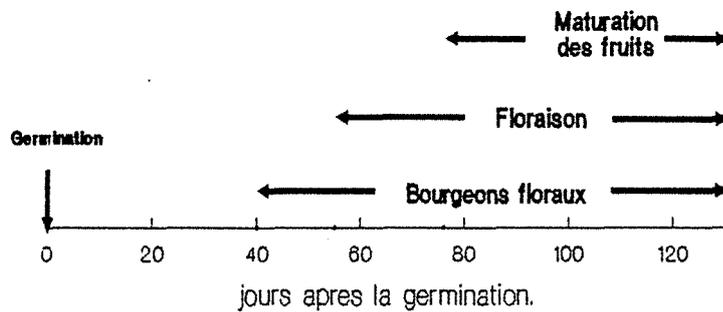


Figure 8b: **CYCLE DE DEVELOPPEMENT DE**
PSORALEA plumosa

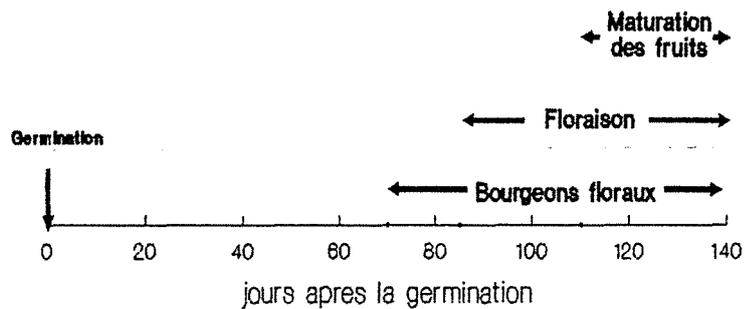
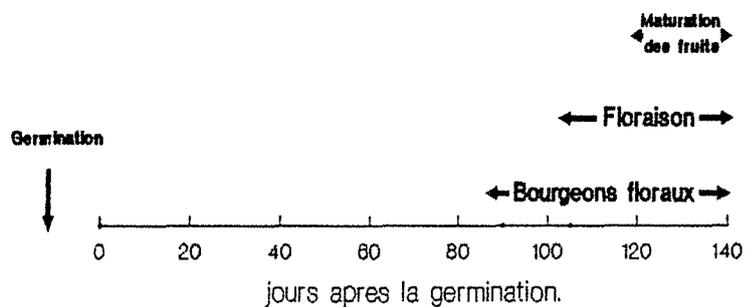


Figure 8c **CYCLE DE DEVELOPPEMENT DE**
PSORALEA martinii



L'expérience sur la vigueur juvénile des plantules a, quant à elle, démontré l'importance de la phase de remplissage des semences et de leur position sur la plante, pour l'obtention de plantes vigoureuses.

Quant au cycle de développement, il est important de noter que nous avons obtenu une fructification abondante pour deux des trois espèces étudiées : *P. cinerea*, et *P. plumosa*. La floraison/maturation est intervenue dans l'enceinte phytotronique confinée sans aucune intervention (ni insecte pollinisateur, ni manipulation humaine). Ceci confirme donc l'existence du phénomène d'autofécondation chez les Psoralées. Par ailleurs, nous avons ressemé quelques graines récoltées sur des plants de *P. cinerea* et *P. plumosa* en suivant le protocole de scarification manuelle. La levée est intervenue sans problème avec un pourcentage de germination comparable à ceux obtenus précédemment ce qui prouve effectivement la viabilité de nos semences. L'espèce *P. martinii*, au contraire, a mal fructifié et il semble bien que l'on puisse invoquer un phénomène d'incompatibilité pollinique empêchant l'autofécondation (Gutteridge comm. person.).

En ce qui concerne les sommes de températures, les valeurs déterminées (environ 3000 degrés jours) correspondent à des conditions climatiques typiquement semi-arides comme pour l'extrême sud de l'Europe. Ces résultats concordent donc avec les conditions climatiques des régions australiennes d'où les Psoralées sont originaires.

Cette première série d'observations nous a permis d'appréhender dans leurs grandes lignes quelques aspects de la biologie de trois espèces de Psoralées australiennes. Les résultats peuvent être considérés comme encourageants puisque les conditions de culture proposées semblent adaptées à un développement correct de ces plantes. Nous avons pu nous en assurer en comparant les trois espèces obtenues en conditions contrôlées avec des individus issus de leurs écosystèmes naturels australiens.

En complément à cette étude, il nous a semblé nécessaire d'approfondir le problème de la symbiose Psoralées/*Bradyrhizobium*. Il s'agissait d'évaluer l'importance des bactéries sur la croissance et le développement des plantes.

CHAPITRE III : EFFET DE L'INOCULATION BACTERIENNE ET DE LA FERTILISATION AZOTEE SUR LA CROISSANCE ET LE RENDEMENT DE TROIS ESPECES DE PSORALEES.

I/ INTRODUCTION.

Parmi les végétaux supérieurs, les Légumineuses se caractérisent par une nutrition azotée bimodale. Comme toutes les espèces végétales, elles peuvent assimiler directement l'azote minéral contenu dans la solution du sol grâce à l'activité de l'enzyme nitrate réductase. Cependant, elles ont également la possibilité d'utiliser l'azote atmosphérique par l'intermédiaire de bactéries symbiotiques de la famille des Rhizobiacées. Ces bactéries, une fois installées dans les racines des Légumineuses, sont capables de réduire l'azote de l'air en azote minéral par l'intervention de l'enzyme nitrogénase.

Nous avons pu voir dans le premier chapitre qu'il n'existe pratiquement aucune référence sur le degré d'efficacité de l'association Psoralées/*Bradyrhizobium*. Il nous a semblé important de tester l'incidence de cette symbiose sur le développement des Psoralées. En effet, un de nos objectifs à long terme pourrait être la production de furocoumarines par une culture de Psoralées, en serre ou au champ. En ce sens, l'obtention d'une biomasse élevée pourrait permettre une meilleure production de furocoumarine par unité de surface. Nous avons donc comparé l'effet de l'inoculation de diverses souches de *Bradyrhizobium* avec celui d'une fertilisation azotée sur la croissance, la production de biomasse et le rendement en semences pour les trois espèces de Psoralées décrites dans le chapitre II.

II/ MATERIELS ET METHODES.

1/ Mise en place de l'expérience.

a/ Choix des espèces végétales.

Dans une première expérience, nous avons retenu les espèces végétales qui ont été décrites dans le chapitre II : *P. cinerea*, *P. plumosa* et *P. martinii*. Nous avons appliqué le protocole de scarification manuelle énoncé précédemment et les mêmes conditions de cultures ont été conservées : préculture sur vermiculite puis repiquage en pots individuels à partir du stade deux feuilles.

Lors d'une seconde expérimentation, nous n'avons utilisé que l'espèce *P. cinerea* en suivant le même protocole de mise en culture. Il convient toutefois de noter que ces plantes ont été conduites en serre et non plus en phytotron.

b/ Choix des espèces de *Bradyrhizobium*.

Il nous a d'abord fallu résoudre le problème de l'approvisionnement en souches de *Bradyrhizobium*. En effet, ces bactéries de type tropical n'étaient pas sensées se trouver à l'état naturel dans nos sols tempérés. Nous avons donc fait appel à des collections internationales, celle de l'USDA notamment (United States Department of Agriculture), ou à des collections particulières de quelques microbiologistes australiens (Dr. Brockwell, Dr. Date, Dr. Lawrie, Dr. Pate). Parmi les bactéries dont nous avons pu disposer, nous avons choisi trois souches qui nous semblaient avoir certaines aptitudes pour induire la nodulation chez les Psoralées :

- CB 2063 : qui a été isolée d'un plant de *P. cinerea* en Australie (Brockwell, comm. person.).
- USDA 3100 : isolée de *Psoralea psoraloides* aux Etats-Unis (Keyser et Griffin, 1987).
- USDA 3451 : isolée de *Macrotyloma africanum*, en Afrique. Cette souche est connue pour faire noduler un grand nombre d'espèces de Légumineuses tropicales (Keyser et Griffin, 1987).

Les souches choisies ont été cultivées dans un milieu liquide à base de mannitol et d'extrait de levure ($0,4 \text{ g.l}^{-1}$) établi par Vincent (1970). Elles ont été inoculées à raison de 10^9 bactéries par plante environ. L'efficacité des souches n'a pas été suivie par des mesures d'activité réductrice d'acétylène (ARA), afin de ne pas perturber les plantes pour lesquelles nous cherchions essentiellement à connaître la biologie et le cycle de développement.

A la fin de l'expérience, nous avons examiné les racines en vue de tester la présence ou l'absence de nodosités.

c/ Protocole de l'expérience

Lors de la première expérience, nous avons réalisé 5 traitements comportant chacun 10 répétitions :

- Témoin : plantes non fertilisées et non inoculées
- Azote : plantes fertilisées avec du nitrate d'ammonium à raison de 50 unités d'azote par hectare.
- CB 2063 : plantes inoculées avec les bactéries de la souche CB 2063.
- USDA 3451 : plantes inoculées avec les bactéries de la souche USDA 3451.
- USDA 3100 : plantes inoculées avec les bactéries de la souche USDA 3100.

Nous avons retenu une dose d'azote de 50 unités d'azote par hectare, ce qui pourrait apparaître relativement faible. Ce choix a été fait car les Psoralées sont des plantes poussant sur des sols réputés pauvres (sableux à latéritiques).

Sachant que les premières nodosités ont été observées au stade 3 à 4 feuilles sur une plante du même genre (Beadle, 1964), nous avons inoculé les bactéries ou apporté l'azote au stade 4 feuilles.

Lors d'une seconde expérimentation, nous avons comparé l'effet de l'inoculation bactérienne de la souche CB 2063 avec une fertilisation azotée plus importante que précédemment. Pour cette expérience, nous avons réalisé trois traitements composés chacun de 20 répétitions :

- Témoin : plantes non fertilisées et non inoculées
- Azote : plantes fertilisées avec du nitrate d'ammonium à raison de 120 unités d'azote par hectare.
- CB 2063 : plantes inoculées avec les bactéries de la souche CB 2063.

2/ Suivi de la croissance - Estimation du rendement

a/ Suivi de la croissance

Nous avons réalisé des mesures biométriques à un rythme bi-hebdomadaire afin de comparer les croissances des plantes d'un traitement à l'autre. Les facteurs étudiés ont été :

- hauteur de la plante depuis le collet jusqu'au bourgeon terminal (permettant un suivi de la croissance des plantes à port dressé comme *P. cinerea*).

- nombre total de feuilles sur la plante (fournissant une bonne estimation de la croissance des plantes à port buissonnant comme *P. plumosa*).

Nous avons également noté pour chaque espèce et chaque traitement, l'apparition des bourgeons floraux, le début de la floraison et le stade de maturité.

b/ Estimation du rendement.

Les semences récoltées au fur et à mesure de leur maturation ont été placées pendant deux semaines à l'étuve à 25°C (température n'affectant pas le pouvoir germinatif des semences en vue de leur utilisation ultérieure) afin d'homogénéiser leur pourcentage d'humidité. La quantité totale de semences par espèce et par traitement a été pesée de façon à obtenir le rendement en grain. D'autre part, 3 échantillons de 100 semences ont été pesés, quand cela a été possible, en vue de déterminer le poids de 1000 grains par espèce et par traitement. Pour le premier essai correspondant à la dose d'azote la plus faible, nous avons étudié les composantes du rendement en grains en utilisant la formule suivante :

$$\begin{aligned} \text{rendement/plante} &= \text{nombre d'inflorescences/plante} \\ &\quad \times \text{nombre de fruits/inflorescence} \\ &\quad \times \text{nombre de semences/fruits} \\ &\quad \times \underline{\text{poids de 1000 grains}} \\ &\quad \quad \quad 1000 \end{aligned}$$

Lors de l'essai avec un niveau d'azote de 120 uN/ha nous n'avons pas étudié les composantes du rendement.

A la fin de l'expérience, les différents organes de la plante ont été séparés (racines, tiges, feuilles, fruits immatures), et séchés dans une étuve à 35°C pendant 2 semaines, de façon à obtenir le rendement en matière sèche des différents organes de la plante par espèce et par traitement.

3/ Analyse statistique.

Nous avons interprété les relevés biométriques bi-hebdomadaires par la méthode d'analyse de variance et le test de comparaison de moyennes de Newmann-Keuls.

III/ RESULTATS

A/ Effets comparés de diverses inoculations et d'une fertilisation azotée de 50 uN/ha.

Les observations se sont déroulées sur une période de 130 jours pour *P. cinerea* (équivalent à 2900 degrés jours si l'on considère 0°C comme base de température), 140 jours pour *P. martinii* et *P. plumosa* (soit 3090 degrés jours). Nous présentons d'abord les résultats relatifs à la croissance végétative puis ceux concernant les rendements en semences et la production de biomasse.

1/ Croissance végétative.

a/ Hauteur.

Les plantes atteignent, dans nos conditions de croissance, une hauteur maximale de l'ordre de 60 cm après 130 jours de végétation pour *P. cinerea* (figure n°9) et de 30 cm après 140 jours pour *P. plumosa* (figure n°10). L'espèce *P. martinii* est celle qui présente la croissance en hauteur la plus faible : moins de 30 cm pour les plantes les plus grandes 140 jours après le semis (figure n°11).

Pour les deux espèces *P. cinerea* et *P. plumosa*, on constate un effet significatif des traitements dès le 5ème jour après leur application. En revanche, ce même effet est plus long à se manifester pour *P. martinii* : il ne devient statistiquement significatif qu'à partir du 23ème jour après l'application des traitements.

Chez *P. cinerea*, les meilleurs résultats de croissance en hauteur sont obtenus avec la souche CB 2063, dès le dix-neuvième jour et la souche USDA 3451 dès le trente-septième jour. En revanche, chez *P. plumosa*, ces souches n'induisent qu'une croissance en hauteur moyenne, terminée par un plateau. Ce dernier correspond à la période de fructification de cette espèce pendant laquelle la croissance est ralentie. Les plantes inoculées avec la souche USDA 3100 ont eu une évolution comparable au témoin. Quant à l'espèce *P. martinii*, nous pouvons constater sur la figure n°11 que la meilleure croissance est obtenue avec la souche USDA 3451 qui se détache nettement des autres traitements vers le 40^{ème} jour après l'application des traitements.

b/ Nombre total de feuilles

Le nombre total de feuilles présentes sur la plante peut atteindre la douzaine pour *P. cinerea* et plus de 25 dans le cas de *P. plumosa*. *P. martinii* est capable de

développer un appareil photosynthétique beaucoup plus important. Au 140^{ème} jour de végétation, les plantes du traitement USDA 3451 possédaient 50 feuilles en moyenne. Cette aptitude doit être rattachée au port général de l'espèce *P. martinii* qui développe un nombre important de rameaux secondaires lui conférant une allure plus touffue.

L'influence des traitements est significative à partir du vingt-troisième jour pour *P. cinerea*, alors qu'elle ne l'est qu'au quarante-cinquième jour pour *P. plumosa*. Chez *P. cinerea* (fig. n°12), seul le traitement CB 2063 permet d'obtenir un nombre de feuilles important (les deux chutes observées sont dues à un stress hydrique involontaire). Chez *P. plumosa* (fig. n°13), les deux traitements CB 2063 et USDA 3451 conduisent à un nombre de feuilles important, alors que les plantes fertilisées à l'azote n'ont qu'un nombre de feuilles moyen. Les traitements témoin et USDA 3100 présentent un nombre total de feuilles constant : les plantes perdent leurs feuilles âgées qui sont remplacées par des feuilles nouvelles.

A partir du 60^{ème} jour, on note, pour les *P. cinerea* du traitement USDA 3451, un accroissement du nombre total de feuilles.

Dans le cas de *P. martinii* (figure n°14), nous avons enregistré un effet statistiquement significatif de l'inoculation/fertilisation sur le nombre de feuilles à partir du 61^{ème} jour, soit plus tard que pour les deux autres espèces. Comme nous l'avons vu, le traitement USDA 3451 se détache nettement. Le test de comparaison des moyennes ne parvient à aucun moment à dissocier les quatre autres traitements. On peut noter que les plantes fertilisées à l'azote ont un comportement à peine amélioré par rapport au témoin vis à vis du nombre de feuilles.

2/ Etude de la production de biomasse et des rendements.

a/ Biomasse des parties végétatives.

En plus des biomasses de feuilles, tiges et racines notre intérêt s'est également porté sur la quantité de fruits immatures, quand ils étaient présents, car ce sont souvent les parties les plus riches en furocoumarines (Innocenti comm. person.).

Les résultats sont très nets pour l'espèce *P. cinerea* (fig. n°15). Les meilleurs rendements sont obtenus avec la souche CB 2063 puis par le traitement USDA 3451. Sur l'ensemble des traitements, les biomasses de feuilles sont équivalentes à celles des racines, alors que les tiges représentent au moins deux fois la biomasse des feuilles. L'importance des tiges et la faible biomasse de feuilles est en relation avec le port dressé de cette plante.

Les résultats sont moins contrastés chez *P. plumosa* (fig. n°16). Si l'on excepte les valeurs relatives aux racines, les biomasses de parties aériennes les plus fortes ont été obtenues avec la souche USDA 3451 pour la quantité de feuilles et fruits immatures, et l'azote pour la quantité de tiges. Cependant, la quantité de biomasse aérienne reste faible (5g/10 plantes pour les tiges du traitement à l'azote) par rapport à celle observée pour *P. cinerea* (plus de 10g/10 plantes pour les tiges du traitement CB 2063). *P. plumosa* atteint, en effet, une hauteur moins importante que cette seconde espèce et présente un port plus touffu.

Dans le cas de *P. martinii*, les meilleurs résultats pour la biomasse aérienne ont été obtenus avec la souche USDA 3451 (figure 17). Les deux autres souches n'ont pas provoqué d'augmentation de rendement notable par rapport aux témoins. Les plantes fertilisées à l'azote présentent des rendements à peine améliorés par rapport aux témoins, mais qui ne se distinguent pas, en revanche des plantes inoculées avec la souche CB 2063.

b/ Rendements en semences et fruits immatures.

Les semences ont été récoltées sur des périodes de 64 jours pour *P. cinerea*, 57 jours pour *P. martinii* et 72 jours pour *P. plumosa*. Les histogrammes de rendements en grain (figure n°15 pour *P. cinerea*, n°16 pour *P. plumosa*, et n°17 pour *P. martinii*) confirment les résultats rapportés pour la croissance végétative. Les traitements les plus performants sont :

- la souche CB 2063 : 16.5g/10 plantes pour *P. cinerea*
17.5g/10 plantes pour *P. plumosa*
- la souche USDA 3451 : 17.2g/10 plantes pour *P. plumosa*
1.3g /10 plantes pour *P. martinii*.

Cette même souche n'a pas permis de rendements élevés chez *P. cinerea*.

