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

136026 065 7

©INPL 2001

LABORATOIRE AGRONOMIE et ENVIRONNEMENT associé INRA

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'AGRONOMIE ET DES INDUSTRIES ALIMENTAIRES

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

[T] 2001 MILESI, S.

THESE

présentée par

Sandrine MILESI

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

en vue de l'obtention du diplôme de

Docteur de l'INPL

en Sciences Agronomiques

Etude de la production de furocoumarines par la Rue officinale (*Ruta graveolens* L.) : cultures de plantes au champ et cultures *in vitro*

soutenue publiquement le 16 mars 2001, devant le jury composé de :

M. A. Guckert	*Professeur, ENSAIA-INPL, Nancy*	Président
Mme M-J. Amiot-Carlin	*Directeur de Recherche, INRA, Avignon*	Rapporteur
M J-C. Laberche	*Professeur, IUT, Amiens*	Rapporteur
Mme M. Dubedout	*Responsable R&D, Sanofi, Limours*	Examinateur
M. F. Bourgaud	*Professeur, ENSAIA-INPL, Nancy*	Examinateur
M. E. Gontier	*Maître de Conférences, ENSAIA-INPL, Nancy*	Examinateur

à mes Parents

à Sylvain

AVANT-PROPOS

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au Laboratoire Agronomie et Environnement associé INRA, de l'Ecole Nationale d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA). Je souhaite faire part de toute ma reconnaissance aux personnes qui ont contribué à ce travail de recherche.

Je tiens à remercier **Monsieur Armand Guckert**, Professeur à l'ENSAIA et Directeur du laboratoire, qui m'a accueillie dans son équipe de recherche. Je le remercie du temps qu'il a consacré à la lecture des articles et de ces conseils qui m'ont été très précieux. Je suis très honorée qu'il préside le jury de thèse.

Je voudrais remercier les chercheurs qui ont accepté de participer au Jury de cette thèse. **Madame Marie-Josèphe Amiot-Carlin**, Directeur de Recherche à l'INRA, et **Monsieur Jean-Claude Laberche**, Professeur à l'IUT d'Amiens, seront rapporteurs de cette thèse. J'attends avec impatience leurs critiques et leur jugement sur ce travail de recherche. Je remercie également **Madame Martine Dubedout**, responsable Sélection végétale chez Sanofi, qui a accepté de participer au jury en tant qu'examinateur. Le regard d'un acteur industriel sur ces travaux sera particulièrement enrichissant pour moi.

Toute ma reconnaissance va à **Monsieur Frédéric Bourgaud**, Professeur à l'ENSAIA et Directeur de thèse. J'aimerais souligner ici la disponibilité et la patience qu'il m'a accordée tout au long de la thèse. Je le remercie de l'entière confiance qu'il m'a accordée et qui a permis de me sentir partie intégrante de son équipe de recherche. Frédéric Bourgaud a su me communiquer l'enthousiasme qu'il porte à la recherche et à la thématique qu'il développe.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à **Monsieur Eric Gontier**, Maître de Conférences à l'ENSAIA et co- Directeur de thèse. Ses conseils et son avis scientifique ont énormément compté tout au long de la thèse. Je tiens à mettre en avant le dynamisme qu'Eric Gontier apporte dans son travail et aux personnes qui travaillent avec lui. Nos discussions scientifiques, mais aussi celles moins formelles, resteront pour moi un soutien remarquable.

Frédéric et Eric, j'ai eu un plaisir immense à travailler avec vous et j'ose espérer que nos chemins se croiseront à nouveau lors de collaborations scientifiques fructueuses.

Je voudrais aussi remercier deux techniciens du laboratoire qui ont plus particulièrement participé aux expérimentations : **Madame Amina Gautier**, pour son aide aux analyses chromatographiques et aux cultures *in vitro*, et **Monsieur Dominique Thierry**, pour sa participation aux travaux à la Bouzule et son aide à la résolution des problèmes techniques. Leur participation m'a été précieuse.

Je remercie **Séverine Piutti**, étudiante en DEA, **Mathilde Sester** et **Aurélie Courtois**, étudiantes en maîtrise, **Agnès**, **Sylvie**, **Antoine**, **Christophe**, **Claude** et **Medhi**, étudiants de troisième année de l'ENSAIA, qui ont participé à certaines expérimentations. Je les remercie de l'intérêt avec lequel ils ont pris part à ces travaux.

J'aimerais remercier les personnes qui ont répondu aux questions que je me suis posées sur les statistiques : **Monsieur Jean-Christophe Hervé**, enseignant-chercheur à l'ENGREF, **Monsieur Sylvain Plantureux**, Professeur à l'ENSAIA et nouveau Directeur du Laboratoire Agronomie et Environnement, **Monsieur Ezékiel Baudoin**,

doctorant au laboratoire, et **Monsieur Sylvain Billiard**, doctorant à l'ISEM.

Les expérimentations sur la parcelle située en Sologne ont été possibles grâce à la collaboration de **Monsieur Lemoine** et **Monsieur Bourdillon**. Je les remercie de leur travail. Je remercie également **Monsieur Guimont**, responsable de la Ferme Expérimentale de l'ENSAIA, d'avoir permis l'implantation d'un essai à la Bouzule.

Monsieur Renato Toffanin, chercheur au Protos Research Institute, et **Monsieur Erminio Murano**, chercheur à POLYtech, m'ont permis de continuer les travaux sur la micro-imagerie RMN. Je les remercie de cette collaboration et leur exprime toute ma sympathie. Je remercie également **Monsieur Jean-Louis Goergen**, chargé de recherche au CNRS, d'avoir permis les essais en bioréacteur.

Ces 3 années de doctorat se sont déroulées au Laboratoire Agronomie et Environnement. Je remercie l'ensemble des membres de ce laboratoire : les **techniciens** et **ingénieurs** pour leur disponibilité et leur gentillesse, ainsi que les **chercheurs** et **enseignants-chercheurs** dont le jugement est indispensable lors des séminaires et des discussions ponctuelles.

Je n'oublierai pas **Bastien**, qui termine lui aussi sa thèse sur ce sujet, **Antoine**, le chasseur de gènes dont la curiosité est débordante, et **Karine**, la petite dernière de l'équipe. Je leur souhaite à tous une bonne continuation.

Je voudrais aussi exprimer toute mon affection à mes 3 "collègues" : **Christine** pour son dévouement aux autres, **Magalie** pour sa spontanéité et son attention, et **Ezékiel** pour son sens de l'humour et sa curiosité culturelle. Je retiendrai d'eux notre amitié et notre solidarité.

Et puis, comme il y a une vie après la thèse, j'aimerais aussi remercier mes amis pour les précieux et joyeux moments que j'ai partagés avec eux et qui font oublier les problèmes de paillasse : salutations à **Mathilde**, ma colloq' préférée, aux **Nains des Forges** et autres satellites de la MJC Desforges (Laura, Nanou, Fabio, François, Fred, Manu, Nono, Vincent, Yoann), aux **sculpteurs en herbe** de la MJC Lillebonne (Béa, Isabelle, Antoine, Philippe ...), à **JP** et **Vérène** (et leur "maison, sucrée maison") et à tous mes **amis des 4 coins du monde**.