Il est important de noter que les meilleurs rendements obtenus avec l'espèce *P. martinii* (traitement USDA 3451) restent toutefois très faibles puisque la récolte des semences sur 10 plantes excède à peine 1 gramme. Tous les autres traitements correspondant à cette espèce n'ont pas fructifié.

Le traitement azote a assuré une production moyenne de semences chez *P. plumosa* (6.3g/10 plantes) mais faible chez *P. cinerea* (1.3g/10 plantes). Comme pour la croissance végétative, les traitements USDA 3100 et témoins n'ont permis qu'une faible récolte de semences pour les deux espèces annuelles.

c/ Composantes du rendement en semences.

Nous avons déterminé les composantes du rendement pour les deux espèces qui ont fructifié abondamment : *P. cinerea* et *P. plumosa* (tableaux n°5a et 5b). En distinguant les résultats de *P. cinerea*, nous pouvons remarquer que tous les paramètres varient de manière importante selon les traitements. Il semble cependant que le nombre d'inflorescences par plante soit le paramètre le plus sensible à la nutrition azotée, suivi par le nombre de grains par inflorescence et, enfin par le poids de 1000 grains.

Pour l'espèce *P. plumosa*, il faut remarquer que le nombre d'inflorescences par plante est fortement dépendant du type d'inoculation ou de la fertilisation. En revanche, le nombre de grains par inflorescence et le poids de 1000 grains montrent peu de variations selon les traitements. Le paramètre discriminant le plus les deux espèces est le poids de 1000 grains.

d/ Etude de la présence de nodosités sur les racines

Les systèmes racinaires ont été observés au moment de la récolte pour les trois espèces de Psoralées. *P. cinerea* et *P. plumosa* inoculées avec la souche CB 2063 ont présenté des nodules d'un diamètre maximum de 3 mm. L'espèce *plumosa* inoculée avec la souche USDA 3451 a formé des nodosités pouvant atteindre un diamètre de 7 mm. *P. martinii* inoculée avec cette même souche USDA 3451 présentait des nodules de taille intermédiaire d'un diamètre maximal de 5 mm. Dans tous ces cas, les nodules étaient uniformément répartis sur la masse racinaire.

En revanche, les nodosités apparues chez *P. cinerea* inoculées avec USDA 3451 avaient le même aspect que celles formées par la souche CB 2063, mais ne se localisaient que sur la périphérie du système racinaire correspondant à des racines jeunes. L'espèce *P. martinii* bactériisée avec la souche CB 2063, les plantes inoculées avec la souche USDA 3100 ou fertilisées avec de l'azote et les témoins n'ont pas formé de nodosités.

B/ Effets comparés d'une inoculation et d'une fertilisation azotée de 120 uN/ha.

A la vue des résultats de l'expérience précédente montrant l'action de la souche CB 2063 sur la croissance et les rendements de *P. cinerea*, il nous est apparu intéressant de conduire une culture de ces plantes en serre. L'objectif majeur était de comparer une nouvelle fois la croissance et les rendements sur la base d'une fertilisation azotée plus intense.

1/ Croissance végétative.

Les figures n°18 et n°19 illustrent la croissance en hauteur et l'évolution du nombre total de feuilles pour cette expérience. L'effet du facteur fertilisation/inoculation est apparu significatif sur la hauteur dès le 43^{ème} jour après la germination (soit 12 jour après l'application des traitements). Les plantes ayant eu un apport d'azote ont eu une croissance en hauteur importante et constante. L'effet de l'inoculation par la souche CB 2063 n'a été notable qu'à partir du 34^{ème} jour après l'apport des bactéries (comparaison des moyennes avec les témoins). Dès lors, la croissance de ces plantes a été comparable au traitement azote qui néanmoins présente une taille moyenne plus importante en raison de l'avantage pris au départ. Nous pouvons observer un léger retard de la manifestation des effets de l'inoculation par rapport à l'expérience en phytotron (19^{ème} jour).

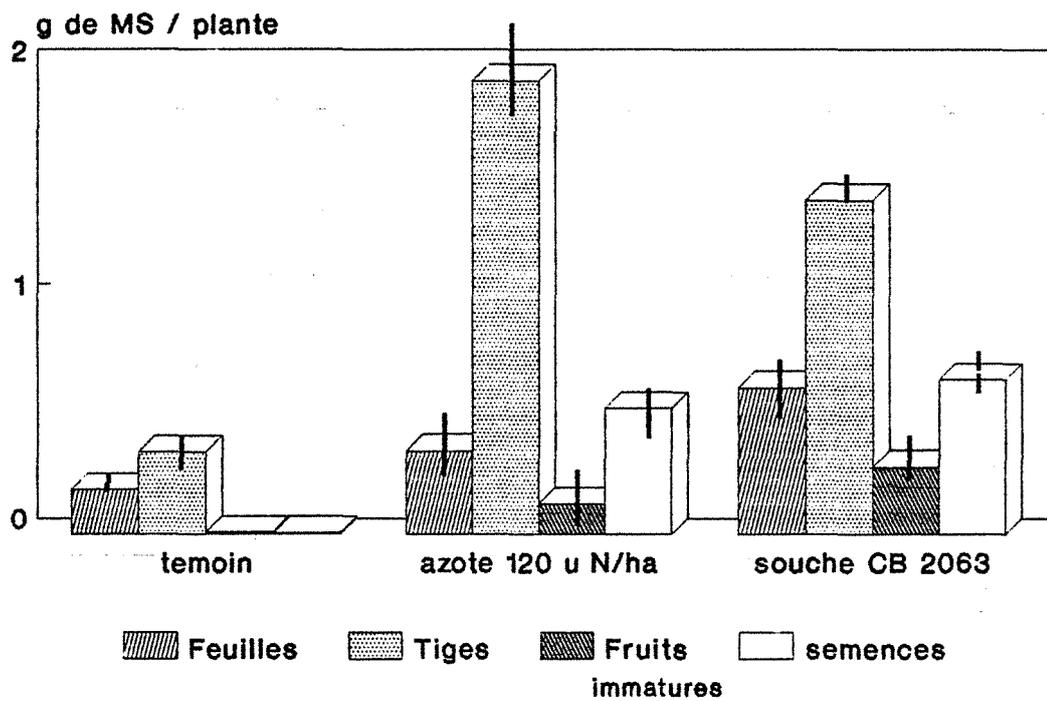
Si l'on s'intéresse au nombre total de feuilles (figure n°19), on remarque que les plantes fertilisées avec de l'azote atteignent très vite une biomasse plus importante que les plantes inoculées. En revanche, ces dernières rattrappent le traitement azote à partir du 35^{ème} jour. Les plantes bactérisées ont donc globalement un nombre de feuilles plus important que les plantes fertilisées à l'azote à hauteur de plante égale. Le lot fertilisé à l'azote a manifesté une sénescence des feuilles plus rapide ; en général la taille des feuilles était également plus réduite que dans le cas des plantes inoculées.

2/ Production de biomasse.

La production de biomasse n'a été mesurée que pour les parties aériennes : feuilles, tiges, fruits immatures et semences (figure n°20). La récolte finale a été effectuée au 160^{ème} jour après la germination, alors que les semences ont été récoltées tout au long de la période de fructification pour éviter les pertes. Pour ce qui est des feuilles, fruits immatures et semences, les meilleurs rendements ont été obtenus pour la souche CB 2063 puis pour le traitement à l'azote. La fraction des tiges est la seule pour laquelle la fertilisation azotée a conduit au rendement le plus important.

Les systèmes racinaires ont été observés. Seul le traitement inoculé avec la bactérie CB 2063 était nodulé et la macromorphologie des nodules était comparable à celle décrite dans l'expérience précédente.

Figure 20: Effet des différents traitements sur le rendement de *P. cinerea* en serre.



IV/ DISCUSSION.

L'application d'une dose d'azote équivalente à 50 u/ha n'a eu qu'un effet médiocre sur la croissance et le rendement des plantes. En effet, pour *P. cinerea*, les paramètres de la croissance végétative (hauteur et nombre total de feuilles) ainsi que les rendements en grains et la production de matière sèche sont faibles. Nous pouvons énoncer les mêmes conclusions pour *P. martinii*. L'espèce *P. plumosa* n'a pas mieux réagi à l'apport d'azote : seuls les rendements en racines et en tiges sont élevés. Nous avons effectivement noté une meilleure croissance en hauteur chez les plantes fertilisées avec de l'azote, alors que les traitements USDA 3451 et CB 2063 ont stoppé leur croissance linéaire lors du début dès le début de l'importante période de fructification.

La dose d'azote de 50 u/ha semble avoir été trop faible pour assurer une croissance équivalente à celle obtenue par des inoculations efficaces. Ceci semble confirmé par les résultats de l'expérience en serre sur *P. cinerea*. En effet, la croissance observée avec une dose d'azote plus importante (120 unités de N/ha) est comparable à celle des plantes inoculées. Ces résultats témoignent d'une part des exigences importantes de ces plantes en matière de nutrition azotée - ce qui peut paraître surprenant pour des plantes considérées généralement comme se satisfaisant de sols pauvres-. D'autre part, ils démontrent la forte efficacité des souches de *Bradyrhizobium* tropicaux testés. Or, ceci peut paraître relativement surprenant car certains auteurs considèrent que la contribution de ces souches à la fixation d'azote est faible. Ainsi Lawrie (1981) rapporte une fixation d'azote maximale équivalente à $0,75 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{an}^{-1}$ pour 7 espèces différentes de Légumineuses australiennes. De la même manière, Langkamp et al (1979) évaluent la fixation d'azote atmosphérique d'une plantation d'Acacias en Australie à $12 \text{ kg de N} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{an}^{-1}$. Dans le cas de nos expérimentations, la fixation d'azote, lorsqu'il y avait nodulation effective, semble atteindre des valeurs dix fois supérieures.

C'est avec la souche CB 2063 que nous avons obtenu les meilleurs résultats de croissance et rendements pour l'espèce *P. cinerea*. Cette souche CB 2063 ayant elle même été isolée d'un plant de *P. cinerea* en Australie, sa spécificité est donc bonne. Parallèlement, CB 2063 a également permis de bonnes croissance et fructification de l'espèce *P. plumosa*. Une même souche peut donc établir une symbiose avec plusieurs espèces du genre *Psoralea*.

La souche USDA 3451 associée avec *P. plumosa* a donné des résultats de croissance et rendements comparables à ceux obtenus avec la souche CB 2063. Or, cette souche a été isolée d'une légumineuse africaine (*Macrotyloma*), on peut conclure qu'elle est apte à faire noduler des plantes n'appartenant pas au même genre. Ces résultats sont confirmés

par le comportement de *P. martinii* en présence de cette même souche USDA 3451. Dans ce cas particulier, c'est la seule bactérie ayant conduit à la nodulation. Il peut apparaître comme un paradoxe écologique que cette souche isolée d'un sol africain soit plus apte à la symbiose avec une Légumineuse d'un genre étranger qu'une souche isolée d'une Psoralée australienne. La spécificité de la souche USDA 3451 est donc faible ce qui confirme les observations de Keyser et Griffin (1987).

Quant aux résultats de l'association USDA 3451 X *P. cinerea*, nous avons déjà insisté sur la localisation des nodosités à la périphérie du système racinaire, sur les racines jeunes, et sur leur ressemblance avec ceux de la souche CB 2063. Ces deux observations et l'apparition tardive de l'effet de l'inoculation de la souche USDA 3451 conduisent à penser que ce traitement a été contaminé en fin d'expérimentation par des bactéries de la souche CB 2063. En fait, la souche USDA 3451 n'a pas été capable d'établir une symbiose avec *P. cinerea* dans nos conditions expérimentales.

Pour les trois espèces de *Psoralées* étudiées, la souche USDA 3100 n'a pas formé de nodosités, bien qu'ayant été isolée d'une *Psoralée* américaine. Les résultats de croissance et rendement de ce traitement appliqué aux trois espèces ont été en tous points comparables à ceux obtenus avec les témoins. En ce qui concerne les témoins, il faut également signaler qu'aucun des deux lots de plantes n'a présenté de nodosités sur son système racinaire : les *Rhizobium* présents à l'état naturel dans le sol n'ont pas pu établir de symbiose avec les *Psoralées*.

Ces expériences sur la culture des *Psoralées* ont également révélé des phénomènes qui ne transparaissent pas dans les courbes de croissance et de rendements mais qu'il convient de rapporter ici. En particulier, les trois espèces de *Psoralées* nous sont apparues comme des plantes supportant mal le manque d'eau. Nous les avons arrosées pratiquement tous les deux jours. Ceci confirme que les *Psoralées* australiennes étudiées sont des espèces de régions semi-arides mais qui se développent pendant la saison la plus humide correspondant au printemps austral.

Malgré le faible nombre de souches testées (trois), et en dépit de l'absence de références bibliographiques concernant la croissance, la fructification et la nodulation des *Psoralées*, nous avons pu déterminer, en système de culture contrôlé, des conditions de végétation satisfaisantes pour les trois espèces étudiées : *P. cinerea*, *P. plumosa* et *P. martinii*. La souche CB 2063, pour *P. cinerea* ainsi que les souches CB 2063 et USDA 3451 pour *P. plumosa* assurent une bonne croissance végétative ainsi qu'une optimisation des rendements en semences. Dans le cas de *P. martinii*, la souche USDA

3451 a conduit à une production importante en parties végétatives mais a eu peu d'incidences favorables sur la fructification. L'espèce *P. martinii* semble donc moins adaptée à l'objectif d'une production de furocoumarines par culture en serre car se poserait alors un problème délicat d'obtention de semences.

En complément de la production de biomasse, il paraît important de préciser la localisation et la quantité de furocoumarines présentes pour chacune des trois espèces afin de déterminer l'intérêt respectif de chaque organe.

CHAPITRE IV : ETUDE DE LA DISTRIBUTION ET DES TENEURS EN FUROCOUMARINES CHEZ TROIS ESPECES DE PSORALEES AUSTRALIENNES.

I/ INTRODUCTION.

Le niveau de production de furocoumarines par une culture végétale peut être défini comme le produit de la biomasse récoltée par la concentration moyenne de ces molécules dans les plantes. Il est donc important d'optimiser la concentration en furocoumarines en même temps que la production de biomasse. Dans le cas des trois espèces végétales étudiées précédemment, nous avons pu voir que les rendements en semences et la production de biomasse n'étaient pas très élevés par plante. L'étude de la distribution et des teneurs en furocoumarines de ces végétaux apparaît donc d'autant plus importante.

Dans un premier temps, nous avons identifié les furocoumarines présentes puis analysé les teneurs dans les différents organes des trois espèces de Psoralées : *P. cinerea*, *P. martinii*, et *P. plumosa*. Les dosages ont été effectués à partir des récoltes de l'expérience avec les niveaux de fertilisation azotée de 50 uN/ha (feuilles ou tiges, fruits immatures et semences). Nous avons également analysé les échantillons correspondant à l'expérience en serre avec une fertilisation azotée équivalente à 120 uN/ha (*P. cinerea*).

Lors d'une seconde étape, nous avons cherché à compléter ces résultats en testant différents facteurs susceptibles d'accroître la synthèse des furocoumarines. Ainsi, nous sommes nous intéressés à l'effet de températures élevées sur la production en furocoumarines. Ce type de démarche avait été entrepris par Innocenti et al (1976) montrant l'incidence de fortes chaleurs sur la synthèse de furocoumarines par le Persil.

Chez certaines Ombellifères, l'état sanitaire de la plante interfère également sur la production de furocoumarines. Les teneurs peuvent être fortement augmentées lorsqu'une attaque d'organismes pathogènes intervient. Le rôle des furocoumarines comme phytoalexines a été clairement démontré pour cette famille végétale. Nous avons repris une démarche analogue sur les Psoralées étudiées et avons cherché à établir si, dans ce cas, les furocoumarines pouvaient également jouer le rôle de phytoalexines, ce qui constituerait un moyen d'accroître la concentration en ces molécules. Il a donc fallu choisir un traitement qui serait capable d'activer une réaction de type phytoalexine chez les végétaux. Or, certains produits chimiques comme le NaCl, le CuSO₄ ou le CaOCl sont connus pour déclencher la production de phytoalexines chez le céleri (Beier et Oertli,

1983). Nous avons donc testé l'effet de ces divers traitements chimiques appliqués aux parties aériennes.

II/ MATERIELS ET METHODES.

1/ Matériel végétal.

Pour le dosage des furocoumarines, nous avons utilisé, dans un premier temps, le matériel végétal (*P. cinerea*, *P. plumosa* et *P. martinii*) récolté à partir des expériences antérieures (chapitre III). En ce qui concerne l'étude de l'effet de la température et des traitements chimiques, nous avons retenu l'espèce *P. cinerea* (suite aux premiers résultats de dosages sur les trois espèces de Psoralées).

Ces plantes ont été cultivées dans des pots isolés et inoculées avec la souche CB 2063 à raison de 10^9 bactéries par pot. La terre a également été fertilisée avec une dose d'azote équivalente à 80 unités de N par hectare afin de ne pas se trouver en situation d'azote minéral limitant. Les plantes ont été arrosées jusqu'à leur récolte au 2/3 de la capacité au champ.

2/ Traitements.

a/ Expérience "température".

L'expérience s'est déroulée avec une seule espèce : *P. cinerea*. Nous avons étudié le facteur température avec deux variantes : une température haute et une température basse dont les moyennes journalières étaient respectivement 31°C et 20°C. Nous avons récolté les plantes à deux stades différents de leur cycle de développement : au stade "bourgeons floraux" qui correspond à la fin de la période végétative et au stade "maturité des semences" coïncidant approximativement avec le milieu de la période de fructification. Pour chaque stade de récolte et pour chaque température nous avons fait pousser un lot de 10 plantes (10 répétitions).

Cet essai a été réalisé à l'aide de deux phytotrons dans lesquels les conditions étaient les suivantes :

- Photopériode de 15 heures.
- Humidité relative de 75%.

- luminosité de $400 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.
- Phytotron n°1 : température de jour de 34°C, température de nuit de 28°C, moyenne journalière de 31,7 °C.
- Phytotron n°2: température de jour de 23°C, température de nuit de 17°C, moyenne journalière de 20,7°C.

Au cours de l'expérience, nous avons réalisé un relevé biométrique une fois par semaine afin de suivre la croissance des plantes.

Après 52 jours de culture, les deux lots de plantes placés jusque-là dans les mêmes conditions (équivalentes à celles du phytotron n°2), ont été séparés pour être disposés dans leurs phytotrons respectifs à des températures différentes.

Lors de la première récolte (fin du stade végétatif), nous avons dosé les furocoumarines présentes dans les feuilles. A la deuxième récolte, nous avons également quantifié les furocoumarines des parties reproductrices (semences et fruits immatures).

b/ Expérience "phytoaléxines".

Le facteur étudié a été la concentration en furocoumarines dans les divers organes de la plante : feuilles pour les parties végétatives, fruits pour les organes reproducteurs.

Lors d'une expérience préliminaire, nous avons déterminé les doses létales pour les trois produits chimiques et nous avons retenu des doses sub-létales : NaCl 3%, CuSO₄ 10⁻² M, CaOCl solution à 25% diluée au 1/75.

Chaque traitement : témoin, CuSO₄, CaOCl, NaCl se composait de deux séries de 10 plantes. La première série a été traitée deux fois (pulvérisation de solutions salines ou d'eau pure dans le cas des témoins). Les plantes correspondantes ont été récoltées à la fin de la période végétative (lors de l'émission des premiers bourgeons floraux) et les feuilles ont été analysées. La seconde série a été soumise à quatre traitements successifs. Les plantes ont été récoltées durant la phase de maturation des fruits de manière à effectuer des dosages sur les feuilles, fruits et semences issus de chaque traitement. Nous avons également réalisé un relevé biométrique hebdomadaire afin de suivre la croissance des plantes.

3/ Identification et dosage des furocoumarines des végétaux.

a/ Extraction des furocoumarines des fractions végétales.

Nous avons utilisé la méthode d'extraction des furocoumarines proposée par Innocenti et al (1984). Ce protocole est fondé sur la solubilité préférentielle de ces molécules dans les solvants organiques comme le méthanol ou l'éther de pétrole par rapport à l'eau (Prognon et al, 1985). Il utilise également la propriété de recyclisation du cycle lactone des furocoumarines en milieu acide. Chaque fraction de végétal récoltée a subi le protocole de la figure 21 :

- pour chaque dosage, la prise d'essai a été de l'ordre de 3 g de matière sèche.
- extraction au Soxhlet avec du méthanol bouillant pendant 48 heures (fraction I).
- les fragments végétaux sont repris par une attaque à l'acide (HCl 5%) à chaud durant deux heures. On sépare la fraction H₂O-acide des fragments végétaux par filtration.
- les fragments végétaux sont repris à nouveau dans un Soxhlet avec du méthanol bouillant pendant 48 heures (fraction II).
- la fraction H₂O-acide est extraite avec un perforateur de Jalade avec de l'éther de pétrole pendant 48 heures (fraction III).

La fraction I représente les furocoumarines sous forme libre dans le végétal, les fractions II et III correspondent aux furocoumarines sous forme glycosidée.

b/ identification et dosage des furocoumarines.

Les furocoumarines des fractions végétales ont été identifiées par chromatographie sur couches minces par comparaison avec des étalons purs. Nous avons utilisé des plaques Merck, prêtes à l'emploi avec indicateur de fluorescence à 254 nm (référence : gel de silice 60F-254, épaisseur : 0,25 mm). Les étalons purs de furocoumarines ont été obtenus auprès des sociétés Extrasynthèse pour le psoralène, la xanthotoxine, l'angélicine et l'isopimpinelline et Bergaderm pour le bergaptène. Le solvant employé a été le chloroforme.

Le dosage quantitatif des furocoumarines a été réalisé par chromatographie liquide à haute performances (HPLC). Nous avons employé la méthode d'Innocenti et al (1984). Chaque fraction végétale a été quantifiée en utilisant un étalon interne. Celui-ci a été choisi après la phase d'identification des furocoumarines. Nous avons retenu la xanthotoxine car il s'agit d'une furocoumarine absente dans les Psoralées que nous avons analysées. Nous avons réalisé une gamme étalon pour chacune des furocoumarines présentes chez les Psoralées : le psoralène et l'angélicine. Les courbes de calibration ont été obtenues en préparant des solutions qui contenaient une quantité constante de psoralène et d'angélicine (0,2 mg) et une quantité variable de xanthotoxine (0,1 mg à 0.6 mg). Pour les deux furocoumarines dosées, nous avons obtenu une très bonne corrélation pour les points de la courbe :

$$\frac{\text{aire Etalon}}{\text{aire produit}} = f \left(\frac{\text{mg étalon}}{\text{mg produit}} \right)$$

avec une droite de régression. Pour la gamme de furocoumarines dosées, la réponse enregistrée a été pratiquement linéaire. Il est à noter que cette droite passe par l'origine (cf annexe n°1).

Les mesures ont été effectuées sur deux modèles d'HPLC différents :

- un appareil Waters constitué de pompes du modèle 510, d'un spectrophotomètre de type et d'un injecteur U6K.

- un modèle Beckman composé de deux pompes modèle 126 d'un détecteur de type 166 et d'un passeur d'échantillon SP8780.

Dans les deux cas, nous avons employé une colonne constituée d'une phase normale (Merck LiChrosorb, Si 60 7 μ m) d'une longueur de 25 cm et d'un diamètre intérieur de 4 mm. Nous avons également monté une précolonne du même modèle mais d'une longueur de 2,5 cm. Le gel de silice de cette précolonne était changé, en moyenne, toutes les 10 injections d'échantillons.

Pour la détection des furocoumarines, nous avons utilisé un spectrophotomètre réglé sur 300 nm. Cette longueur d'onde caractérise l'absorption des cycles lactones (Yeagers et Augenstein, 1965).

Le mélange de solvants constituant la phase mobile comprenait du N-hexane et du chloroforme en proportion 70/30.

III/ RESULTATS.

1/ Dosage des furocoumarines.

a/ Etude de la précision de la méthode de dosage des furocoumarines.

Nous pouvons identifier les sources d'erreurs dans la méthode de dosage proposée :

- une certaine erreur est due à la limite de la méthode d'extraction des furocoumarines. Innocenti a pu montrer (comm. perso.) qu'au terme des temps d'extractions proposés (48 heures pour les fractions I II et III) on n'augmentait pas la quantité de furocoumarines extraites.

- une part de l'erreur peut être attribuée à une certaine imprécision lors de l'ajout de l'étalon interne.

- enfin, il existe une certaine variabilité due au dosage à l'HPLC si l'on injecte deux fois le même échantillon.

La première source d'erreur ne nous a pas préoccupés outre mesure. En effet, dans le cas où l'on chercherait à produire des furocoumarines en utilisant des cultures de Psoralées, ce reliquat de furocoumarines ne serait pas non plus extractible. Il présente donc peu d'Intérêt.

Les deuxième et troisième sources d'erreur ont été évaluées globalement en dosant les furocoumarines dans un échantillon pour lequel nous connaissions déjà les teneurs en psoralène et angélicine. Pour cela, nous nous sommes procuré un végétal qui ne contenait pas de furocoumarines (blé). Nous avons prélevé une prise d'essai équivalente à celle utilisée avec les Psoralées (environ 3 grammes de matière sèche) et avons ajouté lors de la première extraction au Soxhlet une quantité connue de psoralène et d'angélicine. L'échantillon a alors été traité selon le protocole de dosage décrit plus haut. Au moment du dosage à l'HPLC, chaque fraction I, II et III a été injectée 5 fois. Nous avons réalisé deux expériences de pourcentage de récupération. Dans les deux cas, et pour les 5 séries d'injection, la plus forte erreur enregistrée par rapport à la quantité réelle de psoralène et d'angélicine a été de 5%.

L'erreur de la méthode de dosage est donc d'environ de l'ordre de 5% pour le niveau de furocoumarines que nous avons dosé. Ainsi, une teneur en psoralène de 100 ppm pourra être considérée comme fiable à 5 ppm près. Le niveau de précision peut être considéré comme adapté à la détermination des espèces et des organes les plus riches.

La troisième source d'erreur a été plus précisément évaluée en faisant 10 injections consécutives à l'HPLC d'une solution donnée contenant du psoralène, de l'angélicine et de la xanthotoxine. La variation enregistrée est de l'ordre de 0,5 %. Ceci atteste de la précision de la phase ultime de dosage à l'HPLC.

b/ Etude de la répartition et de la teneur en furocoumarines de quelques espèces de Psoralées.

Nous avons d'abord déterminé par chromatographie sur couches minces les différentes furocoumarines présentes dans les fractions tiges des trois espèces : *P. cinerea*, *P. plumosa* et *P. martinii*. Seuls le psoralène et l'angélicine ont pu être mis en évidence : ce sont donc les seules furocoumarines présentes chez ces trois espèces végétales. L'étape suivante a consisté à quantifier ces produits.

Les figures n° 22 (a, b, c), 23 et 24 (a, b) représentent les teneurs en furocoumarines de différents organes des espèces *P. cinerea*, *P. martinii* et *P. plumosa*. Les parties végétales dosées ont été récoltées dans le cadre de l'expérience avec le niveau d'azote de 50 uN/ha. Nous pouvons constater que tous les échantillons végétaux analysés, y compris les parties végétatives, contiennent des furocoumarines. Il faut cependant remarquer que la teneur en furocoumarines est plus forte dans les organes reproducteurs que dans les feuilles ou les tiges. Il semble donc, conformément aux travaux sur les Umbellifères (Ivie, 1978 ; Ceska et al, 1987 ; Enriquez et al, 1984), que l'essentiel de la synthèse des furocoumarines s'accomplisse dans les organes reproducteurs. En revanche, comme les dosages se rapportent à des organes récoltés à la fin de la période de fructification, nous ne pouvons pas conclure sur la capacité de synthèse des parties végétatives. En effet, les furocoumarines rencontrées dans les feuilles ou les tiges pourraient résulter d'une translocation de ces molécules depuis les fruits vers les organes végétatifs.

Si l'on compare les teneurs en furocoumarines d'une espèce à l'autre, on remarque que les plus fortes concentrations sont obtenues dans le cas de *P. martinii*. Ainsi, lorsque cette espèce est inoculée avec la souche USDA 3451, les feuilles contiennent des teneurs en furocoumarines totales (angélicine + psoralène) d'environ 8000 ppm. L'espèce

Figure 23 Teneur en furocoumarines des feuilles de *P. martinii* (culture en phytotron).

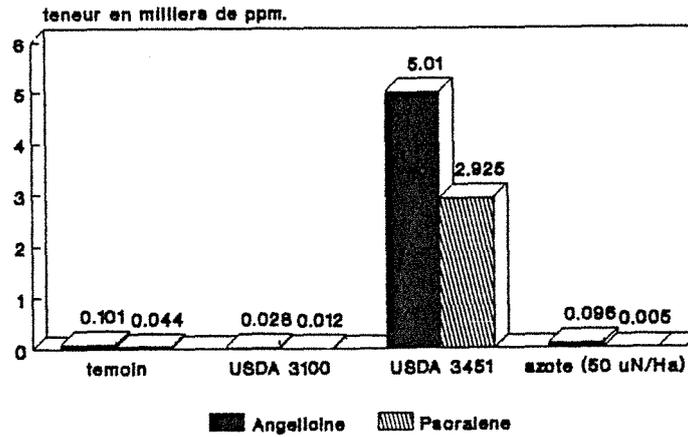


Figure 24a Teneur en furocoumarines des tiges de *P. plumosa* (culture en phytotron).

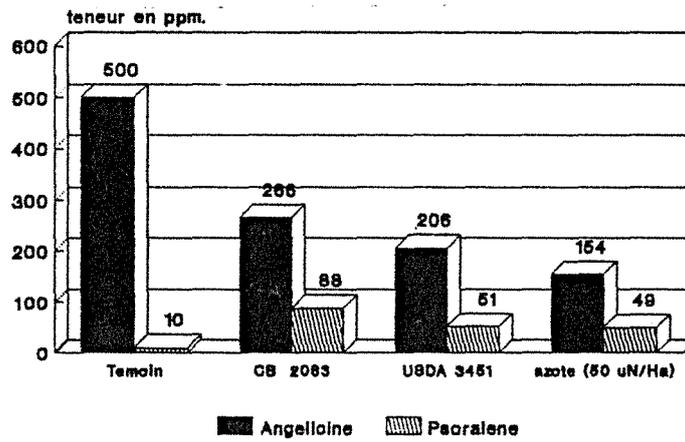
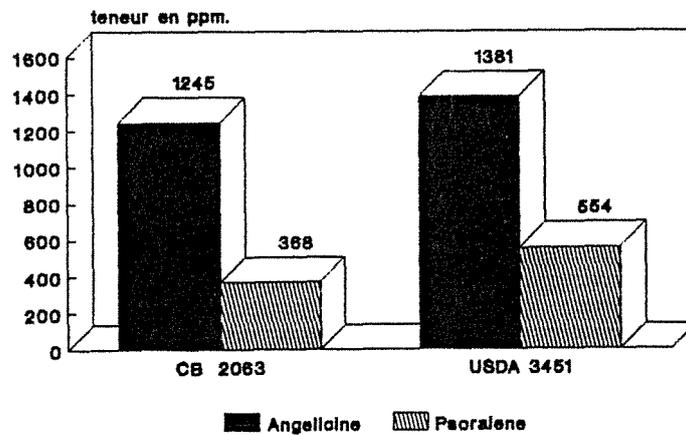


Figure 24b Teneur en furocoumarines des semences de *P. plumosa* (culture en phytotron).



P. cinerea présente également des quantités importantes. Les teneurs en furocoumarines totales dépassent 4500 ppm dans les fruits immatures de plantes inoculées avec la souche USDA 3451. L'espèce *P. plumosa*, quant à elle, semble se situer au même niveau de concentration que *P. cinerea*. Les concentrations maximales de furocoumarines totales mises en évidence dans les semences des deux espèces avoisinent les 2000 ppm.

Nous pouvons également comparer les teneurs en furocoumarines pour les différents types d'inoculations, la fertilisation azotée et les témoins. On constate alors que les plus fortes teneurs en furocoumarines correspondent aux traitements qui ont conduit à la meilleure croissance végétative et aux meilleurs rendements en semences. Pour *P. cinerea*, il s'agit de l'inoculation avec la souche CB 2063 dans le cas des feuilles ou du traitement USDA 3451 (contaminé par cette même souche CB 2063) pour les semences et les fruits immatures. On retrouve le même cas de figure chez *P. martinii*. Les plus fortes concentrations dans les feuilles ont été obtenues pour des plantes inoculées avec la souche USDA 3451.

c/ Effets comparés de l'inoculation et d'une fertilisation azotée à 120 uN/ha sur les teneurs en furocoumarines.

Les figures n° 25 (a, b, c) indiquent les teneurs en furocoumarines dans les différents organes de l'espèce *P. cinerea*. Ces résultats correspondent à l'expérience réalisée en serre, avec un niveau de fertilisation azotée de 120 uN/ha.

On remarque que la répartition des furocoumarines entre les organes est globalement respectée par rapport à l'expérience précédente sur *P. cinerea*. Ainsi, les deux traitements inoculé et fertilisé présentent des concentrations plus importantes dans les organes reproducteurs (fruits immatures et semences) que dans les feuilles. Il semble que la teneur en furocoumarines totales soit d'ailleurs plus importante dans les fruits immatures que dans les semences.

On peut également de nouveau remarquer que les traitements inoculé et fertilisé qui avaient conduit à une bonne croissance se détachent nettement du témoin en ce qui concerne les teneurs des organes reproducteurs.

Si l'on compare les teneurs des traitements témoin et CB 2063 pour cette expérience et celle conduite avec une fertilisation azotée plus faible, on peut relever quelques différences (figures 22 a, b, c et 25 a, b, c). Certes, les niveaux de psoralène et d'angélicine dans les feuilles et les semences des témoins sont comparables. En revanche,

pour les traitements CB 2063, les teneurs sont nettement plus importantes dans le cas des feuilles obtenues en phytotron et des semences récoltées en serre. Nous avons considéré précédemment que la majorité des furocoumarines sont élaborées dans les fruits en cours de maturation. Dans ce cas, les répartitions de furocoumarines différentes entre les feuilles et les semences récoltées en phytotron ou en serre pourraient suggérer un phénomène de translocation. L'hypothèse peut se résumer ainsi :

_ Pour la culture en phytotron de *P. cinerea* X CB 2063, il y a eu redistribution des furocoumarines synthétisées dans les fruits vers les feuilles.

_ Pour la culture en serre de *P. cinerea* X CB 2063, les furocoumarines élaborées dans les fruits immatures n'ont pratiquement pas subi de translocation et se retrouvent dans les fruits à maturité.

2/ Effet de la température sur la synthèse de furocoumarines.

a/ Teneur en furocoumarines à la première récolte.

La température semble exercer un rôle favorable dès le stade "bourgeons floraux" sur la production de furocoumarines (figure n°26). En effet, on trouve respectivement 3 fois plus d'angélicine et 8 fois plus de psoralène dans les feuilles des plantes qui ont poussé dans les conditions les plus chaudes.

b/ Teneur en furocoumarines à la seconde récolte.

Les furocoumarines ont été extraites des feuilles et fruits immatures pour les plantes du phytotron à 31°C et uniquement des feuilles dans le cas du phytotron à 20°C. La quantité de fruits immatures récoltés était insuffisante, à 20°C, pour faire l'objet d'une extraction. En conséquence, seules les concentrations mesurées dans les feuilles peuvent être comparées (figure n°27). On constate à nouveau une production de furocoumarines nettement supérieure dans le phytotron à 30°C, ce qui confirme l'effet favorable d'une température élevée. Il convient toutefois de noter que l'augmentation de la concentration est beaucoup moins forte qu'à la première récolte puisque les teneurs ne sont même pas doublées. Les fruits immatures obtenus à 31°C contiennent des quantités de furocoumarines totales assez élevées (plus de 1000 ppm), bien supérieures à celles des feuilles. Outre l'effet favorable sur les concentrations en furocoumarines, l'élévation de température entraîne aussi une croissance plus importante (figures n°28 et 29). Ceci assure une production accrue en furocoumarines par unité de surface.

Figure 28 Croissance en hauteur de *P. cinerea* selon le traitement thermique.