Enfin, je veux témoigner tout mon amour à **mes Parents**, à **ma Famille** et à **Sylvain**. Leur présence à mes côtés, leur soutien sans relâche, leur générosité et leur confiance sont les présents les plus précieux que je leur dois. Baisers.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 7

A. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 10

1. LES FUROCOUMARINES : MOLECULES A INTERET PHARMACEUTIQUE 11

1.1. STRUCTURE CHIMIQUE ET BIOSYNTHESE DES FUROCOUMARINES 11
1.1.1. Structure des molécules étudiées 11
1.1.2. Voie de biosynthèse des furocoumarines 11
1.1.3. Contrôle enzymatique de la synthèse des furocoumarines 12

1.2. PROPRIETES REMARQUABLES DES FUROCOUMARINES 13
1.2.1. Historique de la recherche médicale sur les furocoumarines 13
1.2.2. Mode d'action des furocoumarines et effets biologiques 14
1.2.3. La PUVA thérapie 16
1.2.4. Autres applications thérapeutiques possibles des furocoumarines 16
1.2.5. Limites de l'utilisation des furocoumarines : toxicité, effets secon-daires 17

2. LES FUROCOUMARINES DANS LE REGNE VEGETAL 19

2.1. SIGNIFICATION ET ROLE ECOLOGIQUE DES FUROCOUMARINES DANS LE REGNE VEGETAL 19
2.1.1. Rôle des métabolites secondaires chez les végétaux 19
2.1.2. Théories écologiques de défense des plantes 20
2.1.3. Propriétés biologiques spécifiques des furocoumarines 21

2.2. SYNTHESE DES FUROCOUMARINES CHEZ LES PLANTES 22
2.2.1. Niveaux de production 22
2.2.2. Localisation au sein d'une plante 23

2.3. LES RUTACEES : FAMILLE PRODUCTRICE DE FUROCOUMARINES 24
2.3.1. Les Rutacées 24
2.3.2. Fiche botanique de la Rue officinale 24

3. STRATEGIES DE PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES PAR DES TISSUS VEGETAUX 26

3.1. CHOIX DU TISSU PRODUCTEUR 26
3.1.1. Cultures de plantes entières 26
3.1.2. Cultures de tissus 27

3.2. STRATEGIES D'AMELIORATION DE LA PRODUCTION 29
3.2.1. Sélection des plantes ou des souches cultivées 29
3.2.2. Effets de facteurs environnementaux 29
3.2.3. Modification génétique et contrôle enzymatique des voies métaboliques : génie métabolique 32

4. CONCLUSIONS 33

B. MATERIELS, METHODES ET PROTOCOLES 35

1. CULTURES DE PLANTES ENTIERES 36

1.1. OBTENTION DU MATERIEL VEGETAL 36
1.1.1. Collection d'espèces du genre *Ruta* 36
1.1.2. Autre origine des semences de *Ruta graveolens* 37
1.1.3. Conditions de germination et d'obtention de plantules 37

1.2. CONDITIONS DE CULTURE 37
1.2.1. Conditions contrôlées 37
1.2.2. Expérimentations en plein champ 38

1.3. PLANS DES ESSAIS ET PROTOCOLES D'OBTENTION DES PLANTES 38
1.3.1. Essai COLLECTION *Ruta* 38
1.3.2. Essai COLLECTION *Ruta graveolens* 38
1.3.3. Essai AZOTE 39
1.3.4. Essai MULTIFACTORIEL 40

1.4. DISSECTIONS DES PLANTES PRELEVEES AU CHAMP 40

2. CULTURES *IN VITRO* 41

2.1. ETABLISSEMENT DES SUSPENSIONS CELLULAIRES 41

2.2. MILIEU STANDARD DE CULTURE 41

2.3. CROISSANCE 42

2.4. ELICITATION 43
2.4.1. Expérience 1 43
2.4.2. Expérience 2 43
2.4.3. Expérience 3 44

2.5. IMMOBILISATION 45

3. DOSAGE DES FUROCOUMARINES 47

3.1. DESHYDRATATION DU MATERIEL VEGETAL 47

3.2. EXTRACTION DES FUROCOUMARINES 47

3.3. DOSAGE DES FUROCOUMARINES 48

4. TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES 50

4.1. ANALYSE DE LA VARIANCE ET COMPARAISON DE MOYENNES 50

4.2. ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES 50

5. MICROIMAGERIE RMN 51

5.1. PRINCIPES DE LA MICROIMAGERIE RMN 51

5.2. METHODE EXPERIMENTALE DE MICROSCOPIE RMN 51

5.3. APPLICATIONS POSSIBLES DE LA MICROSCOPIE RMN 52

5.4. MATERIEL UTILISE DANS NOTRE RECHERCHE 53

C. RESULTATS ET INTERPRETATIONS 54

1. ETUDE DE LA PRODUCTION DE FUROCOUMARINES CHEZ LA RUE (*RUTA*) 56

1.1. VARIABILITE DE LA PRODUCTION DE FUROCOUMARINES CHEZ LA RUE 56
1.1.1. Variabilité interspécifique de la production de furocoumarines au sein du genre *Ruta* 56
1.1.2. Variabilité intraspécifique de la production de furocoumarines par des écotypes de l'espèce *Ruta graveolens* 58

1.2. PRODUCTION DE FUROCOUMARINES DANS LES ORGANES DE LA PLANTE 59
1.2.1. Production de furocoumarines dans les différents compartiments de la plante 60
1.2.2. Dosage des furocoumarines dans différents organes de la plante 62

1.3. VARIATION DE LA PRODUCTION DE FUROCOUMARINES EN FONCTION DU STADE PHENOLOGIQUE DE LA PLANTE 65

1.4. DISCUSSION, CONCLUSIONS 66

2. ETUDE DE LA PRODUCTION DE FUROCOUMARINES AU CHAMP : EFFETS DE FACTEURS AGRONOMIQUES 69

2.1. VALIDATION DU PLAN D'ESSAI (ESSAI MULTIFACTORIEL) 69

2.2. CHOIX DE LA HAUTEUR DE PRELEVEMENT 70

2.3. CHOIX DE LA DATE DE RECOLTE 71

2.4. EFFET DE COUPES SUR LA REPOUSSE D'UNE PLANTE 72
2.4.1. Effet d'une coupe à 5 cm 72
2.4.2. Effet de l'âge de la plante lors de la première coupe 73
2.4.3. Conclusion 74

2.5. EFFET COMBINE DE 2 FACTEURS (DENSITE ET COUPES REPETEES) SUIVI SUR 3 ANNEES DE CULTURES 74
2.5.1. Variables caractérisant la production à l'échelle de la plante (PMS, teneur, quantité par plante et décomposition de la production) 75
2.5.2. Variables caractérisant la production à l'échelle du peuplement (rendement par hectare et productivité annuelle) 78
2.5.3. Conclusions 80