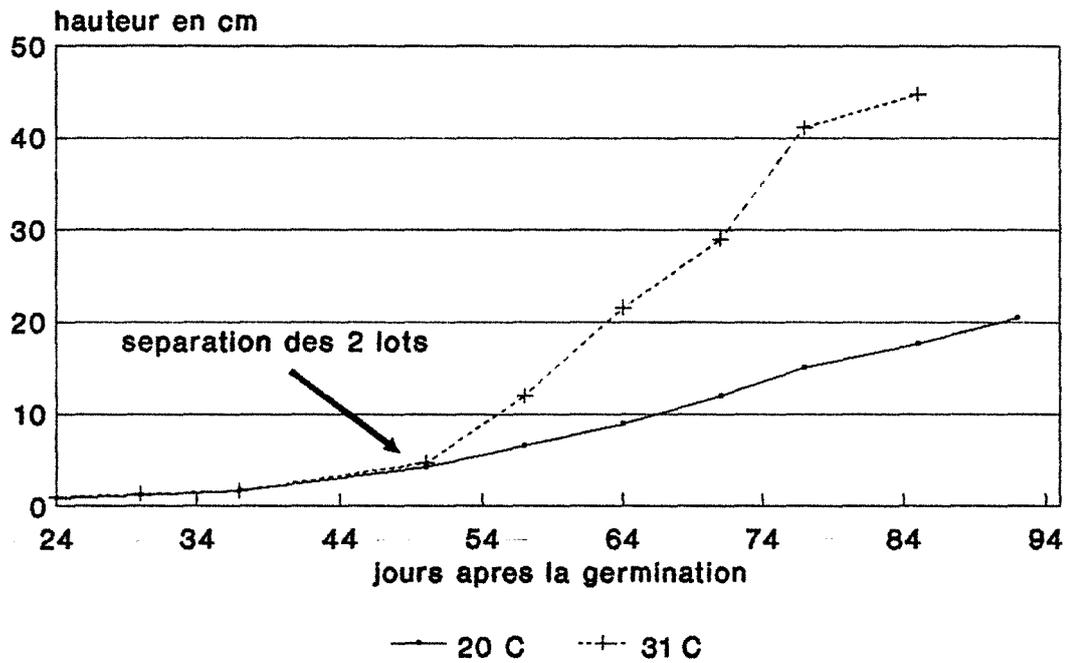
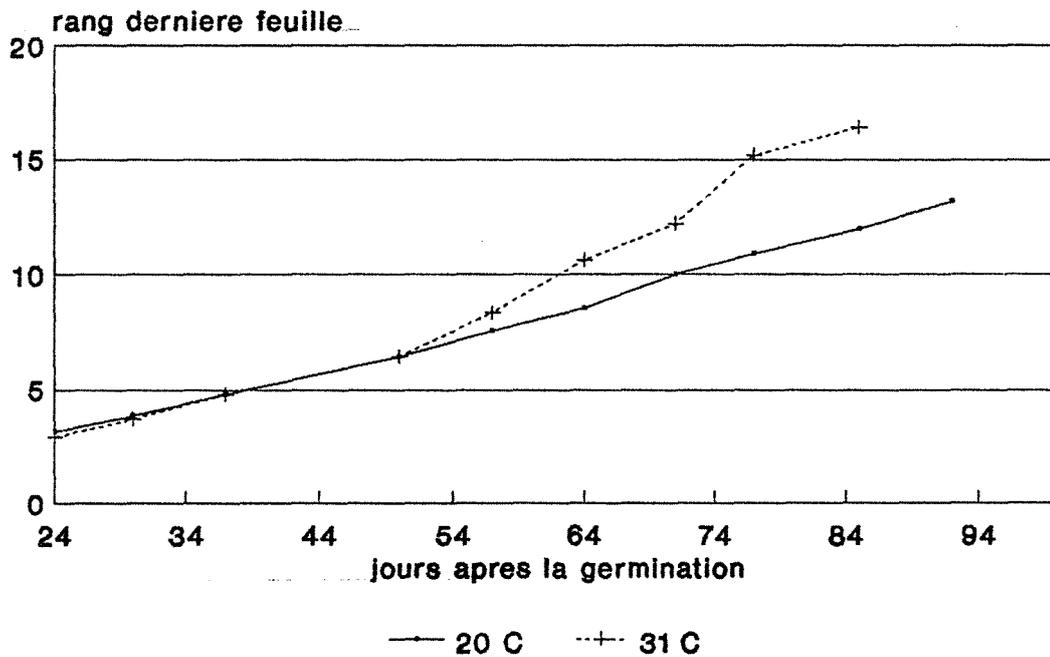


Figure 29 Evolution du phyllochrone chez *Psoralea cinerea* selon les traitements thermiques



Les expériences sur le facteur température confirment également la capacité de synthèse des furocoumarines par les organes végétatifs (feuilles). La première récolte, réalisée avant la mise à fleur a, en effet, révélé la présence de furocoumarines à ce stade précoce de la végétation et pour les deux traitements thermiques. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de Steck et Bailey (1969) qui ont démontré que plusieurs furocoumarines pouvaient se former dans les feuilles d'*Angelica archangelica*.

3/ Effet de traitements chimiques sur la concentration en furocoumarines.

Nous avons pu constater que les agents stressants produisent des lésions de différentes natures à la surface des végétaux (essentiellement les feuilles).

- le NaCl affecte l'ensemble de la feuille mais ne provoque pas de lésion de la cuticule. L'effet observé correspond à un recroquevillement des feuilles, mimant ainsi l'action d'un stress hydrique mais non d'une nécrose.

- le CaOCl affecte l'ensemble de la feuille en formant des taches nécrotiques de quelques millimètres de diamètre. Lors de fortes applications, la feuille brunit sur toute sa surface (photographie n°11).

- le CuSO₄ provoque l'apparition de minuscules points nécrotiques noirs répartis sur toute la feuille. En apparence, ce traitement perturbe moins les plantes que les deux autres (photographie n°12).

Les teneurs en psoralène et angélicine des feuilles ont été quantifiées pour les deux dates de récolte. Les résultats sont présentés respectivement sur les figures n°30 et 31. Pour les trois traitements : témoin, NaCl et CaOCl on observe une stagnation ou une décroissance en angélicine et psoralène entre la première et la seconde récolte. En revanche, les dosages effectués sur les feuilles traitées au CuSO₄ montrent une forte augmentation des concentrations tant en psoralène (10 fois plus) qu'en angélicine (12,5 fois plus) entre les deux récoltes. Il faut également noter que les concentrations en psoralène et angélicine lors de la deuxième récolte sont respectivement 8,5 fois et 6,5 fois plus importantes que pour le traitement témoin.

Lors de la seconde récolte nous avons également quantifié les niveaux de psoralène et d'angélicine des parties reproductrices (fruits immatures et semences) pour les quatre traitements. Les résultats sont présentés sur les figures 32 et 33. Ils montrent tous une augmentation de la concentration dans les organes fructifères et les semences des traitements stressés par rapport aux témoins. Cependant, le traitement CuSO₄ est encore celui qui donne pour les organes reproducteurs les plus fortes concentrations en



Photo 11 : effets du traitement au CaOCl sur les feuilles de *P. cinerea*



Photo 12 : effets du traitement au CuSO_4 sur les feuilles de *P. cinerea*

Figure 32 Effet des traitements chimiques sur la teneur en psoralene chez *P.cinerea* (seconde recolte)

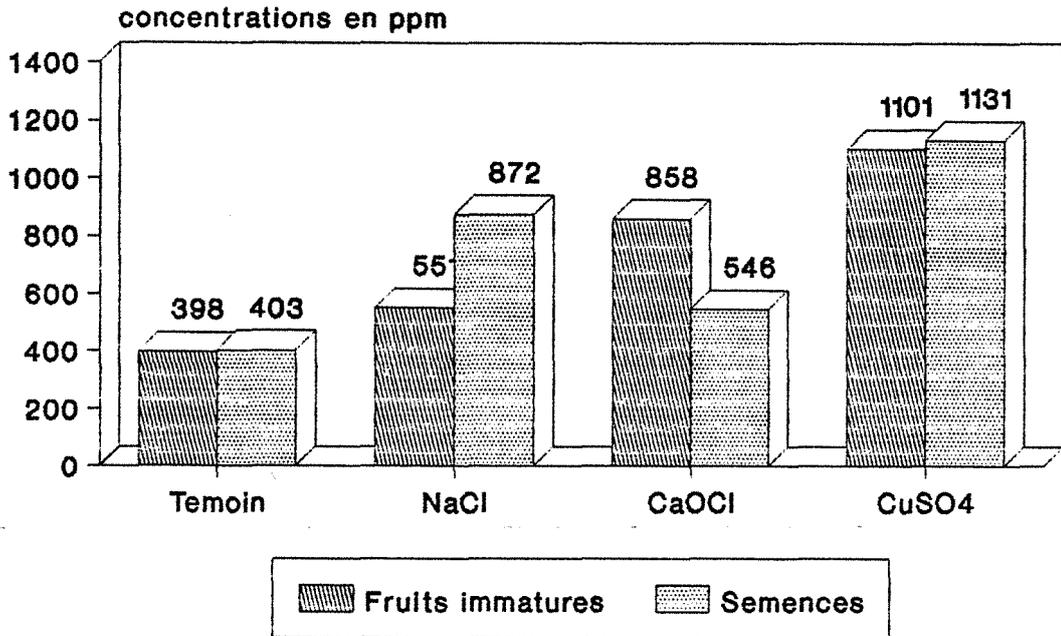
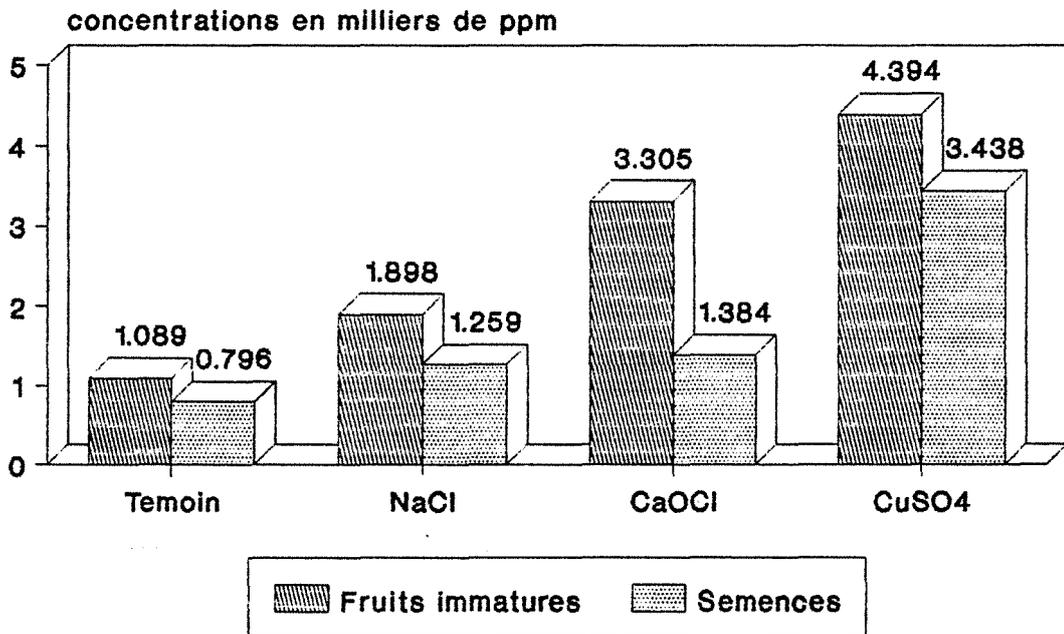


Figure 33 Effet des traitements chimiques sur la teneur en angelicine chez *P. cinerea* (seconde recolte).



angélicine et en psoralène (respectivement 4 et 2,8 fois plus que pour le témoin).

Les relevés biométriques réalisés montrent logiquement une meilleure croissance du traitement témoin (non traité) aussi bien pour la hauteur que pour le nombre de feuilles (figures n°34 et 35). Cependant les pertes de production de biomasse induites par les pulvérisations successives sont peu marquées. Les traitements chimiques augmentent donc la concentration en furocoumarines pour une production de matière sèche à peu près constante.

4/ Etude de la quantité de furocoumarines produite par plante.

L'Intérêt de la culture d'une espèce végétale pour la production d'un métabolite secondaire dépend essentiellement de la concentration du produit dans la plante et de la quantité de matière sèche récoltable par plante. Il nous a semblé intéressant d'intégrer simultanément ces deux paramètres dans les tableaux n°6 à 9 qui restituent les rendements par plante en psoralène et angélicine. Les chiffres ne concernent que les expériences comparées de fertilisation/inoculation conduites en phytotron ou en serre.

Les meilleurs résultats de rendements par plante ont été obtenus pour :

- *P. cinerea* : en serre, avec les traitements CB 2063 et 120uN/ha; en phytotron, avec les traitements CB 2063 et USDA 3451 (mais nous avons vu que ce traitement était une contamination due à la souche CB 2063).
- *P. plumosa* : en phytotron avec les traitements CB 2063 et USDA 3451.
- *P. martinii* : en phytotron avec le traitement USDA 3451.

Pour l'ensemble de ces traitements, les quantités totales de furocoumarines enregistrées sont supérieures à 1 mg par plante.

Tableau n° 6 : Production de furocoumarine par plante pour l'espèce *P. cinerea* selon le type d'inoculation ou de fertilisation (résultats en $\mu\text{g/plante}$, expérience en phytotron).

P. cinerea X temoin	feuilles	semences	fruits immatures	Total
Angélicine	45,6	4,0	RI	49,6
Psoralène	9,8	0,1	RI	9,9

P. cinerea X CB 2063	feuilles	semences	fruits immatures	Total
Angélicine	491,4	744,6	534,5	1770,5
Psoralène	156,4	219,5	162,8	538,7

P. cinerea X USDA 3100	feuilles	semences	fruits immatures	Total
Angélicine	29,9	RI	RI	29,9
Psoralène	16,5	RI	RI	16,5

P. cinerea X USDA 3451	feuilles	semences	fruits immatures	Total
Angélicine	76,4	357,6	1065,1	1499,1
Psoralène	45,6	69,8	236,0	351,4

P. cinerea X N	feuilles	semences	fruits immatures	Total
Angélicine	37,7	196,8	RI	234,5
Psoralène	14,0	64,5	RI	78,5

RI : récolte insuffisante pour permettre la quantification.

Tableau n°8 : production de furocoumarines par plante pour *P. plumosa* selon le type d'inoculation ou de fertilisation (résultats en µg/plante, expérience en phytotron).

<i>P. plumosa</i> X temoin	tiges	semences	fruits immatures	Total
Angélicine	156,0	RI	ND	156,0
Psoralène	3,1	RI	ND	3,1

<i>P. plumosa</i> X CB 2063	tiges	semences	fruits immatures	Total
Angélicine	101,3	2178,8	ND	2280,1
Psoralène	33,5	644,0	ND	677,5

<i>P. plumosa</i> X USDA 3451	tiges	semences	fruits immatures	Total
Angélicine	86,1	2378,1	ND	2464,2
Psoralène	21,3	954,0	ND	975,3

<i>P. plumosa</i> X N	tiges	semences	fruits immatures	Total
Angélicine	80,9	ND	ND	80,9
Psoralène	25,7	ND	ND	25,7

RI : récolte insuffisante pour permettre la quantification.
ND : non déterminé.

IV/ DISCUSSION.

Dans toutes nos expériences de dosages, nous n'avons rencontré que deux types de furocoumarines : le psoralène et l'angélicine. L'angélicine est toujours représentée en plus grande quantité. Ces observations concordent avec celles rapportées par Innocenti et al (1984) sur les semences des trois mêmes espèces de Psoralées. En revanche, nos résultats diffèrent sensiblement de ceux de ces mêmes auteurs en ce qui concerne la richesse respective de chacune des espèces. Pour nos expérimentations, les plus fortes concentrations ont été obtenues avec *P. martinii* et *P. cinerea* et il semble que *P. plumosa* présente des teneurs plus faibles que celles annoncées par ces auteurs.

1/ Adéquation de la méthodologie au dosage des furocoumarines dans les végétaux.

On a pu voir que la méthode de dosage des furocoumarines dans les végétaux était précise mais qu'elle nécessitait une prise d'essai assez importante (environ 3 g de matière sèche).

A ce titre, la présente méthode se prête peu à l'étude de la concentration en furocoumarines organe par organe pour une seule plante car la prise d'essai de 3 g de matière sèche excède souvent les capacités de production de biomasse d'un individu. Ainsi, l'étude des phénomènes de translocation des furocoumarines au cours du temps nécessiterait une technique analytique plus économe en prise d'essai. On peut penser en particulier aux méthodes immunologiques telles que le test E.L.I.S.A. qui permettent d'opérer avec un échantillon réduit (quelques mg de matière fraîche). Cette méthode consisterait dans notre cas à disposer d'un anticorps polyclonal (moins cher que les monoclonaux) présentant une bonne spécificité pour les furocoumarines et permettant leur dosage dans les parties végétales. Cette technique de dosage serait, par ailleurs, directement applicable sur des parties végétales fraîches, non extraites à l'aide de solvants.

2/ Concentration en furocoumarines.

Si l'on s'intéresse aux résultats obtenus à partir des expériences sur les inoculations et la fertilisation, il semble que nous ayons mis en évidence un effet de la nutrition azotée sur les concentrations en furocoumarines. Les plus fortes teneurs ont été observées avec les plantes qui présentaient les meilleures croissances : soit qu'elles étaient inoculées avec des souches efficaces soit qu'elles étaient fertilisées abondamment (120uN/ha). En d'autres termes, nous avons démontré l'incidence d'un métabolisme

primaire, celui de l'azote, sur la régulation d'un métabolisme secondaire ; celui des furocoumarines.

La température intervient également directement sur la teneur en furocoumarines. Nos résultats rejoignent ceux observés par Innocenti et al (1976) sur le persil : les périodes de fortes chaleurs provoquent une augmentation de la concentration en furocoumarines.

L'expérience relative aux traitements chimiques suggère de nombreuses remarques. A la première récolte, aucune augmentation de la teneur en furocoumarines n'a été constatée pour les traitements chimiques par rapport au témoin. Toutes les plantes correspondantes n'ayant alors été traitées que deux fois, on peut évoquer plusieurs hypothèses comme :

- un nombre de traitements chimiques, et donc d'agressions insuffisants.
- l'existence de stades phénologiques plus sensibles que d'autres à l'application de produits chimiques.

L'augmentation de concentration en furocoumarines des feuilles du traitement CuSO₄ semble bien indiquer une réponse de type phytoalexine de l'espèce *P. cinerea*. Pour ce qui est des organes reproducteurs, les trois traitements testés ont conduit à un effet de type phytoalexine, même avec NaCl et CaOCl. Le terme de phytoalexine doit cependant être employé avec une certaine réserve. Si les furocoumarines sont des phytoaléxines chez les Psoralées, cela suppose :

- 1/ que ces molécules exercent une action antimicrobienne, ce qui est classiquement admis,
- 2/ que la concentration de ces molécules augmente dans le cas d'une attaque de la plante par un pathogène. Or dans notre expérience, nous n'avons envisagé que l'effet de traitements chimiques connus pour simuler l'action de pathogènes chez d'autres plantes comme le céleri (Beier et Oertli, 1983).

Dans le cas précis où les plantes ont été traitées avec du NaCl, nous avons vu que ce produit induisait un stress hydrique. L'effet favorable de ce traitement sur la concentration en furocoumarines des organes reproducteurs nous conduit donc à penser que l'alimentation hydrique de la plante intervient aussi de manière importante sur le métabolisme de ces molécules.

En définitive, le rôle des furocoumarines chez les Légumineuses du genre *Psoralea* rejoint tout à fait celui mis en évidence chez les Ombellifères. L'intervention dans le processus de germination avait été démontré (Baskin et al, 1967), et il semble bien que l'on puisse évoquer aussi le rôle de phytoaléxines. Plus généralement, ces molécules sont produites en quantité plus importante lorsque les Psoralées sont confrontées à des conditions environnementales difficiles (stress hydrique, fortes températures, agressions chimiques).

3/ Intérêt d'une culture de Psoralées en vue de la production de furocoumarines.

Nous avons déterminé un ensemble de paramètres intervenant sur la concentration en furocoumarines de quelques espèces de Psoralées australiennes. A partir de ces données, Il est possible de proposer des conditions de culture (température, nutrition azotée, stade de récolte) et des traitements commodes d'emploi (pulvérisations de produits chimiques simples) qui permettent d'optimiser les teneurs en ces métabolites secondaires.