2.6. EFFET DU FACTEUR FERTILISATION AZOTEE 80

2.7. EFFET DU TERROIR 82

2.8. CONCLUSIONS 83

3. PRODUCTION DE FUROCOUMARINES PAR DES SUSPENSIONS CELLULAIRES DE *RUTA GRAVEOLENS* 86

3.1. CROISSANCE ET PRODUCTION DE METABOLITES PAR DES SUSPENSIONS CELLULAIRES DE *RUTA GRAVEOLENS* 86
3.1.1. Croissance et production de furocoumarines en flacon Erlenmeyer 86
3.1.2. Croissance et production de furocoumarines en bioréacteur 88

3.2. ELICITATION DE CELLULES INDIFFERENCIEES DE *RUTA GRAVEOLENS* 89

3.2.1. Effet de l'élicitation 89
3.2.2. Effet de la quantité et de l'âge du champignon-éliciteur 90
3.2.3. Suivi de la réponse à l'élicitation au cours du temps 91
3.2.4. Effet de la fraction de la culture du champignon sur la production de furocoumarines 91
3.2.5. Effet de la concentration initiale en furocoumarines sur la réponse à l'élicitation 93
3.2.6. Discussion, conclusions 94

3.3. IMMOBILISATION DE CELLULES INDIFFERENCIEES DANS DES BILLES D'ALGINATE 95
3.3.1. Observation des billes en microimagerie RMN : évaluation de l'apport de cette technique 95
3.3.2. Evaluation de l'effet immobilisation 96
3.3.3. Discussion, conclusions 98

3.4. POLYMORPHISME DE SUSPENSIONS CELLULAIRES DE RUES 99

3.5. CONCLUSIONS 100

D. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 102

1. LA PLANTE ENTIERE 103

2. LES CULTURES *IN VITRO* 105

3. COMPARAISON DES 2 MODES DE PRODUCTION : CULTURES AU CHAMP/CULTURES *IN VITRO* 107

4. REFLEXION SUR LA DEMARCHE ENTREPRISE POUR ETUDIER LA PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES PAR DES VEGETAUX 109

CONCLUSION GENERALE 111

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 114

LISTES DES FIGURES, TABLES ET PHOTOGRAPHIES 132

ANNEXES 138

PUBLICATIONS 147

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les ressources végétales sont utilisées par l'Homme, non seulement pour ses besoins alimentaires, mais également dans l'élaboration de médicaments, de parfums, de colorants ou d'insecticides (Verpoorte *et al.*, 1999 ; George *et al.*, 2000).

Dans le domaine pharmaceutique, les végétaux ont une importance considérable comme source de molécules thérapeutiques. En effet, la moitié des principes actifs utilisés dans la fabrication des médicaments[a] a été découverte dans les plantes. Les plantes sources de molécules pharmaceutiques sont en général des plantes médicinales traditionnellement utilisées dans les pharmacopées pour le traitement de maladies et autres affections. Depuis un siècle environ, les chercheurs tentent d'isoler les molécules actives responsables des effets thérapeutiques observés lors de l'utilisation de ces plantes médicinales. Une fois les principes actifs découverts, il s'agit d'obtenir suffisamment de molécules pour répondre à la demande des malades.

Plusieurs voies sont envisageables pour produire en grande quantité ces molécules d'intérêt: la culture à grande échelle de ces plantes médicinales à partir desquelles seront extraits les composés, la synthèse chimique d'analogues de ces molécules, ou bien encore l'hémisynthèse. Dans le cas de l'hémisynthèse, le précurseur de la molécule d'intérêt est synthétisé chimiquement mais la dernière étape conduisant à la molécule est effectuée par des cellules végétales (exemple : biotransformation de la digitoxine en digoxine par des cellules de *Digitalis lanata*, Alfermann *et al.*, 1985).

Le plus souvent, la synthèse chimique s'avère plus rentable que la production par les plantes elles-mêmes : c'est le cas de l'acide salicylique qui entre dans la composition de l'aspirine. Néanmoins, pour certains composés, la synthèse chimique est impossible ou bien très coûteuse.

Ce problème se pose pour la production des **furocoumarines**. La synthèse chimique de ces molécules d'intérêt pharmaceutique reste trop coûteuse en raison des faibles rendements obtenus. Ainsi, la production de ces molécules est assurée par extraction et purification à partir d'huile essentielle de bergamotier (*Citrus bergamia* L., Rutacées). Initialement, le bergamotier est cultivé pour la production d'huile essentielle à destination de l'industrie du parfum ou l'industrie alimentaire. Les furocoumarines ne sont qu'un sous-produit de cette industrie. Les surfaces cultivées en bergamotier sont en diminution constante et la culture de bergamotier pour la seule production de furocoumarines n'est pas financièrement envisageable. Ainsi, de nouvelles sources naturelles de furocoumarines doivent donc être étudiées. Les plantes du genre *Ruta* produisent naturellement ces composés et seraient une alternative intéressante à la culture du bergamotier.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont deux objectifs : l'étude des potentialités de production en furocoumarines par des plantes entières du genre ***Ruta* cultivées au champ** et l'étude des potentialités de production par des **cultures *in vitro* de *Ruta graveolens*** (suspensions cellulaires).

Dans un premier temps, nous établirons une synthèse bibliographique qui constitue le fondement de notre travail de

[a] *Médicaments délivrés sur ordonnance aux Etats-Unis (Swerdlow, 2000)*

recherche (Chapitre A : synthèse bibliographique, p 10). Ensuite, nous présenterons les expérimentations que nous avons mises en place pour répondre aux objectifs de ce travail (Chapitre B : matériels, méthodes et protocoles, p 35) et les résultats que nous avons obtenus (Chapitre C : résultats et interprétations, p 54) ; nous comparerons nos résultats expérimentaux avec les connaissances déjà décrites dans la littérature scientifique. Enfin, nous verrons dans quelle mesure nous avons pu répondre aux objectifs de l'étude et nous discuterons la démarche que nous avons suivie (Chapitre D : discussion générale et perspectives, p 102).

Figure A-1 : Structure chimique et poids moléculaire du psoralène et de 3 dérivés méthoxylés : le bergaptène, la xanthotoxine, l'isopimpinelline.

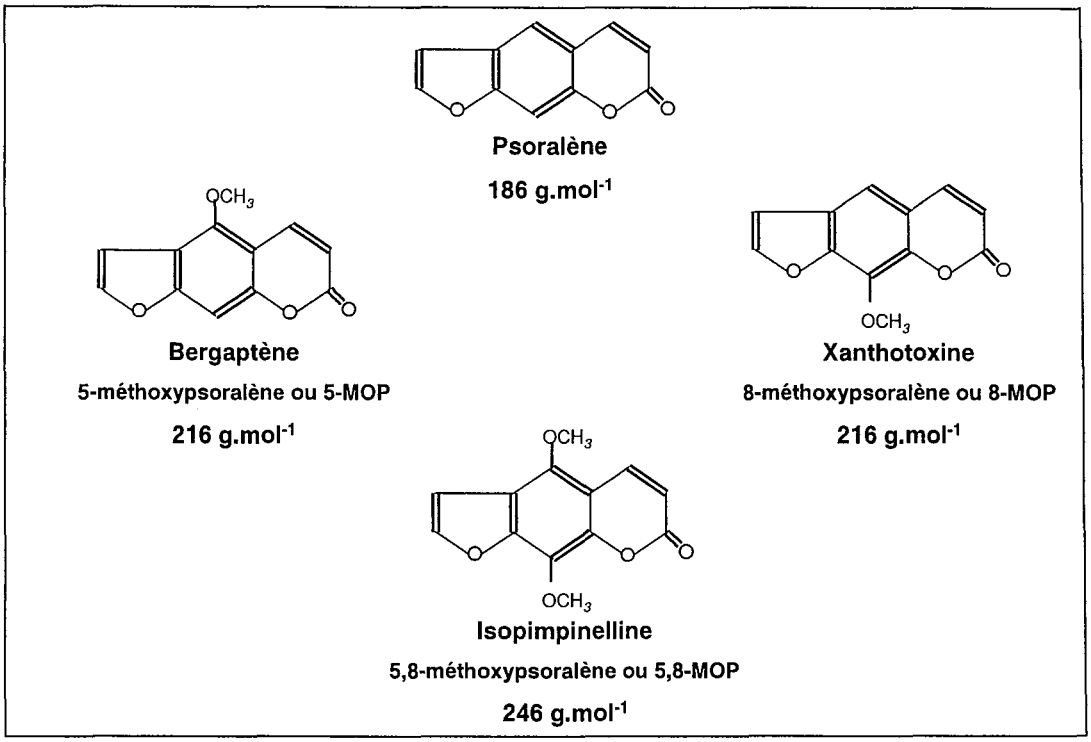
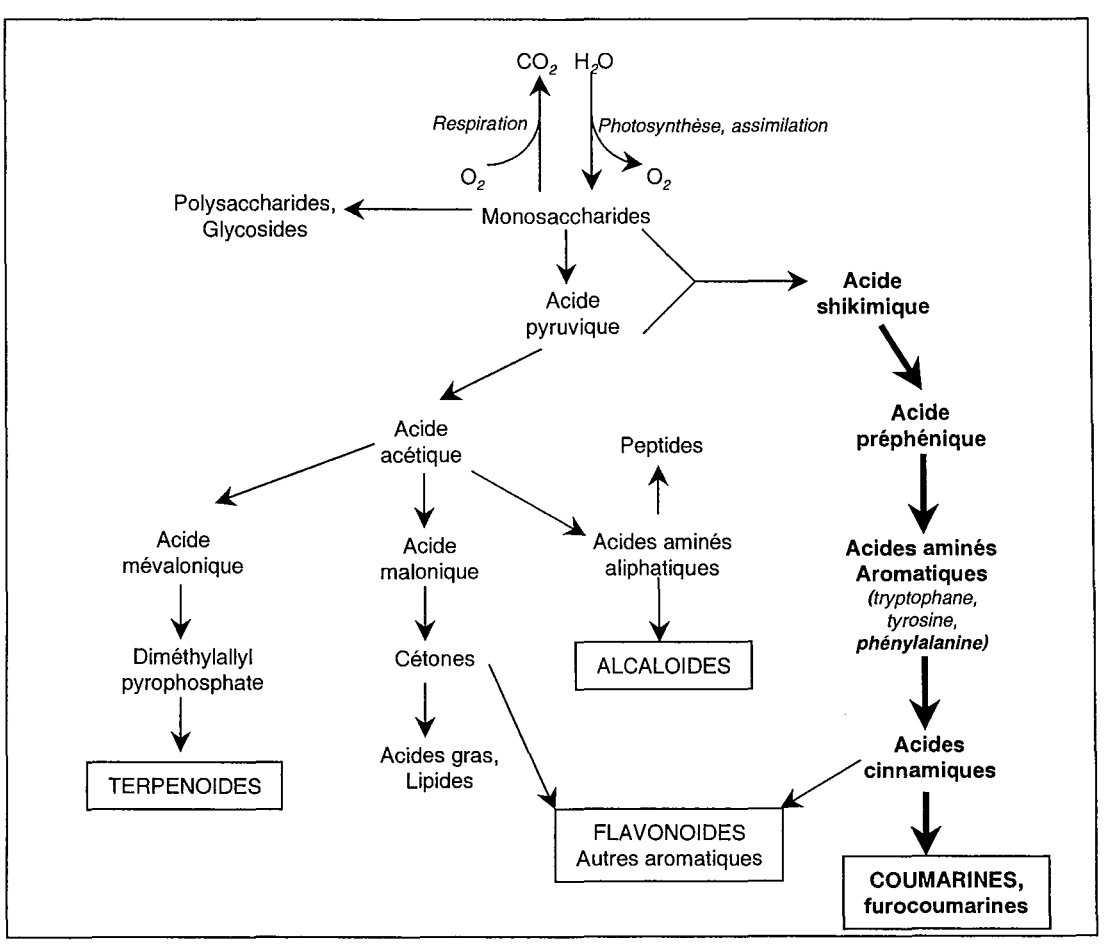


Figure A-2 : Principales voies du métabolisme secondaire chez les végétaux. D'après Torssell, 1997.



A. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce chapitre bibliographique présente différentes connaissances sur la production de métabolites secondaires à partir de végétaux. Dans un premier temps, nous décrirons les molécules que nous avons étudiées : leur structure chimique, les voies de biosynthèse dans les plantes et leurs intérêts pharmaceutiques. Ensuite, nous montrerons quels rôles peuvent avoir les métabolites secondaires, et en particulier les furocoumarines, pour les plantes qui les produisent. Enfin, nous établirons les stratégies possibles pour la production de ces molécules par des plantes.

1. LES FUROCOUMARINES : MOLECULES A INTERET PHARMACEUTIQUE

1.1. STRUCTURE CHIMIQUE ET BIOSYNTHESE DES FUROCOUMARINES

1.1.1. Structure des molécules étudiées

Les furocoumarines, ou encore furanocoumarines, sont des molécules résultant de la condensation d'un cycle furane sur un noyau coumarine (noyau benzo-α-pyrone). Elles peuvent être linéaires (psoralène et dérivés) ou angulaires (angélicine et dérivés).

Les quatre furocoumarines plus particulièrement étudiées dans ce mémoire sont linéaires : le *psoralène*, le *bergaptène* (5-méthoxypsoralène ou 5-MOP), la *xanthotoxine* (8-méthoxypsoralène ou 8-MOP), et l'*isopimpinelline* (5,8-diméthoxypsoralène ou 5,8-MOP) (**Figure A-1**). Le psoralène est la molécule la plus simple. Les 3 autres furocoumarines sont substituées par un ou deux groupements méthoxyl (-OCH_3).