Des résultats de dosages présentés précédemment, nous pouvons nous risquer à extrapoler une production de furocoumarines par unité de surface. Il suffit pour cela de se fixer une densité de peuplement. Compte tenu de la taille des espèces étudiées il est raisonnable d'avancer le chiffre de 100 plantes par m², soit une plante tous les 10 cm. Si l'on s'en tient aux chiffres de production de furocoumarines par plante obtenus à partir des expériences réalisées en serre et en phytotron, on obtient alors les "rendements" indiqués dans tableau suivant.

Tableau n°10 : extrapolation de la production de furocoumarines (en g/ha) obtenue en conditions contrôlées.

	Angélicine	Psoralène
P. cinerea X CB 2063 (en serre)	4200	870
P. cinerea X CB 2063 (en phytotron)	1770	540
P. cinerea X 120uN/ha (en serre)	1820	420
P. plumosa X CB 2063 (en phytotron)	2280	680
P. plumosa X USDA 3451 (en phytotron)	2460	970

Si l'on considère le prix de revient actuel du psoralène par synthèse chimique pure (de l'ordre de 40 000 F le kg), les chiffres de tableau n°10 apparaissent intéressants. Ces perspectives ne prennent pas en compte les gains de production (concentrations plus élevées en psoralènes) qu'il est cependant possible d'obtenir en jouant sur les conditions de culture. Nous avons vu que par la simple application de pulvérisations de produits chimiques, il était possible de multiplier les teneurs par un facteur de 3 à 4. La présente hypothèse renforce donc encore l'intérêt de la culture de Psoralées pour la production de furocoumarines.

CHAPITRE V: ESSAIS DE CULTURES IN-VITRO DE CELLULES DE MESOPHYLLE DE PSORALEES.

I/ INTRODUCTION.

Dans l'état actuel de nos connaissances, la production de furocoumarines par une culture de Psoralées (en serre ou plein champ) peut être envisagée, du moins dans un premier temps sur une surface pilote. Cependant, la culture de plantes entières de Psoralées pourrait s'accompagner de quelques problèmes. En particulier, nous avons montré que la concentration en furocoumarines est fortement dépendante des conditions du milieu (température, nutrition azotée, plante en état de stress). Bien entendu, nous n'avons probablement pas analysé l'ensemble des facteurs environnementaux intervenant sur la teneur en métabolites secondaires et il est possible que certains paramètres défavorables à un rendement élevé en furocoumarine nous aient échappé.

Aussi, nous sommes nous intéressés à une autre technique de production de métabolites secondaires qui permettrait de s'affranchir de la variabilité inhérente à la culture de plantes entières : la culture *in-vitro*. Dans le cas où une telle méthode de synthèse serait possible, il serait plus aisé d'obtenir une bioproduction de furocoumarines contrôlée et stable.

Notre réflexion s'est appuyée sur de nombreuses références bibliographiques dans le domaine des cultures *in-vitro*. Il nous semble souhaitable d'en présenter rapidement les données essentielles.

II/ RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.

1/ Choix du matériel végétal pour l'établissement des souches.

La première question fondamentale lors de la mise en oeuvre d'une culture de cellules est celle du choix du matériel de départ. Il existe peu de travaux sur la corrélation possible entre les capacités de production d'un métabolite en culture *in vitro* et les teneurs observées chez la plante mère. La plupart des auteurs (Rideau, 1988 ; Zrýd, 1988) admettent cependant, depuis les travaux de Zenk et al (1977), qu'il est souhaitable d'initier une culture à partir d'un individu à fortes potentialités de production.

Le second problème est celui du choix de l'organe dont on doit isoler les cellules. En théorie, les cellules une fois mises en cultures ont perdu, par définition, leur organisation en tissus et sont toutes sensées exprimer leur pouvoir de totipotence. De fait, cette propriété a été souvent constatée : deux explants différents issus d'une même plante conduisent à des cultures de cellules aux mêmes caractéristiques tant du point de vue du spectre des métabolites que du point de vue de leur quantité (Böhm, 1980; Rideau, 1988; Zrýd 1988). La feuille, cependant, semble être un organe qui se prête bien à la culture de cellules séparées car les liaisons intercellulaires y sont généralement fragiles.

Une des étapes fondamentales dans l'établissement de souches cellulaires destinées à la culture *in-vitro* est la phase de sélection et de stabilisation de différentes lignées. Elle nécessite généralement un nombre important de clonages et l'on doit aussi souvent que possible évaluer les capacités biosynthétiques de chaque clone. Ce travail ne peut s'inscrire que dans une étude à moyen terme et nous ne l'avons pas entrepris ici. Il faut également pouvoir disposer d'un test suffisamment sensible permettant d'apprécier la productivité des différentes lignées cellulaires pour les métabolites recherchés. A ce titre, nous avons déjà évoqué le problème posé par la méthode de dosage à l'HPLC qui est précise mais nécessite une prise d'essai importante. Là encore, cette technique semble peu adaptée à l'évaluation des potentialités de production des différentes souches cellulaires où il faut pouvoir opérer à partir de quelques milligrammes de matière fraîche. La méthode immuno-enzymatique E.L.I.S.A. apparaît plus indiquée et a déjà été employée dans des études analogues pour le dosage de métabolites secondaires du type alcaloïdes (Fliniaux et al, 1988).

2/ Obtention de cellules isolées.

La dissociation d'un tissu végétal en cellules isolées peut s'obtenir à partir de méthodes enzymatiques ou mécaniques. Les techniques mécaniques furent historiquement les premières mises en oeuvre (Gautheret, 1959) mais suivant les espèces végétales, la viabilité des cellules est très incertaine. Jullien et Rossini (1976) ont testé les aptitudes à la dissociation mécanique d'environ 200 espèces différentes. Les résultats montrent que la méthode n'est pas applicable à toutes les espèces puisque le taux de réussite est d'environ 10%. En revanche, l'aptitude est en partie dépendante du genre du végétal. Chaumont et Gudín (1985) ont appliqué la méthode décrite par Jullien et Rossini (1976) à l'espèce *P. bituminosa*. Cette plante, selon leurs conclusions, est particulièrement adaptée à la dissociation des cellules (environ 60% des cellules foliaires sont dissociables et viables).

La méthode enzymatique consiste à faire agir des pectinases sur le tissu foliaire. Cependant, cette technique ne permet pas d'obtenir de grandes quantités de cellules aussi rapidement que la méthode mécanique (Jullien et Rossini, 1976). La dissociation mécanique est donc préférable lorsqu'elle est possible. On peut également obtenir une suspension de cellules végétales à partir de cals déjà développés. En effet, ces amas cellulaires sont constitués de cellules peu jointives et friables, facilement dissociables par agitation (Dixon, 1985).

3/ Choix du milieu de culture.

La croissance cellulaire *in-vitro* est étroitement dépendante du milieu de culture choisi et en particulier des régulateurs de croissance ou hormones. Chaumont et Gudin (1985), lors de leur étude relative à *P. bituminosa*, ont testé un milieu identique à celui décrit par Murashige et Skoog (1962) en le supplémentant avec différentes substances de croissance (auxines et/ou cytokinines). Il n'ont observé aucune croissance en absence d'hormones ou en présence de 2,4-D dans le milieu. Les meilleures croissances ont été obtenues avec un milieu contenant 1 mg/l d'acide naphthalène-acétique (NAA) ou d'acide indole-acétique (IAA) et 0,1 mg/l de kinétine (K). La croissance maximale obtenue correspondait à une augmentation du nombre de cellules de 30% au bout de 3 semaines de culture.

En plus de son action directe sur la division et la croissance cellulaire, la composition du milieu de culture intervient sur la régulation du métabolisme secondaire. L'influence peut être due aux macroéléments : ainsi Fujita et al (1981) ont montré l'importance de la source d'azote dans le cas de cultures en suspension de *Lithospermum erythrorhizon* pour la production de shikonine (inhibition dans le cas d'un apport d'ammonium). Yazaki et al (1987) poursuivant ces travaux sur le même matériel végétal ont observé que l'effet défavorable de l'ammonium est dû à l'accumulation d'un acide aminé : la glutamine. Ce mécanisme peut être mimé en ajoutant de la glutamine au milieu de culture. Les hormones présentes dans le milieu influent également sur la production de métabolites secondaires. Böhm (1980) et Böhm et Franke (1982) ont obtenu une plus grande production d'alcaloïdes dans le milieu de culture de *Macleaya microcarpa* lorsqu'ils augmentaient la quantité d'auxines. La quantité d'oxygène dissous dans le milieu de culture intervient aussi sur la régulation des métabolismes secondaires. Hara et al (1987) ont pu le montrer sur la production de shikonine des cultures de *Lithospermum erythrorhizon*. La lumière exerce également une action fondamentale dans le cas de métabolites secondaires synthétisés dans le chloroplaste (Wink et al, 1980).

A la lecture de ces travaux, notre objectif principal a été d'évaluer la capacité des Psoralées à donner des cultures de cellules isolées en milieu liquide. Il s'agissait donc d'une part de mettre au point une technique de dissociation des cellules et d'autre part de déterminer des conditions de culture favorables à la croissance. En parallèle, nous avons testé l'aptitude de quelques espèces à la formation de cals. Cette dernière méthode nous a semblé intéressante puisqu' elle peut conduire également à l'obtention de cellules isolées. En outre, ce peut être un moyen commode pour produire des lignées cellulaires différentes.

III/ MATERIELS ET METHODES.

1/ Cultures cellulaires en milieu liquide.

a/ Matériel végétal.

Parmi les trois espèces de Psoralées australiennes analysées précédemment, nous avons retenu pour cette étude : *P. cinerea* et *P. martinii*. Ces deux espèces présentaient en effet des concentrations en furocoumarines plus importantes que l'espèce *P. plumosa*. Nous avons décidé d'expérimenter la dissociation des cellules à partir des feuilles. En effet, dans notre étude sur la concentration des différents organes, nous avons montré que les cellules foliaires étaient capables de synthétiser les furocoumarines en quantité importante.

La germination et le repiquage des plantules se sont déroulés comme décrit précédemment (scarification manuelle). Les plantes ont été conduites en serre (température maximale de 35°C, température minimale de 14°C, photopériode moyenne de 14 heures). Afin de nous placer dans les conditions les plus favorables pour une synthèse importante des furocoumarines dans les plantes mères, les Psoralées ont été inoculées au stade 4 feuilles (*P. cinerea* a été inoculée avec la souche bactérienne CB 2063 et *P. martinii* avec la souche USDA 3451). Toutes les plantes ont également reçu un apport d'azote équivalent à 120u N/ha pour que les conditions de nutrition azotée soient optimales.

b/ Matériel et milieu de culture.

Nous avons utilisé le milieu de culture composé des macro-éléments, micro-éléments et vitamines de Murashige et Skoog (1962). Il s'agissait d'un milieu prêt à l'emploi, ne contenant ni sucre ni hormones végétales (Flow Laboratories, cat n° 26 100 22). Ce milieu a été complété avec du saccharose à raison de 30 g/l. Le pH a été ajusté à 6,2 avec du NaOH 1N avant autoclavage. La stérilisation a été réalisée par autoclavage à 120°C pendant 20 mn. Les hormones de croissance ont été ajoutées après autoclavage du milieu par filtration stérilisante (filtre de porosité 0,45 µm).

L'asepsie nécessaire aux cultures *in-vitro* requiert l'utilisation de matériel préalablement stérilisé et la réalisation de l'ensemencement dans des conditions stériles :

- stérilisation de la verrerie par chaleur humide à l'autoclave (120°C pendant 20 mn).
- stérilisation des instruments de travail (pinces, scalpels, spatules) à la flamme après trempage dans l'éthanol.
- stérilisation des tamis cellulaires (à mailles en nylon) par trempage dans l'éthanol. Les tamis sont alors rincés trois fois à l'eau stérile.
- mise en culture sous hotte à flux laminaire. Des lampes U.V. assurent la stérilisation de la hotte (10 mn chaque matin).

c/ Stérilisation des feuilles.

Les feuilles ont été récoltées sur les plantes cultivées en serre. Nous avons employé une méthode usuelle de désinfection de la surface des feuilles : trempage de quelques secondes dans de l'éthanol (90% v/v) puis bain dans de l'hypochlorite de calcium à 7%. L'hypochlorite est préalablement filtré sur papier Whatman car si des particules étaient présentes, elles pourraient produire des points de nécrose importants sur les feuilles. Pour *P. martinii*, les temps de stérilisation ont été de 10 s dans l'éthanol et 15 mn dans l'hypochlorite : le taux de contamination est alors d'environ 5%. Dans le cas de *P. cinerea*, nous avons rencontré plus de problèmes pour l'asepsie. Avec le même protocole la contamination atteint 37%. Nous avons donc augmenté les temps de séjour dans les solutions stérilisantes (30 s dans l'éthanol et 25 mn dans CaOCl). Après la désinfection, les feuilles ont été rincées deux fois à l'eau distillée stérile.

d/ Dissociation des cellules foliaires et mise en culture.

Nous avons employé la méthode de dissociation mécanique proposée par Jullien et Rossini (1976) qui a donné de bons résultats. Le matériel nécessaire à la dilacération des tissus foliaires était constitué d'un tube à essai (d = 16 mm) rempli sur un quart de hauteur de billes de verres (d = 2 à 4 mm) auxquelles on ajoute du milieu de culture (1/4 du volume du tube). Les tubes à dilacération ainsi réalisés ont été stérilisés à 120°C pendant 120 mn.

La dissociation des cellules s'est effectuée, après l'introduction stérile des fragments de feuilles dans les tubes, par un broyage contre les billes de verre à l'aide d'une spatule. Le jus cellulaire alors obtenu a été filtré à travers un tamis d'une porosité de 50 μm afin de n'introduire dans les flacons de culture que des cellules isolées ou groupées par 3 ou 4. Nous avons constitué nous-mêmes les tamis à l'aide d'une toile de nylon calibrée à 50 μm que nous avons montée sur un cerclage en fer de bouchon de flacon serum.

Les flacons de culture contenaient 50 ml de milieu. Ils ont été bouchés avec du coton cardé recouvert de papier d'aluminium. Ils ont ensuite été placés sur un agitateur rotatif (100 rev/mn) dans une chambre de culture thermorégulée (température constante $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, photopériode de 16 heures, intensité lumineuse de $300 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

e/ Comptage des cellules.

Nous avons contrôlé la croissance des cultures en milieu liquide en évaluant la concentration cellulaire à l'aide d'une lame de Malassez. Pour chaque flacon, nous avons effectué la moyenne de trois répétitions de comptage (trois prises d'essai dans le flacon). Un comptage était lui-même composé de la moyenne de 8 observations sur 8 carrés différents de la lame de Malassez.

f/ Protocoles expérimentaux.

Nous avons d'abord voulu tester l'influence de l'inoculum de départ, en terme de concentration cellulaire, afin de déterminer les conditions les plus favorables à une bonne croissance des cultures en milieu liquide.

Pour cela, nous avons utilisé un milieu de culture comprenant $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ d'acide naphthalène-acétique et $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ de kinétine. Les trois inoculums de départ ont comporté environ respectivement :

- $4,5.10^5$ cellules/ml

- $1,5.10^5$ cellules/ml

- $0,3.10^5$ cellules/ml

Pour les deux espèces testées : *P. cinerea* et *P. martinii*, chaque traitement présentait 8 répétitions. Les résultats de croissance correspondent chaque fois à la moyenne de ces 8 flacons par traitement. Les valeurs de l'inoculum de départ ont pu légèrement varier d'une espèce végétale à l'autre. En effet, en pratique, les concentrations cellulaires de départ n'ont pu être contrôlées qu'après l'inoculation en flacon et la quantité de cellules récupérées à partir d'un morceau de feuille broyée peut légèrement fluctuer selon l'intensité et le temps de broyage. On peut cependant avancer le chiffre moyen de 7.10^7 cellules, dans le cas de *P. cinerea*, pour 1 g de feuilles et pour un temps de broyage de 2 minutes. La quantité de cellules récupérées est légèrement plus importante avec *P. martinii* : environ 9.10^7 cellules pour 1 g de matière fraîche de feuilles.

Nous avons également testé l'effet du type et de la concentration d'hormone sur la croissance des cultures cellulaires en milieu liquide. Pour les deux espèces végétales, nous sommes placés aux deux niveaux d'inoculation qui avaient conduits aux plus fortes concentrations cellulaires dans l'expérience précédente. Pour les inoculations les plus fortes (3.10^5 à $3,5.10^5$ cellules/ml), nous avons testé 5 traitements hormonaux :

- 2 mg.l^{-1} NAA + $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ K.

- 1 mg.l^{-1} NAA + $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ K.

- $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ NAA + $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ K

- $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ NAA + $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ K.

- 1 mg.l^{-1} 2,4-D + $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ K.

Dans le cas de l'inoculum le plus faible (1.10^5 à $1,5 10^5$ cellules/ml), nous n'avons testé que l'effet que de trois traitements hormonaux différents :

- 2 mg.l^{-1} NAA + $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ K.

- 1 mg.l^{-1} NAA + $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ K.

- $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ NAA + $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ K.

2/ Culture de cals.

a/ Matériel végétal.

Nous avons réalisé des essais de culture de cals sur milieu solide à partir des espèces végétales suivantes : *P. cinerea*, *P. martinii*, *P. plumosa*, *P. lachnostachys*, *P. obtusifolia*, *P. leucantha* et *P. pustulata*. Les trois premières espèces ont été respectivement inoculées avec les souches CB 2063, USDA 3451 et CB 2063. Les plantes mères correspondant aux autres espèces n'ont pas reçu d'inoculation bactérienne mais ont été fertilisées avec une dose d'azote équivalente à 120 uN/ha . Toutes les plantes ont été conduites en serre dans les mêmes conditions que les plantes destinées à la culture en milieu liquide.

b/ Matériel et milieu de culture.

Nous avons utilisé le milieu décrit par Murashige et Skoog (1962) en le complétant avec du saccharose (30 g/l) et de l'agar (10 g/l). Le pH a été ajusté à 6,2 à l'aide de NaOH 1N. Le milieu a été coulé dans des tubes à essai alors qu'il était encore chaud (5 ml/tube). Les tubes ont alors été stérilisés à 120°C pendant 20 mn. Enfin, les hormones ont été ajoutées dans les tubes, par filtration stérilisante, avant que l'agar ne prenne en masse afin de pouvoir homogénéiser l'ensemble du tube.

Nous avons choisi de travailler à partir des feuilles, comme pour les cultures de cellules isolées.

c/ stérilisation et mise en culture.

Les feuilles ont été désinfectées en suivant le même protocole que précédemment. Elles ont été rincées deux fois à l'eau distillée stérile puis coupées au scalpel en carrés de 1 cm². Les bouchons ont été scellés sur les tubes à l'aide de parafilm qui ne perturbe pas les échanges gazeux. Les tubes ont alors été disposés dans des chambres thermorégulées (25°C ± 1°C) soit à la lumière (intensité lumineuse de 300 μmol.m⁻².s⁻¹) soit à l'obscurité.

d/ protocoles expérimentaux.