1.1.2. Voie de biosynthèse des furocoumarines

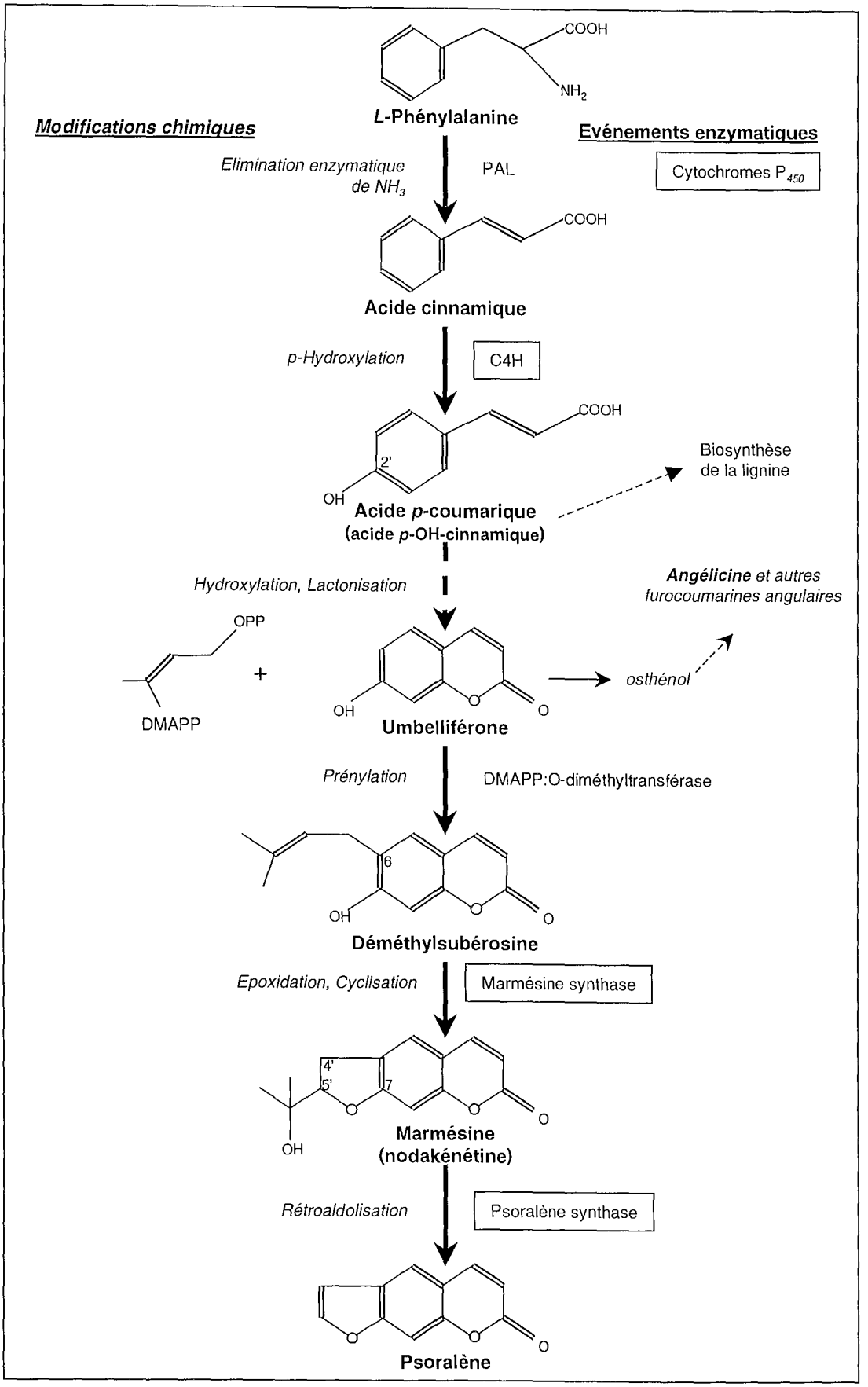
La **Figure A-2** replace les coumarines et les furocoumarines parmi les différentes voies du métabolisme secondaire des végétaux[a]. Les coumarines et furocoumarines dérivent de l'acide shikimique. L'acide shikimique est à l'origine de la formation des acides aminés aromatiques : la tyrosine, le tryptophane et la phénylalanine, (Torssell, 1997).

Comme les autres dérivés de la voie des phénylpropanoïdes, les coumarines sont issues du métabolisme de la phénylalanine (**Figure A-3**). L'entrée dans la voie des furocoumarines se fait par la perte d'une molécule NH_3 de la phénylalanine puis par une hydroxylation conduisant à la formation de l'acide *p*-coumarique (Brown, 1979). Il y a ensuite la formation d'un 2^{ième} cylcle (réaction spontanée, Kindl, 1971) conduisant à l'umbelliférone.

Les furocoumarines sont caractérisées par un 3^{ième} cycle qui se forme grâce à l'incorporation de DMAPP[b] (Murray *et*

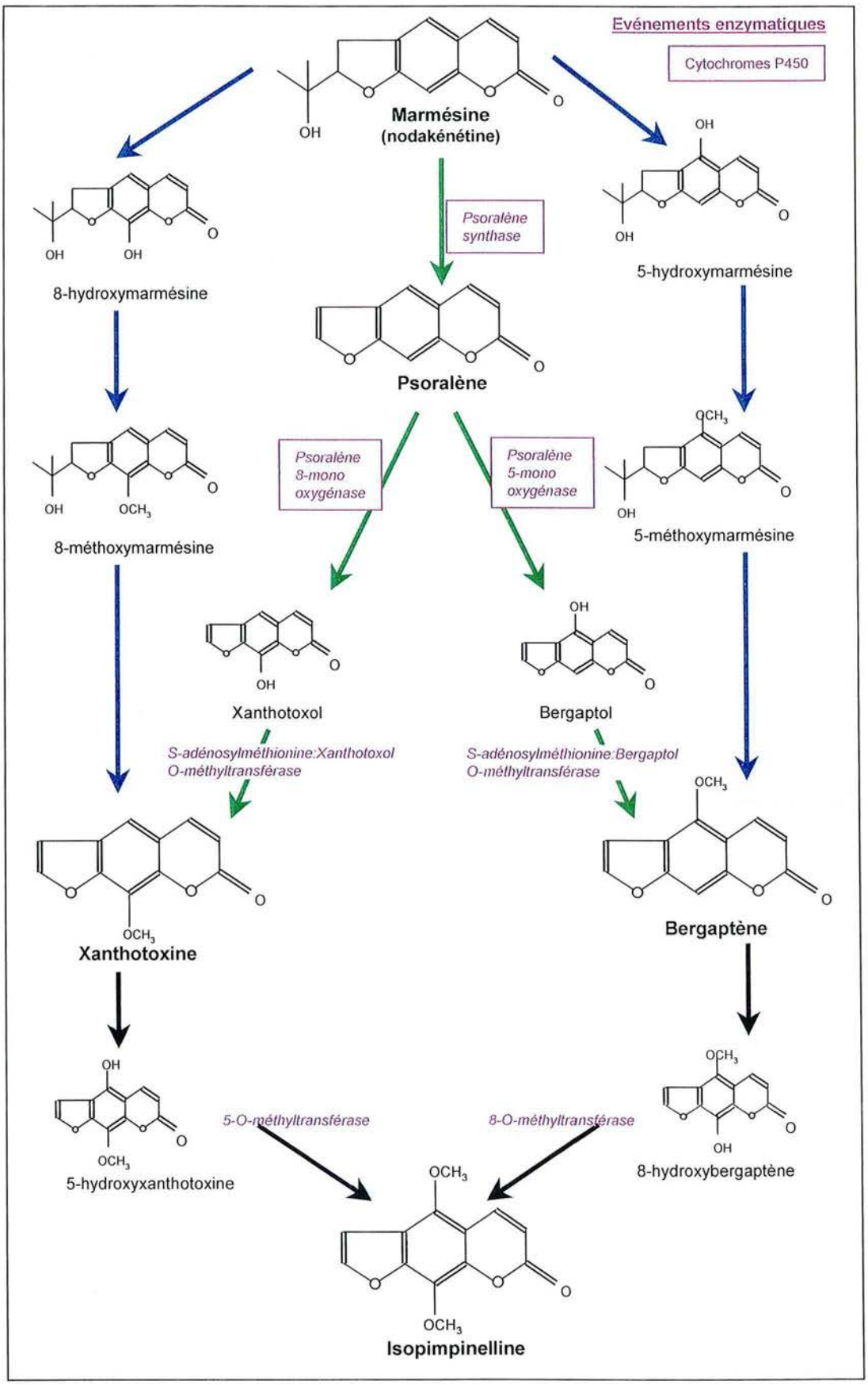
[a] *les métabolites secondaires sont opposés au métabolites primaires que sont les glucides, les acides gras, les acides aminés et les acides nucléiques*
[b] *diméthylallyl diphosphate*

Figure A-3 : Voie de biosynthèse des furocoumarines linéaires, à partir de la L-phénylalanine.
D'après Brown, 1979.



***PAL**= Phénylalanine Ammonia Lyase; **C4H**= Acide–Cinnamique-4-hydroxylase; **DMAPP**= Diméthylallyl diPhosphate; **DMAPP:O- diméthyl-transférase**= Diméthylallyl pyrophosphate: umbelliférone diméthyltransférase*

Figure A-4 : Voies de biosynthèse aboutissant à l'isopimpinelline : hypothèses soutenues par l'équipe de Brown (Brown et al., 1970) **et celles soutenues par l'équipe de Dall'Acqua** (Dall'Acqua,et al., 1972).



al., 1982). L'incorporation de DMAPP en position 6 aboutit à la formation des furocoumarines linéaires telles que le psoralène (Brown et Steck, 1973 ; Dhillon et Brown, 1976). En revanche, son incorporation en position 8 induit la formation des homologues angulaires comme l'angélicine (Brown et Steck, 1973).

Les méthoxylations des furocoumarines linéaires, conduisant à la formation de bergaptène, xanthotoxine et isopimpinelline, interviennent plus tardivement. Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer la formation des furocoumarines linéaires méthoxylées (xanthotoxine, bergaptène et isopimpinelline, **Figure A-4**): une à partir du psoralène et une à partir de la marmésine.

- Brown *et al.* (1970) ont proposé la formation de l'isopimpinelline à partir du **psoralène (Figure A-4, en vert)** (Brown *et al.*, 1970 ; Brown et Sampathkumar, 1977 ; Brown, 1979).

- Dall'Acqua *et al.* (1972) ont proposé la formation de l'isopimpinelline à partir de la **marmésine**, la molécule qui précède le psoralène dans la voie de biosynthèse (**Figure A-4, en bleu**). Ces hypothèses ont été émises d'après des résultats obtenus sur *Ruta graveolens* .

L'équipe de Dall'Acqua n'a pu montré l'incorporation de la 8-hydroxymarmésine dans les furocoumarines méthoxylées chez des espèces telles que *Ammi majus*, *Apium graveolens*, *Petroselium sativum* ou *Angelica archangelica* (Dall'Acqua *et al.*, 1975 ; Innocenti *et al.*, 1978). Ces résultats confirment l'hypothèse de l'équipe de Brown. En revanche, la 5-hydroxymarmésine est convertie en bergaptène chez *Ruta graveolens*, *Ficus carica*, *Ammi majus*, *Apium graveolens* et *Petroselium sativum* (Dall'Acqua *et al.*, 1979 ; Innocenti *et al.*, 1981). Le bergaptène pourrait donc provenir de la marmésine dans ces espèces.
Dans les feuilles d'*Heracleum lanatum* et les cellules de *Ruta graveolens*, on a remarqué que la xanthotoxine est convertie plus efficacement en isopimpinelline que le bergaptène (Brown et Sampathkumar, 1977 ; Murray *et al.*, 1982). L'isopimpinelline pourrait provenir préférentiellement de la xanthotoxine.

Enfin, une troisième voie de formation de l'isopimpinelline est entrevue par l'équipe de Dall'Acqua. En effet, auteurs ont montré que le composé 5,8-dihydroxypsoralène est converti en isopimpinelline de manière plus efficace que la xanthotoxine ou le bergaptène par des racines de *Ruta graveolens* (Innocenti *et al.*, 1983).

Les voies métaboliques conduisant aux molécules qui nous intéressent ne sont donc pas encore parfaitement déterminées. Aucune des voies proposées ne peut être retenue étant donné nos connaissances actuelles, notamment chez *Ruta graveolens*.

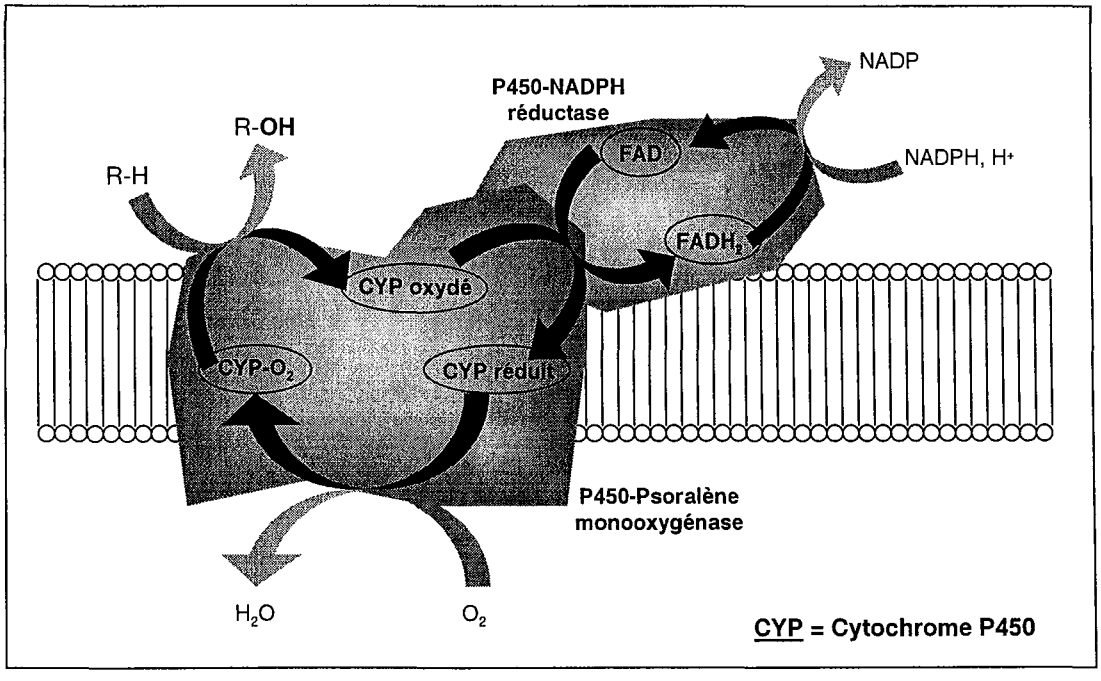
1.1.3. Contrôle enzymatique de la synthèse des furocoumarines

L'entrée dans la voie des furocoumarines est déterminée par l'élimination enzymatique d'une molécule NH_3 de la phénylalanine : cette réaction est catalysée par l'enzyme Phénylalanine Ammonia-Lyase ou PAL (**Figure A-3**). La PAL est par ailleurs une enzyme clef au départ de la voie de biosynthèse de la lignine (Fakuda *et al.*, 1993).