Dans une première expérience, nous avons testé l'aptitude à la callogénèse des 7 espèces de Psoralées à l'obscurité et à la lumière. Le milieu solide utilisé a été complété avec 0,2 mg.l⁻¹ de NAA et de kinétine, concentration en hormones qui avait donné les meilleurs résultats en milieu liquide.

Lors d'une seconde étape, nous nous sommes plus spécifiquement focalisés sur les deux espèces *P. cinerea* et *P. martinii* placées à la lumière en jouant sur le type et la concentration d'hormones.

Dans toutes ces expériences, chaque traitement était représenté par 10 répétitions.

IV/ RESULTATS.

1/ Influence de la concentration cellulaire de départ sur la croissance cellulaire en milieu liquide.

Les résultats des deux espèces *P. cinerea* et *P. martinii*, sont respectivement présentés sur les figures n°36 et n°37, pour l'évolution du pourcentage de cellules par rapport à l'inoculum de départ et sur les figures n°38 et n°39, pour l'évolution du nombre total de cellules.

Lors des 10 premiers jours après la mise en culture, la plus forte augmentation par rapport à l'inoculum de départ est obtenue avec les niveaux les plus faibles d'inoculation (figures n° 36 et 37). Chez *P. cinerea*, cette augmentation atteint environ 100% pour l'inoculum à 0,3.10⁵ cellules/ml et 180% pour 1,5.10⁵ cellules/ml. On retrouve sensiblement la même croissance dans le cas de *P. martinii*, pour les mêmes niveaux d'inoculation. Pendant les jours qui suivent le début de la culture, les flacons

correspondant à l'inoculation la plus forte présentent une croissance peu importante (+ 40% au 11ème jour pour *P. cinerea*) voire pas de croissance du tout (cas de *P. martinii*). Après une dizaine de jours de croissance, et pour les trois niveaux d'inoculation, le nombre de cellules semble se stabiliser autour d'une valeur moyenne correspondant à celle du nombre de cellules à la mise en culture. Aux environs du 50ème jour, une forte contamination nous a empêchés de continuer les comptages pour les niveaux d'inoculation les plus faibles. Pour les deux traitements restants, on remarque cependant une nouvelle augmentation du nombre de cellules et une croissance de 100% à 150% selon l'inoculum de départ chez *P. cinerea*. Le phénomène apparaît moins marqué pour les cultures de l'espèce *P. martinii* mais on enregistre également une croissance d'environ 50% par rapport à la quantité initiale de cellules.

Les courbes n°38 et n°39 nous permettent de raisonner en nombre total de cellules à chaque moment de la culture. Les deux espèces *P. cinerea* et *P. martinii* présentent ici encore des évolutions comparables. L'avantage numérique apporté à l'inoculation se maintient pratiquement tout au long de l'expérience avec une exception cependant, vers le 12ème jour pour *P. martinii* et vers le 15ème jour pour *P. cinerea* où l'inoculum intermédiaire rattrape momentanément l'inoculum le plus fort.

2/ Influence de la nature et de la concentration en hormones sur la croissance cellulaire en milieu liquide.

La figure n°40 représente l'évolution de la concentration cellulaire des cinq traitements hormonaux choisis chez *P. martinii* et pour un inoculum de départ de $3,5 \cdot 10^5$ cellules/ml. On ne constate pas de réelle différence entre les traitements. Les tendances des courbes sont similaires : il y a une diminution du nombre de cellules jusqu'au 20ème jour puis une reprise de la croissance jusqu'au 35ème jour. Par la suite on ne peut dégager de tendance.

La figure n°41 montre que pour un inoculum plus faible (environ $1 \cdot 10^5$ cellules/ml), une concentration faible en NAA et kinétine est plus favorable à la croissance cellulaire durant les 15 premiers jours. En revanche, le traitement le plus riche en hormones présente un pic aux alentours du 30ème jour que l'on ne retrouve pas pour les deux autres traitements.

Figure 40

Influence des substances de croissance sur la division cellulaire
P. martinii (inoculum # $3,5 \times 10^5$ cell/ml)

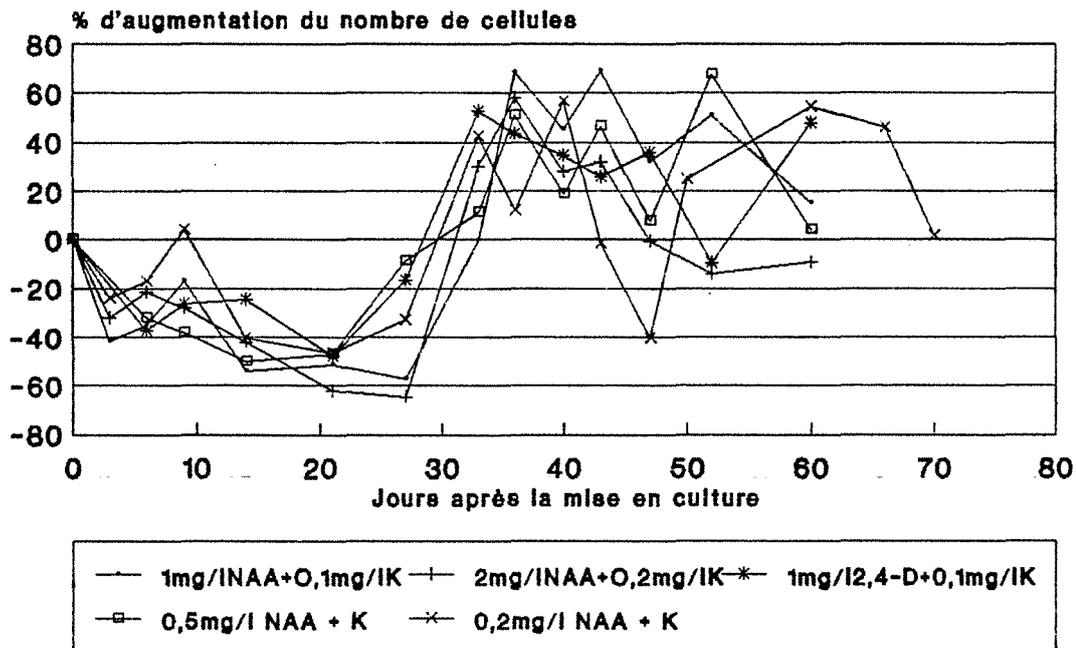
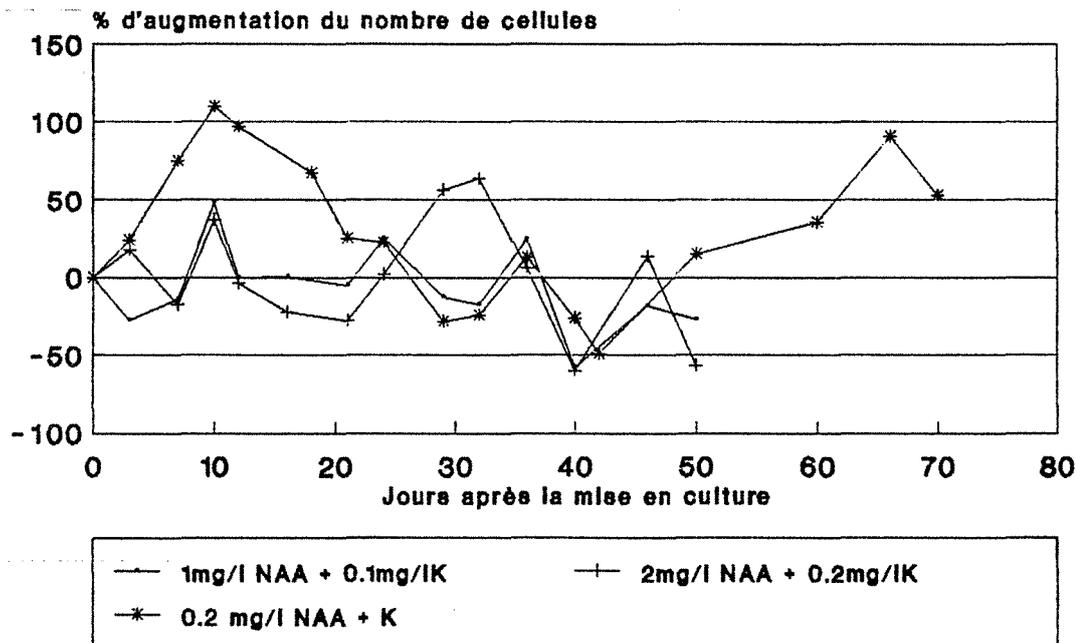


Figure 41

INFLUENCE DES SUBSTANCES DE CROISSANCE SUR LA DIVISION CELLULAIRE
P. martinii (inoculum # 1×10^5 cell/ml)



Les résultats de l'espèce *P. cinerea*, sur la figure n°42, concernent le niveau d'inoculation le plus fort. Comme chez *P. martinii*, on distingue une croissance sensible pour tous les traitements aux environs du 35 ème jour mais aucun d'entre eux ne se détache nettement. Il semble cependant que le milieu au 2,4-D soit celui qui enregistre la plus faible croissance.

Pour ce qui est de l'inoculum de *P. cinerea* le plus faible (figure n°43), les trois traitements présentent des évolutions du nombre de cellules comparables. Ainsi, retrouve-t-on un pic de cellules vers le 10 ème jour. Cependant, cette croissance semble d'autant plus faible que la concentration en hormones est élevée. La chute de ce pic est également plus tardive et moins rapide pour le traitement à 0,2 mg.l⁻¹ NAA + K.

3/ Culture de cals en milieu gélosé.

a/ Aptitude à la callogénèse des Psoralées.

Les figures n°44 et 45 représentent respectivement les pourcentages de cals obtenus pour chaque espèce, à l'obscurité ou à la lumière après 2 mois et demi d'incubation.

La callogénèse est surtout intervenue à l'obscurité où seules 2 espèces sur 7 n'ont pas donné de cals. Le niveau de callogénèse obtenu est important pour *P. cinerea* (100%). *P. plumosa*, *P. leucantha* et *P. obtusifolia* ont donné environ 60% de cals. *P. martinii* semble encore moins apte avec un résultat de 30% de cals (photographies n°13, n°14 et n°15).

La lumière présente un effet inhibiteur très net sur la callogénèse de 4 des 5 espèces qui donnaient des résultats positifs à l'obscurité. Par rapport à une chambre non éclairée, l'inhibition constatée est de 100% pour *P. cinerea* et *P. martinii*, 33% pour *P. plumosa* et 17% pour *P. leucantha*. En revanche la lumière semble être un facteur favorable à l'obtention de cals chez *P. obtusifolia* (100% de calogénèse au lieu de 60% à l'obscurité).

b/ Influence de la nature et de la concentration d'hormones.

Nous avons testé 7 types de milieux à l'obscurité pour l'espèce *P. martinii* (figure n°46). Cette espèce semble nécessiter des niveaux d'hormones un peu plus élevés que ceux appliqués à l'expérience précédente. De fait, au seuil de 0,4 mg.l⁻¹ de NAA et de kinétine, la callogénèse se produit de manière importante et il en est de même aux



Photo 13 : cal de *P. obtusifolia* obtenu a la lumière

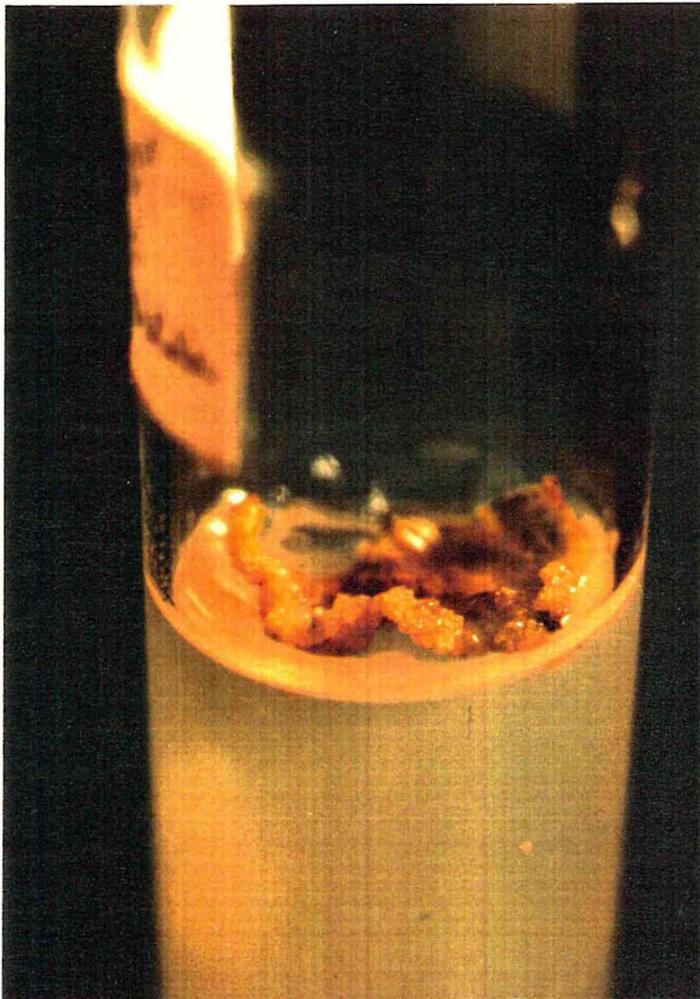


Photo 14 : cal de *P. plumosa*
obtenu a la lumière

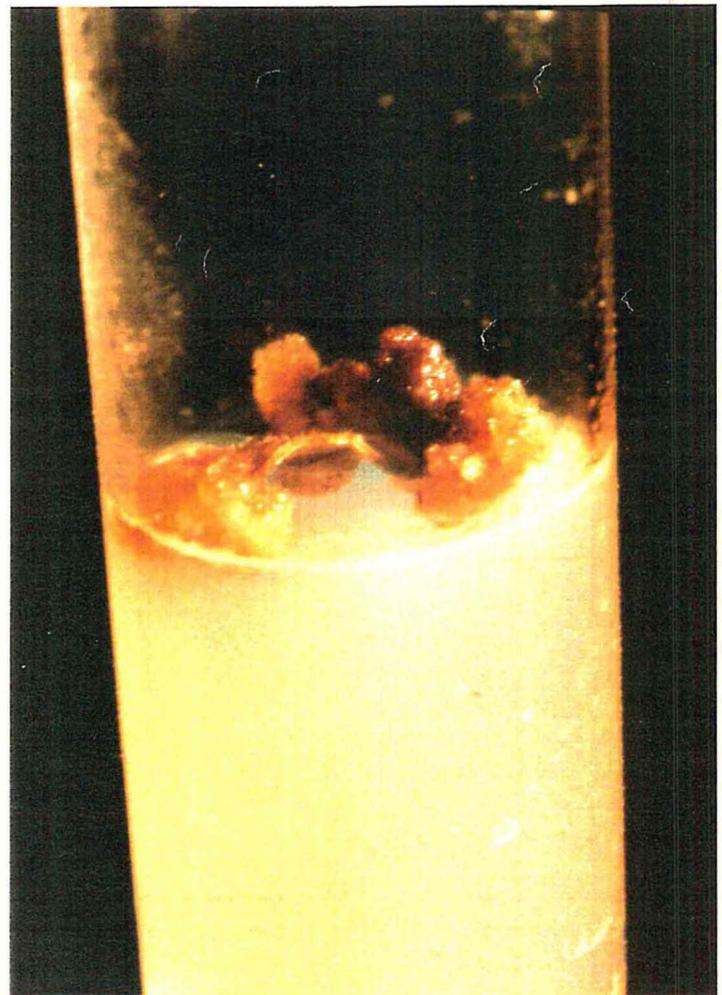


Photo 15 : cal de *P. cinerea*
obtenu a l'obscurité

Culture de cals sur milieu gelose P. martinii - Obscurite - 25 C

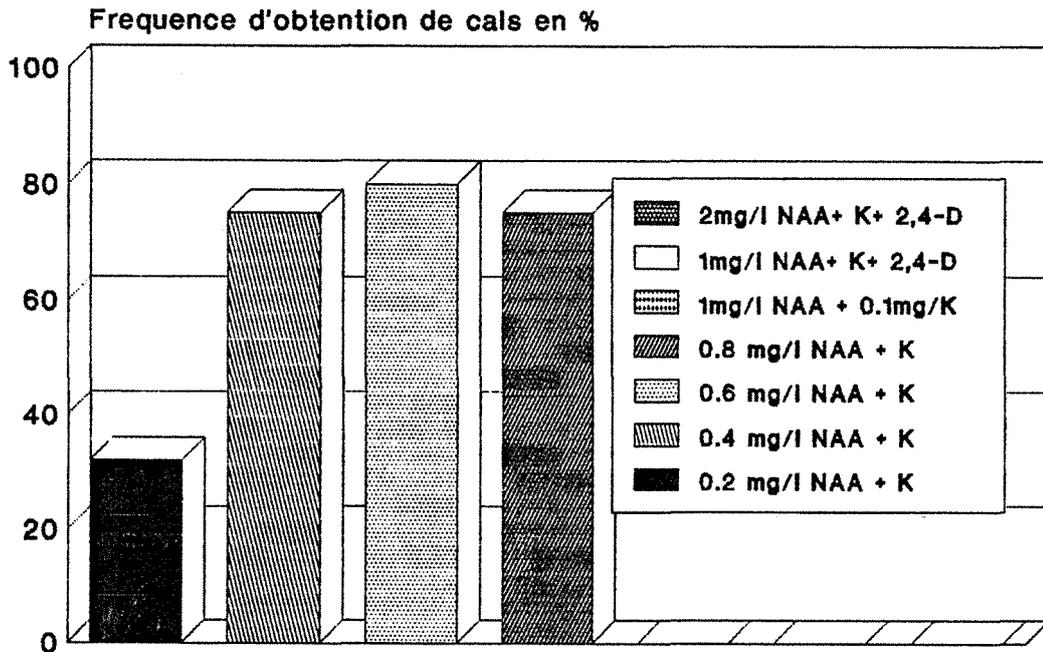


Figure 46

Culture de cals sur milieu gelose P. cinerea - Obscurite - 25 C

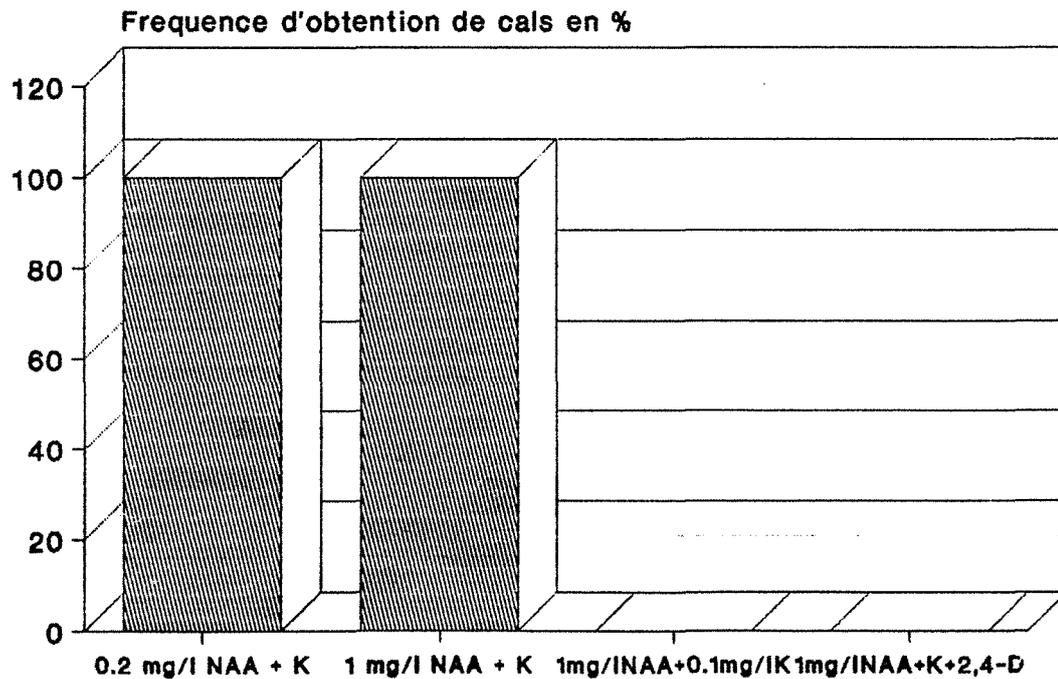


Figure 47

concentrations de 0,6 et 0,8 mg.l⁻¹. Le traitement avec 1 mg.l⁻¹ de NAA et 0,1 mg.l⁻¹ de kinétine n'a pas conduit à l'obtention de cals. Il semblerait que l'on puisse évoquer le rôle important de la kinétine sur la division cellulaire et donc son action à un seuil plus élevé que 0,1 mg.l⁻¹. Les deux traitements au 2,4-D ont conduit à une nécrose totale des tissus foliaires.