La 2^{ième} enzyme au départ de la voies des furocoumarines est la C4H ou Acide Cinnamique-4-Hydroxylase (**Figure A-3**). Elle catalyse une étape cruciale de la biosynthèse : l'hydroxylation de l'acide cinnamique en acide *p*-coumarique. La C4H a été étudiée chez de nombreuses espèces végétales (Scheel et Sandermann, 1975).

Figure A-5 : Chaîne d'oxydoréduction conduisant à l'hydroxylation du psoralène : intervention d'enzymes cytochrome P450-dépendantes au niveau de la membrane endoplasmique.

D'après Werck-Reichhart et al., 2000.



La C4H est une monooxygénase du type P_{450}. Ces enzymes ont une fonction oxydase qui utilise des NADPH ou NADH pour cliver les molécules d'oxygène. Ceci conduit à la production d'une molécule organique greffée d'un nouveau groupement (-OH en général) et à la formation d'une molécule d'eau (**Figure A-5**) (Schuler, 1996 ; Werck-Reichhart *et al.*, 2000).

Ces enzymes ont deux fonctions dans le règne végétal : elles catalysent les voies de biosynthèse et les voies de détoxification.

• Les monooxygénases de type P_{450} jouent un rôle très important dans des voies conduisant à la **biosynthèse** de constituants cellulaires (synthèse de la lignine), de pigments (flavonoïdes), de protecteurs d'ultraviolets (coumarines, furocoumarines, flavonoïdes) ou des composés de défense des plantes encore appelés phytoalexines (isoflavonoïdes, coumarines, furocoumarines) (Schuler, 1996). Les composés cités font partie de la famille des phénylpropanoïdes.

• Les monooxygénases de type P_{450} ont aussi un rôle de **détoxification** : elles métabolisent les composés xénobiotiques (herbicides) en composés non toxiques. Elles peuvent aussi activer des molécules, non toxiques au départ, en produits toxiques (Schuler, 1996).

Dans la voie de biosynthèse des furocoumarines, plusieurs enzymes sont des monooxygénases de type P_{450} (**Figure A-3** et **Figure A-4**, enzymes encadrées). Nous avons décrit la C4H. Deux autres enzymes situées avant le psoralène sont des monooxygénases de type P_{450}: la marmésine-synthase (Hamerski et Matern, 1988a) et la psoralène-synthase (Wendorff et Matern, 1986). D'autres monooxygénases de type P_{450} interviennent ensuite entre le psoralène et les furocoumarines méthoxylées. L'hydroxylation du psoralène en xanthotoxol ou en bergaptol (**Figure A-4**) fait aussi intervenir 2 monooxygénases : la psoralène-8-monooxygénase et la psoralène-8-monooxygénase (Hamerski et Matern, 1988a).

Les enzymes de type P_{450}-monooxygénases sont très présentes dans le règne végétal et en particulier dans la voie qui nous intéresse plus particulièrement, celle conduisant aux furocoumarines linéaires.

1.2. PROPRIETES REMARQUABLES DES FUROCOUMARINES

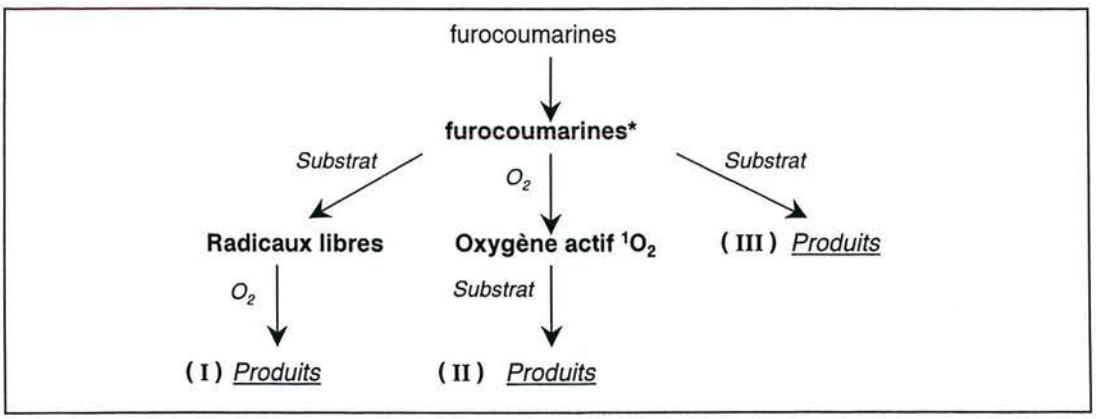
Les furocoumarines sont principalement utilisées en dermatologies. Après avoir présenté l'historique de la recherche sur ces molécules, nous exposerons les modes d'actions des furocoumarines et les effets biologiques qui en découlent, ainsi que leurs applications thérapeutiques.

1.2.1. Historique de la recherche médicale sur les furocoumarines

a. Connaissance ethnobotanique des plantes à furocoumarines

Dans un livre sacré indien, daté du XV^{ième} siècle avant JC, il est décrit l'usage de certaines plantes dans le traitement du vitiligo, maladie caractérisée par la dépigmentation par zones de la peau (Fitzpatrick et Pathak, 1959). Ces plantes étaient connues sous le nom de "Vasuchika" et seraient une forme ancestrale de *Psoralea corylifolia*. Par ailleurs, les Egyptiens avaient remarqué qu'*Ammi majus*, une mauvaise herbe qui pousse sur les berges du Nil, était dotée de propriétés médicinales déclenchées par la lumière : les personnes qui ingéraient cette herbe devenaient

Figure A-6 : Mécanismes impliqués dans les photoréactions des furocoumarines avec des substrats : voies toxiques et anoxiques. D'après Dall'Acqua et Martelli, 1991.



très sensibles aux coups de soleil. *Ammi majus* fut aussi utilisée pour traiter le vitiligo (Fitzpatrick et Pathak, 1959). Il a été démontré depuis que les molécules responsables des effets d'*Ammi majus* et de *Psoralea corylifolia* sont des furocoumarines (Kuske, 1938).

b. Historique de la photochimiothérapie

L'histoire moderne des psoralènes est le prolongement de leur utilisation thérapeutique depuis 5000 ans. Les premiers chercheurs en photobiologie furent El Mofty, Fitzpatrick et Lerner dans les années 1950-1960. Durant cette période, les recherches ont porté sur la chimie des psoralènes : extraction, identification de leur structure, synthèse. Durant la même période, des études démontrent que la xanthotoxine (8-MOP), sous l'action des rayons solaires, est responsable d'une repigmentation de la peau (El Mofty,1947 ; Lerner *et al.*,1953 ; Bickers, 1987). La xanthotoxine purifiée est alors utilisée par voie orale et par application topique pour le traitement du vitiligo (Pathak, 1961 ; Bickers, 1987).