En ce qui concerne *P. cinerea*, nous avons testé 4 types de milieux différents à l'obscurité (figure 47). D'excellents résultats ont été obtenus avec les milieux contenant : 0,2 mg.l⁻¹ de NAA + K et 1 mg.l⁻¹ de NAA + K. En revanche, l'essai avec 1 mg.l⁻¹ de NAA et 0,1 mg.l⁻¹ de K n'ayant rien donné, il semble bien que l'on soit confronté à un effet seuil de la kinétine, inefficace à un niveau de 0,1 mg.l⁻¹. Comme chez *P. martinii*, l'ensemble du traitement au 2,4-D a présenté une nécrose des tissus mis en culture.

Il est important de noter que ces cultures en milieu solide ont présenté un brunissement des cals et des milieux pour toutes les espèces étudiées excepté pour *P. obtusifolia*. Dans le cas de cette espèce, les cals obtenus à la lumière étaient même généralement chlorophylliens. Ce brunissement peut être attribué à l'oxydation des polyphénols excrétés par les cellules.

V/ DISCUSSION.

La méthode de dissociation mécanique mise au point pour cette série d'expériences semble être un moyen simple à mettre en oeuvre, efficace et reproductible pour l'obtention de cellules isolées de Psoralées.

Le milieu proposé par Murashige et Skoog (1962) est apparu satisfaisant, aussi bien pour les cultures solides que pour les cultures liquides de Psoralées.

Nous avons mis en évidence un effet inoculum sur la croissance des cellules isolées de Psoralées en milieu liquide. Le meilleur pourcentage d'augmentation correspond dans notre expérience à un niveau de départ voisin de $1,5 \cdot 10^5$ cellules/ml. La croissance constatée est alors d'environ 180% après 12 à 15 jours de culture par rapport au nombre initial de cellules. Nos chiffres de croissance peuvent être considérés comme encourageants puisque Chaumont et Gudin (1985) ont obtenu des augmentations du nombre de cellules atteignant au plus 70% avec *P. bituminosa* mais sans source de carbone (cultures autotrophes). L'optimum de concentration cellulaire que nous avons obtenu est moins élevé que celui de ces mêmes auteurs qui avancent le chiffre de $8,5 \cdot 10^5$

cellules/ml.

Chaumont et Gudin (1985) ont également constaté une décroissance du nombre de cellules après la troisième semaine de culture. Pour nos expérimentations, cette phase est intervenue pendant ou à la fin de la seconde semaine. Deux hypothèses peuvent être évoquées pour expliquer ce phénomène.

- Il pourrait s'agir d'un épuisement du milieu nutritif en une substance nécessaire à la croissance. Cependant la reprise d'une certaine croissance après le 50^{ème} jour tendrait à rejeter cette hypothèse; à moins que l'on ait affaire à un produit remis à disposition par les cellules mortes et qui serait mobilisable à nouveau.

- L'effet observé pourrait correspondre à l'accumulation d'un produit inhibiteur de croissance dans le milieu. Dans le cas où cette substance serait métabolisable ou dégradable au cours du temps, on pourrait alors expliquer la reprise de croissance tardive.

En ce qui concerne le complément d'hormones à apporter au milieu liquide, il semble que l'augmentation de la concentration en NAA soit défavorable à la croissance cellulaire pour les inoculums les plus faibles. Des études à venir devront compléter ce résultat en testant l'effet de teneurs en NAA encore inférieures à celles employées ici. Pour ce qui est des milieux solides, il est possible que nous ayons mis en évidence un effet seuil de la kinétine qui semble inefficace à des doses de $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$. Le 2,4-D apparaît également comme extrêmement défavorable à la callogénèse, au moins pour les doses testées. Il pourrait s'agir dans ce cas d'un effet toxique et il conviendra d'analyser les conséquences de concentrations plus réduites en 2,4-D. A la vue de ces résultats, il pourrait être intéressant d'essayer de nouvelles hormones ; on pense en particulier à d'autres types de cytokinines comme la benzyladénine qui conduit parfois à une meilleure croissance que la kinétine (Chaumont et Gudin, 1985).

Les cultures de cals ont également mis en évidence le rôle généralement néfaste de la lumière sur la callogénèse. La seule espèce ayant réagi positivement à l'éclairement est, en effet, *P. obtusifolia*. Les croissances comparées des suspensions cellulaires, à la lumière et à l'obscurité, n'ont pas été entreprise dans cette étude mais pourront être envisagées.

Nous avons donc mis au point un ensemble de techniques et de méthodes qui permettent d'obtenir des cultures *in-vitro* à partir de quelques espèces de Psoralées. La poursuite de ce travail devra prendre en compte la teneur en furocoumarines des

différentes cultures. En particulier, l'établissement de lignées cellulaires aussi stables et performantes que possible dans leur capacité de synthèse des psoralènes semble une voie de passage obligée. La possibilité d'induction de la synthèse des furocoumarines par un milieu de culture adapté semble réaliste. En effet, dans les expériences portant sur les plantes entières, nous avons déjà insisté sur le rôle fondamental de la nutrition azotée de la plante. Une étude de la forme d'azote à apporter à la culture *in-vitro* et ses répercussions sur la teneur en furocoumarines semble s'imposer. En outre, nous savons désormais que les furocoumarines peuvent être considérées comme des phytoalexines chez les Psoralées. Il apparaît ainsi particulièrement indiqué de tester, dans un proche avenir, l'action d'inducteurs (ou d'éliciteurs suivant le terme anglais) sur la production de ces métabolites secondaires. Les solutions de produits chimiques utilisées sur les plantes entières pourraient néanmoins être incompatibles avec une croissance cellulaire si on les ajoutait directement au milieu de culture *in-vitro*. Dans ce cas, il serait intéressant de tester l'effet d'éliciteurs tels que les mycéliums autoclavés qui donnent parfois de bons résultats (Hamerski et Matern, 1988).

CONCLUSION GENERALE.

Nous avons étudié des plantes australiennes du genre *Psoralea* (Légumineuses) qui synthétisent des métabolites secondaires du type furocoumarines afin de proposer des ressources végétales, alternatives à une synthèse chimique pure des psoralènes.

Les expériences conduites en conditions contrôlées (chambres phytotroniques et serres) ont permis d'obtenir un cycle de développement complet, depuis la germination jusqu'à la récolte des semences, pour les trois espèces retenues : *P. cinerea*, *P. plumosa* et *P. martinii*.

En particulier, nous avons pu proposer une méthodologie permettant d'assurer une bonne germination (environ 90% de levée), phénomène qui n'intervient que très difficilement sans l'application de ces techniques. Les semences des Psoralées étudiées présentent, en effet, une double inhibition de germination : d'ordre mécanique (due à l'épaisseur du tégument) et d'ordre chimique (due au psoralène contenu dans le péricarpe). Cette double inhibition peut être levée soit en scarifiant les semences par une attaque à l'acide sulfurique concentré soit par un trempage dans de l'eau chaude suivi d'une scarification manuelle des téguments.

Nous avons également analysé les exigences de ces plantes en matière d'azote en étudiant l'effet de différentes nutritons azotées sur la production de biomasse (feuilles et tiges) et le rendement en semences. Nous avons ainsi démontré le rôle fondamental des bactéries symbiotiques de la famille des *Bradyrhizobium* et nous pouvons d'ores et déjà proposer certaines souches plus efficaces que d'autres pour chacune des trois espèces de Psoralées étudiées. Les meilleurs résultats de rendements en grains ont été obtenus avec la souche CB 2063 pour *P. cinerea*, avec les deux souches CB 2063 et USDA 3451 pour *P. plumosa*. Les semences récoltées sont aptes à germer normalement. *P. martinii* a peu fructifié (auto-incompatibilité pollinique) même lorsqu'elle était associée à la souche USDA 3451 assurant une bonne production de biomasse. Cette espèce apparaît donc moins intéressante que les deux précédentes pour la culture de plantes entières de Psoralées car l'auto-provisionnement en semences ne pourrait être réalisé.

Dans un second temps, les Psoralées ont été analysées du point de vue de leur teneur en furocoumarines. Cette étude a d'abord permis d'identifier deux furocoumarines présentes chez les Psoralées : l'angélicine et surtout le psoralène, d'un grand intérêt pour l'industrie pharmaceutique.

Tous les organes des trois espèces étudiées ont révélé des taux d'angélicine supérieurs à ceux du psoralène. La teneur en furocoumarines totales, quant à elle, semble dépendante d'un grand nombre de facteurs :

-1/ de l'espèce végétale. Pour des conditions de croissance identiques, les plus fortes teneurs ont été mises en évidence avec l'espèce *P. martinii*.

-2/ de l'organe végétal. *P. cinerea* et *P. plumosa* qui ont abondamment fructifié, ont présenté les plus fortes concentrations dans les organes reproducteurs (fruits immatures et semences) et des niveaux plus faibles dans les parties végétatives (feuilles ou tiges).

-3/ des conditions de la nutrition azotée. Le métabolisme de l'azote a une forte action sur la synthèse des furocoumarines chez les Psoralées. Les plus fortes teneurs ont été enregistrées pour les lots de plantes présentant les meilleures croissances (inoculation avec une souche bactérienne performante ou fertilisation avec 120 uN/ha).

-4/ des facteurs du milieu. Le facteur thermique intervient sur le niveau de synthèse des furocoumarines. Les températures élevées produisent des teneurs accrues dans les plantes.

-5/ des facteurs de "stress". La teneur en furocoumarines des Psoralées peut être considérablement augmentée en les vaporisant avec des agents chimiques agressifs. Cette propriété semble être l'expression du rôle des furocoumarines comme phytoalexines chez les Psoralées.

Sur un plan pratique, il nous est désormais possible de préconiser un ensemble de méthodes culturales qui devraient conduire à une production élevée de furocoumarines par unité de surface :

- *P. cinerea* et *P. plumosa* présentent un intérêt voisin du point de vue de la production de furocoumarines par plante. On conseillera cependant d'utiliser l'espèce *P. cinerea* sur laquelle ont déjà été testés divers paramètres susceptibles d'accroître la teneur en métabolites : le facteur thermique et des traitements chimiques agressifs.

- Il conviendra d'assurer une bonne nutrition azotée de la culture (inoculation bactérienne ou fertilisation azotée minérale).

- Les conditions climatiques favorables à une bonne croissance des Psoralées étudiées correspondent à celles enregistrées entre les mois de Mai et Octobre dans le sud de l'Europe (Espagne, Italie, Provence).

- La culture pourra être traitée à plusieurs reprises avec des agents chimiques agressifs afin d'accroître les teneurs en furocoumarines..

- Il semble également possible d'augmenter la production de biomasse et les rendements en semences en réalisant deux à trois coupes.

Dans ces conditions, une production de furocoumarines par hectare de l'ordre de 6 kg de psoralène et 18 kg d'angélicine peut être raisonnablement envisagée.

Parallèlement à la culture de plantes entières, nous avons cherché à développer une nouvelle alternative pour la production de furocoumarines : la culture de cellules isolées.

Notre étude a montré qu'il est possible de dissocier mécaniquement des cellules du mésophylle de *P. cinerea* et *P. martinii*. Cette méthode de broyage des tissus semble bien convenir aux Psoralées. Elle est, de plus, simple et rapide à mettre en oeuvre. En outre, le milieu de culture utilisé a permis une bonne croissance des cals et des suspensions cellulaires (+ 180% de cellules dans le meilleur des essais) et peut ainsi être considéré comme adapté à la culture *in-vitro* des Psoralées. Ces premiers résultats nous sont apparus comme très encourageants car ils démontrent que la culture *in-vitro* des Psoralées est une chose possible.

L'étude des suspensions cellulaires a, par ailleurs, révélé l'importance de la quantité de cellules inoculées sur le taux de croissance des cultures. Parmi les inoculums testés, il semble qu'un niveau intermédiaire de concentration soit le plus favorable ($1,5 \cdot 10^5$ cellules/ml).

La nature et les doses de substances de croissance à apporter interviennent également de manière fondamentale sur le taux de multiplication. Ainsi, dans le cas des cultures de cellules isolées, une teneur trop élevée en NAA et en kinétine semble défavorable à une bonne croissance. Les cultures de cals ont, quant à elles, permis de mettre en évidence l'effet globalement défavorable de la lumière, exception faite de l'espèce *P. obtusifolia* qui réagit positivement à l'éclairement. Les meilleures callogénèses ont été obtenues avec des concentrations de kinétine toujours supérieures à $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$.

Les études à venir devront établir des lignées cellulaires et préciser si les cultures cellulaires en suspension conservent leur aptitude à la synthèse des furocoumarines. Il conviendra alors d'analyser les facteurs exerçant une action favorable sur la production de métabolites. Le travail pourra consister à reprendre des études sur le modèle de celles que nous avons réalisées sur la production de furocoumarines par les plantes entières. Il est d'ailleurs fort probable qu'une partie des effets mis en évidence à l'échelle de la plante puisse être utilisée pour l'étude des mécanismes biosynthétiques au niveau cellulaire (phytoalexines, influence de la nutrition azotée). Inversement, on peut penser que l'étude des cultures de cellules isolées permettra d'avancer encore dans la connaissance des mécanismes fondamentaux qui régissent la synthèse des furocoumarines. De cette manière, les travaux entrepris à l'échelle cellulaire pourront avoir, en retour, des implications sur la production des furocoumarines par la plante entière.

En dernier ressort, si la synthèse des furocoumarines s'avère possible par ces deux méthodes, ce sera l'analyse des coûts de production respectifs qui permettra de trancher en faveur de l'une ou l'autre des voies de synthèse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

- ABU-MUSTAFA E. A., EL BAY F. K. A., FAYEZ H. B. E., 1970. Natural coumarins : the distribution of coumarins in the *Ammi majus* L. plant and a possible pattern for their biogenic evolution. *Planta Medica*, 18, 90-97.
- ALLEN O. N., ALLEN E. K., 1981. *The leguminosae. A source book of characteristics, uses, and nodulation*. The University of Wisconsin Press, Madison, 878 p.
- APPELMAN M. D., SEARS O. H., 1942. Further evidence of interchangeability among the groups of *Rhizobium leguminosarum*. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 7, 263-264.
- BASKIN J. M., LUDLOW C. J., HARRIS T. M., WOLF F. T., 1967. Psoralen, an inhibitor in the seeds of *Psoralea subacaulis* (Leguminosae). *Phytochemistry*, 9, 1209-1213.
- BEADLE N. C. W., 1964. Nitrogen economy in arid and semi-arid plant communities. Part III : The symbiotic nitrogen-fixing organism. *Proc. Linn. Soc. N.S.W.*, 89, 273-286.
- ✓ BEIER R. C., OERTLI E. H., 1983. Psoralen and other linear furocoumarins in celery. *Phytochemistry*, 22 (11), 2595-2597.
- BOARDLEY M., STIRTON C. H., HARBORNE J. B., 1986. A chemotaxonomic survey of the tribe *Psoralea* in Africa. *Biochem. Syst. Ecol., GBR*, 14, 603-613.
- ✓ BÖHM H., 1980. The formation of secondary metabolites in plant tissue and cell cultures. *International Review of Cytology*, supplément 11b, 183-208.
- BÖHM H., FRANKE J., 1982. Accumulation and excretion of alkaloids by *Macleaya microcarpa* cell cultures. I. Experiments on solid medium. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 177, 345-356.
- BOURGAUD F., ALLARD N., GUCKERT A., FORLOT P., 1989. Natural resources for furocoumarins. *Psoralens in 1988 : Past, Present and future of photochemoprotection and other biological activities*. John Libbey Eurotext, Montrouge, 219-229.
- BOWEN G. D., 1956. Nodulation of indigenous legumes to Queensland. *Queensland J. of Agricultural Society*, 13, 47-60.

- BROWN S. A., 1970. Biosynthesis of furanocoumarins in parsnip. *Phytochemistry*, **9**, 2471-2475.
- ✓ BROWN S. A., 1981. Coumarins. *The Biochemistry of Plants*. Academic Press Inc., **7**, 269-300.
- CAPORALE G., DALL'ACQUA F., CAPOZZI A., MARCIANI S., CROCCO R., 1971. Studies on the biosynthesis of some furocoumarins present in *Ruta graveolens*. *Z. Naturforsch.*, **26b**, 1256.
- CAPPELLETTI E. M., INNOCENTI G., CAPORALE G., 1984. Furocoumarins localization in the fruit and seed of *Psoralea corylifolia* L.. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, **18** (3), 181-189.
- ✓ CESKA O., CHAUDHARY S. K., WARRINGTON P. J., ASHWOOD-SMITH H. M. J., 1987. Photoactive furocoumarins in fruits of some Umbellifers. *Phytochemistry*, **26** (1), 165-169.
- ✓ CHAUDHARY S. K., WARRINGTON P., ASHWOOD-SMITH H. M. J., 1985. Increased of furanocoumarin content of celery during storage. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, **33** (6), 1153-1157.
- CHAUMONT D., GUDIN C., 1985. Division and growth of mesophyll cells isolated from *Psoralea bituminosa* leaves. *Enzyme and Microbial Technology*. **7** (9), 437-442.
- CORBY H. D. L., 1974. Systematic implications of nodulation among Rhodesian legumes. *Kirkia*, **9**, 301-329.
- CROWDEN R. K., HARBORNE J. B., HEYWOOD V. H., 1969. Chemosystematics of the *Umbelliferae*. A general survey. *Phytochemistry*, **8**, 1963-1984.
- DALL'ACQUA F., CAPOZZI F., MARCIANI S., CAPORALE G., 1972. Biosynthesis of furocoumarins : further studies on *Ruta graveolens*. *Z. Naturforsch.* , **27b**, 813.
- DALL'ACQUA F., INNOCENTI G., CAPORALE G., 1975. Biosynthesis of O-alkyl-furocoumarins. *Planta Medica*, **27**, 343-348.
- DE LACY I. H., BRITTEN E. J., 1970. Cytogenetics of the species of *Psoralea* native to the semi-arid Australian tropics. *Proceedings of the 11th international grasslands congress*. University of Queensland Press. 281-284.

- DIELS L., 1906. *Die Vegetation der Erde VII. Die Pflanzenwelt von West-Australien. Südlich des Wendekreises von Dr. diels.* Leipzig-Verlag von Wilhem Engelmann.
- DIXON R. A., 1985. Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. *Plant Cell Culture, a Practical Approach.* IRL Press, Oxford, Washington DC.
- DORBEC V., 1985. Etude de la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique chez deux Légumineuses Fouragères perennes *Medicago sativa* et *Psoralea bituminosa*. *DEA d'Agronomie.* Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier. 23 p.
- ENGLER A., 1906. *Die Vegetation der Erde IX. Die Pflanzenwelt Africas. Die Familien der afrikaanischen Pflanzenwelt. 2-Die dikotyledonen Angiospermen : Casuarinaceae bis Dichapetalaceae.* Leipzig-Verlag von Wilhem Engelmann.
- ✓ ENRIQUEZ R. G., ROMERO M. L., ESCOBAR L. I., JOSEPH-NATHAN P., REYNOLDS W. F., 1984. High-performance liquid chromatographic study of *Casimiroa edulis*. II. Determination of furanocoumarins. *J. of Chromatography*, 287, 209-214.
- FITZPATRICK T. B., PATHAK M. A., 1959. Historical aspects of methoxsalen and other furocoumarins. *J. of Investigative dermatology*, 32 (II), 229-231.
- FLINIAUX M. A., JACQUIN-DUBRUEIL A., 1988. Application de l'immunologie à la détection et au dosage des alcaloïdes tropaniques et nicotiniques. *Communication affichée, colloque APRIA, Paris.*
- FLOSS H. G., PAIKERT H., 1969. Biosynthesis of furanocoumarins in *Pimpinella magna* (*Umbelliferae*). *Phytochemistry*, 8, 589-596.
- FOLWKS W. L., 1959. The chemistry of the psoralens. *J of Investigative Dermatology*, 32 (2), 249-254.
- FUJITA Y., HARA Y., OGINO T., SUGA C., 1981. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. I. Effects of nitrogen sources on the production of shikonin derivatives. *Plant Cell Reports*, 1, 59-60.
- GAUTHERET R. J., 1959. *La culture de tissus végétaux. Culture de cellules isolées.* Masson, Paris, 722-730.

GROBBELAAR N., CLARKE B., 1972. A qualitative study of the nodulating ability of legume species : list 2. *J. of South African Botany*, **38** (4), 241-247.

GUTTERIDGE R. C., WHITEMAN P. C., 1975. Effect of defoliation frequency on growth and survival of four accessions of *Psoralea eriantha*. *Australian J. of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, **15**, 493-497.

HAMERSKI D., MATERN U., 1988. Elicitor-induced biosynthesis of psoralen in *Ammi majus* L. suspension cultures. Microsomal conversion of demethylsuberosin into (+)marmesin and psoralen. *European J. of Biochemistry*, **171**, 369-375.

HARA Y., MORIMOTO T., FUJITA., 1987. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. V. Differences in the production between callus and suspension cultures. *Plant Cell Reports*, **6**, 8-11.

INNOCENTI G., BOURGAUD F., MOREL J. L., CAPORALE G., 1989. Isolation, characterisation and quantification of coumarin constituents of *Psoralea canescens*. *Communication affichée. VIème colloque international de la société espagnole de chimie pharmaceutique, Grenade.*

INNOCENTI G., CAPPELLETTI F. M., CAPORALE G., 1984. Morphological and chemical characteristics of some Australian *Psoralea* species. *Int. J. Drug. Res.*, **22** (3), 97-109.

INNOCENTI G., DALL'ACQUA F., CAPORALE G., 1976. Investigations of the content of furocoumarins in *Apium graveolens* and in *Petroselinum sativum*. *Planta Medica*, **29**, 165-170.

INNOCENTI G., DALL'ACQUA F., GUIOTTO A., CAPORALE G., 1977. Investigation on the role of 7-demethyl suberosin in the biosynthesis of linear furocoumarins. *Atti dell'Istituto Veneto di Scienze Lettere ed Arti*. **135**, 37-47.

IVIE G. W., 1978. Linear furocoumarins (psoralens) from the seeds of Texas *Ammi majus* L. (Bishop's Weed). *J. of Agricultural Chemistry*. **26**, 1394-1403.

JOHNSON C., BRANNON D. R., KUC J., 1970. Xanthotoxin : a phytoalexin of *Pastinaca sativa* roots. *Phytochemistry*, **12**, 2961-2962.

JULLIEN M., ROSSINI L., 1976. L'obtention de cellules séparées à partir du tissu foliaire chez les plantes supérieures : intérêts et potentialités d'une méthode mécanique. *Annales de l'Amélioration des Plantes*, 27, 87-103.

JUNTILLA G., 1976. Allelopathic inhibitor in seeds of *Heracleum laciniatum*. *Physiologia Plantarum*, 36, 374-378.

KATO T., KOBAYASHI M., SASAKI N., KITAHARA Y., TAKAHASHI N., 1978. The coumarin heraclenol as a growth inhibitor in Parsley seeds. *Phytochemistry*, 17, 158-159.

KEIGHERY G. J., DIXON I. R., 1981. *Psoralea*: The genus in Western Australia. *Australian plants*, 11 (86), 58-59.

KERRIDGE P., SKERMAN P. J., 1968. The distribution and growth characteristics of the native legume *Psoralea eriantha* in Western Queensland. *Tropical Grasslands*, 2, 41.

KEYSER H. H., GRIFFIN R. F., 1987. *Beltsville Rhizobium Culture Collection Catalog*, USDA, Agricultural Research Service, 79 p.

KIRK D. R., 1970. *Wild edible plants of Western United States*. Naturgraph publishers, Healdsburg, California, 256-257.

KUSKE H., 1938. Experimentelle Untersuchungen zur Photosensibilisierung der Haut durch pflanzliche Wirkstoffe. *Arch. F., Dermatol. Syphil.*, 178, 112-113.

LANGKAMP P. L., SWINDEN L. B., DALLING M. J., 1979. Nitrogen fixation (acetylene reduction) by *Acacia pellita* on areas restored after mining at Groote Eyland, Northern Territory. *Australian J. of Botany*, 27, 353-361.

LAURENT M. EM., 1891. Recherches sur les nodosités radicales des Légumineuses. *Annales de l'Institut Pasteur*, 5, 105-139.

LAWRIE A C., 1981. Nitrogen fixation by native Australian legumes. *Australian J. of Botany*, 29, 143-157.

LEE A. T., 1980. The *Psoralea patens* complex. *Telopea*, 2 (1), 129-141.

- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-497.
- PATHAK M. A., DANIELS F. Jr., FITZPATRICK T. B., 1962. The presently known distribution of furocoumarins (psoralens) in plants. *J. of investigative dermatology*, **39**, 225-239.
- PROGNON P., HAMON M., MAHUZIER G., 1985. Psoralènes d'intérêt thérapeutique. Etude des propriétés physicochimiques utilisables en chromatographie liquide. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, **44** (1), 19-29.
- RIDEAU M., 1988. Stratégie d'obtention de souches végétales à haute capacité de production de métabolites. *Communication orale, colloque APRIA, Paris*.
- RODIGHERO G., DALL'ACQUA F., 1976. Biochemical and medical aspects of psoralens. *Photochemistry and Photobiology*, **24**, 647-653.
- SCOTT B. R., PATHAK M. A., MOHN G. R., 1976. Molecular and genetic basis of furocoumarin reactions. *Mutation Research*, **39**, 29-74.
- SONG P. S., TAPLEY K. J., 1979. Photochemistry and photobiology of psoralens. *Photochemistry and Photobiology*, **29**, 1177-1197.
- SOUETRE E., SALVATI E., DARCOURT G., 1989. Melatonin and depression : a possible role of psoralen. *Psoralens in 1988 : Past, Present and future of photochemoprotection and other biological activities*. John Libbey Eurotext, Montrouge, 436 p.
- STECK W., 1970. Leaf furocoumarins of *Hereacleum lanatum*. *Phytochemistry*, **9**, 1145-1146.
- ✓ STECK W., BAILEY B. K., 1969. Leaf coumarins of *Angelica archangelica*. *Canadian journal of chemistry*, **47**, 2425-2430.
- ✓ SURICO G., VARVARO L., SOLFRIZZO M., 1987. Linear furocoumarin accumulation in celery infected with *Erwinia carotovora*. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, **35** (3), 406-409.
- TORREY J. M. D., GRAY A. M. D., 1969. *Flora of North America*. **1**, Facsimile of the 1838-43 edition, Hafner publishing company, New York, 711 p.

VINCENT J. M., 1970. *A manual for the practical study of root nodules bacteria*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 164 p.

WINK M., WITTE L., SCHIEBEL H. M., HARTMANN T., 1980. Alkaloid pattern of cell suspension cultures and differentiated plants of *Lupinus polyphyllus*. *Planta Medica*, **38**, 238-240.

WOOD M., COOPER I. E., HOLDING A. J., 1983. Method to assess the effects of soil acidity factors on legume-*Rhizobium* symbioses. *Soil Biol. Biochem.*, **15** (1), 123-124.

YAZAKI K., FUKUI H., KIKUMA M., TABATA M., 1987. Regulation of shikonin production by glutamine in *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures. *Plant Cell Reports*, **6**, 131-134.

✓ YEARGERS E., AUGENSTEIN L., 1965. Absorption and emission spectra of psoralen and 8-methoxypsoralen in powders and in solutions. *J of Investigative Dermatology*, **44** (3), 181-187.

ZENK M. H., EL-SHAGI H., ARENS H., STOCKIGT J., WEILER E. W., DEUS B., 1977; Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *catharanthus roseus*. *Plant Tissue Culture and its Biotechnological application*. Springer-verlag, Berlin, 27-43.

ZRYD J. P., 1988. Culture in-vitro et production de métabolites secondaires. *Culture de Cellules, Tissus et Organes Végétaux*. Presses Polytechniques romanes, 227-234.

ANNEXES

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE N°I : gammes étalons pour le dosage des furocoumarines à l'HPLC.

p

ANNEXE N°II : détail des résultats de dosage des furocoumarines par fraction-d'extraction.

p

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE N°I : gammes étalons pour le dosage des
furocoumarines à l'HPLC.

p 137

ANNEXE N°II : détail des résultats de dosage des
furocoumarines par fraction d'extraction.

p 138

ANNEXE n° II: détail des résultats de dosage des furocoumarines par fraction d'extraction (I, II, ou III).

Tableau n°1 : teneur en furocoumarines des feuilles de P. cinerea selon les traitements et les fractions d'extraction (expérience en phytotron).

temoin	I	II	III	total
Angélicine	361	0	19	380
Psoralène	78	0	4	82

CB 2063	I	II	III	total
Angélicine	1287	0	19	1307
Psoralène	416	0	1	417

USDA 3100	I	II	III	total
Angélicine	346	90	27	463
Psoralène	126	0	0	126

USDA 3451	I	II	III	total
Angélicine	226	2	0	228
Psoralène	131	2	0	136

AZOTE	I	II	III	total
Angélicine	203	6	2	211
Psoralène	78	0	0	78

Tableau n°2 : teneur en furocoumarines des semences de P. cinerea selon les traitements et les fractions d'extraction (expérience en phytotron).

temoin	I	II	III	total
Angélicine	43	0	34	77
Psoralène	4	0	2	6

CB 2063	I	II	III	total
Angélicine	127	44	280	451
Psoralène	37	15	81	133

USDA 3451	I	II	III	total
Angélicine	215	698	577	1490
Psoralène	68	72	151	291

azote	I	II	III	total
Angélicine	782	94	603	1480
Psoralène	267	26	191	485

Tableau n°3 : teneurs en furocoumarines des fruits immatures de P. cinerea selon les traitements et les fractions d'extraction (expérience en phytotron).

CB 2063	I	II	III	total
Angélicine	1523	41	133	1697
Psoralène	505	9	3	517

USDA 3451	I	II	III	total
Angélicine	2897	454	494	3845
Psoralène	596	124	132	852

Tableau n°4 : Teneur en furocoumarines des feuilles de *P. martinii* selon les traitements et les fractions d'extraction (expérience en phytotron).

temoin	I	II	III	total
Angélicine	91	2	8	101
Psoralène	36	0	8	44

USDA 3100	I	II	III	total
Angélicine	0	1	27	28
Psoralène	10	0	2	12

USDA 3451	I	II	III	total
Angélicine	4982	14	14	5010
Psoralène	2913	8	5	2925

azote	I	II	III	total
Angélicine	94	0	2	96
Psoralène	3	1	2	5

Tableau n°5 : teneurs en furocoumarines des tiges de *P. plumosa* selon les traitements et les fractions d'extraction (expérience en phytotron).

temoin	I	II	III	total
Angélicine	17	21	462	500
Psoralène	10	0	0	10

CB 2063	I	II	III	total
Angélicine	210	25	31	266
Psoralène	77	4	7	88

USDA 3451	I	II	III	total
Angélicine	199	5	2	206
Psoralène	47	4	0	51

azote	I	II	III	total
Angélicine	145	7	2	154
Psoralène	47	2	0	49

Tableau n°6 : teneur en furocoumarines des semences de *P. plumosa* selon les traitements et les fractions d'extraction (expérience en phytotron).

CB 2063	I	II	III	total
Angélicine	15	39	1191	1245
Psoralène	8	19	341	368

USDA 3451	I	II	III	total
Angélicine	457	159	765	1381
Psoralène	135	71	348	554

Tableau n°7: Teneur en furocoumarines des feuilles de P. cinerea selon les traitements et les fractions d'extraction (expérience en serre)

temoin	I	II	III	total
Angélicine	233	1	71	304
Psoralène	68	0	0	68

CB 2063	I	II	III	total
Angélicine	310	20	13	343
Psoralène	164	0	3	167

AZOTE 120u	I	II	III	total
Angélicine	246	29	59	334
Psoralène	147	2	0	149

Tableau n°8: teneur en furocoumarines des semences de P. cinerea selon les traitements et les fractions d'extraction (expérience en serre).

temoin	I	II	III	total
Angélicine	20	0	0	20
Psoralène	1	0	0	1

CB 2063	I	II	III	total
Angélicine	614	2118	1230	3962
Psoralène	41	492	363	896

AZOTE 120u	I	II	III	total
Angélicine	72	1606	621	2299
Psoralène	23	433	50	506

Tableau n°9 : teneur en furocoumarines des fruits immatures de P. cinerea selon les traitements et les fractions d'extraction (expérience en serre).

CB 2063	I	II	III	total
Angélicine	359	3922	328	4609
Psoralène	111	339	106	556

AZOTE 120u	I	II	III	total
Angélicine	478	2296	644	3418
Psoralène	145	385	186	716

**BIOLOGICAL STUDIES OF PHARMACEUTICALLY USEFUL PSORALEA (LEGUMINOSAE)
SPECIES, PRODUCING FUROCUMARINS. IN-VITRO CULTURE TRIALS.**

SUMMARY

We have studied Australian *Psoralea* species (*Leguminosae*) which synthesize secondary metabolites belonging to furocoumarins (psoralens). Experiments conducted under controlled conditions led to a complete developmental cycle, from germination to seed harvest, and for the 3 species : *P. cinerea*, *P. plumosa* , and *P. martinii*. On this purpose, symbiotic bacteria (*Bradyrhizobia*) were shown to be essential for *Psoralea* growth. The 3 species contained 2 furocoumarins : angelicin and psoralen, and principally in the reproductive organs (immature fruits, seeds). Furocoumarin content in the plant was shown to vary greatly according to plant parameters (species, organ) and environmental conditions (N uptake, temperatures). There is also evidence that furocoumarins acts as phytoalexins in *Psoralea* plants. In-vitro culture trials gave good results with growth of cell suspension and calli cultures. Consequently, it will be possible to study furocoumarin synthesis by cell suspension cultures in the future.

KEY WORDS : *Leguminosae*, *Psoralea*, furocoumarin, psoralen, *Rhizobium*, phytoalexin, *in-vitro* culture.

ETUDE DE LA BIOLOGIE DE PLANTES DU GENRE PSORALEA (LEGUMINEUSES),
PRODUCTRICES DE FUROCOUMARINES A INTERET PHARMACEUTIQUE. ESSAIS DE
CULTURES IN-VITRO.

RESUME :

Nous avons étudié des plantes du genre *Psoralea* (Légumineuses) qui synthétisent des métabolites secondaires du type furocoumarines (psoralènes). Les expériences conduites en conditions contrôlées ont permis d'obtenir un cycle de développement complet, depuis la germination jusqu'à la récolte des semences, pour les trois espèces retenues : *P. cinerea*, *P. plumosa* et *P. martinii*. Nous avons pu ainsi démontrer le rôle fondamental des bactéries symbiotiques (*Bradyrhizobium*) dans la croissance des Psoralées. L'étude de la distribution des furocoumarines dans les plantes a révélé la présence d'angélicine et de psoralène, qui sont principalement localisés dans les organes reproducteurs (fruits immatures et semences). Les concentrations en furocoumarines sont apparues étroitement dépendantes d'un ensemble de paramètres reliés à la plante (espèce, organe végétal) ou aux facteurs du milieu (conditions de la nutrition azotée, température). Les furocoumarines semblent également jouer le rôle de phytoalexines chez les Psoralées. Les essais concernant la culture in-vitro ont montré que les Psoralées sont un matériel végétal adapté à l'obtention de cellules isolées ou de cals. L'étude de la synthèse des furocoumarines par des suspensions cellulaires de Psoralées peut donc être envisagée favorablement.

MOTS CLES : Légumineuse, *Psoralea*, furocoumarine, psoralène, *Rhizobium*, phytoalexine, culture *in-vitro*.