Dans les années 1970, on découvre que les furocoumarines s'intercalent dans l'ADN par formation de liaisons covalentes avec les bases pyrimidiques, après irradiation par des UV (Musajo *et al.*, 1967 ; Dall'Acqua *et al.*, 1970). La conséquence de ces liaisons croisées entre les furocoumarines et l'ADN est une inhibition de la réplication de ce dernier. L'effet inhibiteur du psoralène et des UVA sur la synthèse d'ADN est appliqué pour le traitement de maladies comme le psoriasis, certaines mycoses, et plus de 16 maladies de peau. Le traitement couplant l'usage des furocoumarines et des rayons UVA est appelé PUVA thérapie (Psoralen-UVA).

Depuis la fin des années 1980, les furocoumarines sont utilisées contre les cancers de la peau et les désordres cutanés dus aux lymphocytes T (Pathak et Fitzpatrick, 1992).

1.2.2. Mode d'action des furocoumarines et effets biologiques

a. Interactions entre les furocoumarines et les constituants cellulaires

La structure aromatique des furocoumarines est responsable de leur capacité à absorber les longueurs d'onde UVA (320-400 nm), (Malane et Gasparro, 1991). Les furocoumarines excitées ont des effets photosensibilisants et photothérapeutiques essentiels où plusieurs mécanismes sont impliqués : photoaddition avec l'ADN, les protéines et les lipides ; formation d'oxygène actif ($^1O_2$ ou $HO_2^{\bullet}$) ; formation d'intermédiaires réactifs (radicaux libres, des péroxydes ou des époxydes) (Dall'Acqua et Martelli, 1991). Selon les mécanismes engagés, les furocoumarines interagissent à divers niveaux sur les constituants cellulaires :

- interactions à la lumière ou à l'obscurité avec les **récepteurs membranaires** (**Figure A-6**, mécanisme I),
- péroxydation des lipides et formations de liaisons croisées avec les protéines des **membranes** (**Figure A-6**, mécanismes I et II),
- photoréaction avec les protéines, inactivation d'enzymes, inactivation de ribosomes dans le **cytoplasme** (**Figure A-6**, mécanismes I et II),
- photoréaction avec l'ADN et la chromatine du **noyau** (**Figure A-6**, mécanisme III).

Les réactions de type III sont principalement les cycloadditions C_4 des furocoumarines photoexcitées sur les bases pyrimidiques de l'ADN ou les acides gras insaturés. L'interaction la plus étudiée fut d'abord celle des furocoumarines

Figure A-7 : Représentation schématique de la photocycloaddition d'une furocoumarine linéaire avec des bases pyrimidiques de l'ADN.

La photocycloaddition crée soit des monoliaisons 4',5' (A), soit des monoliaisons 3,4 (B). Les structures résultant des liaisons 4',5' forment des liaisons croisées interpénétrantes (C) avec une exposition supplémentaire aux UVA. D'après Scott et al., 1976. Conséquences des liaisons croisées de la furocoumarines au sein de la double hélice d'ADN (D). D'après Edelson, 1988).

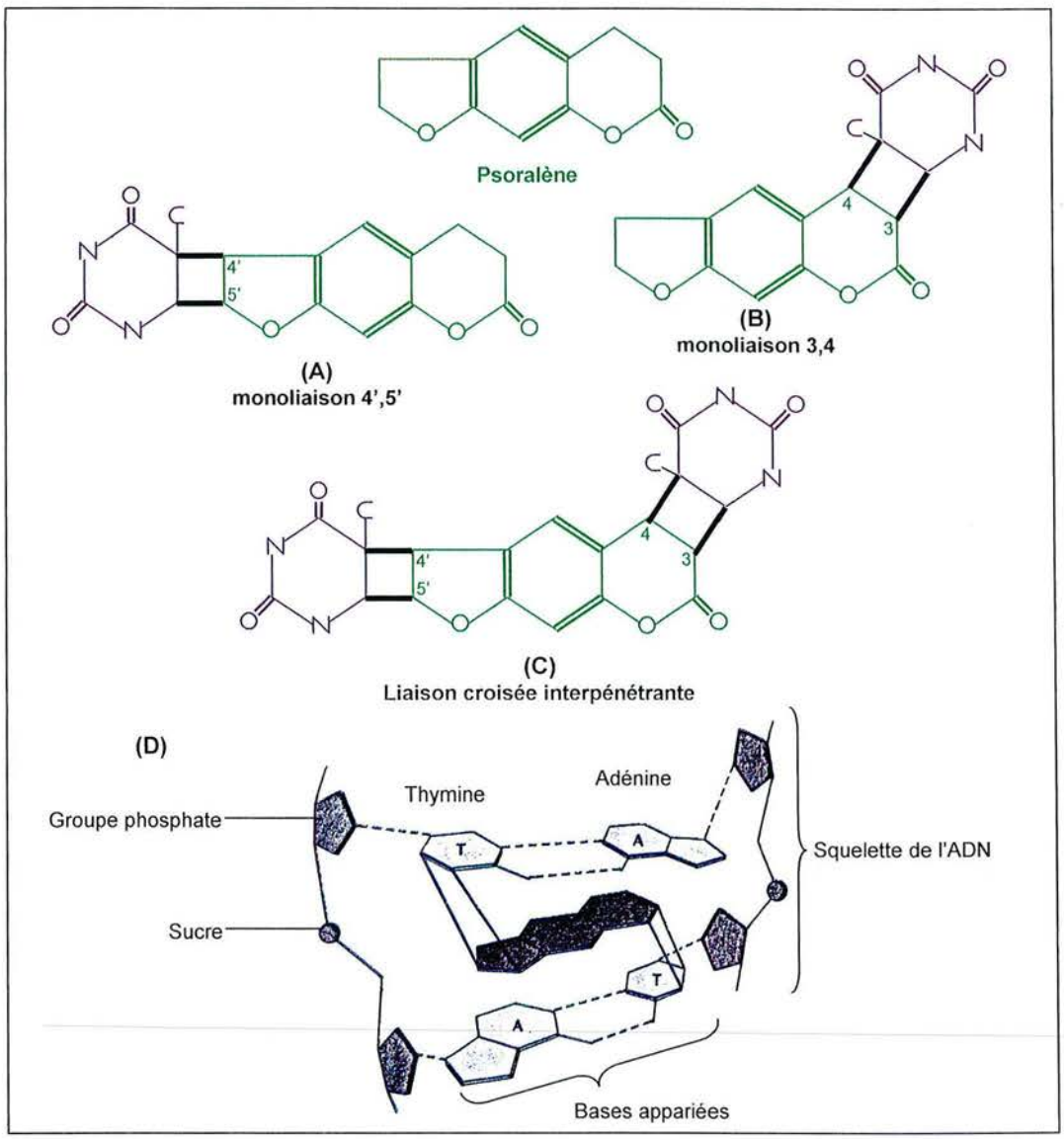
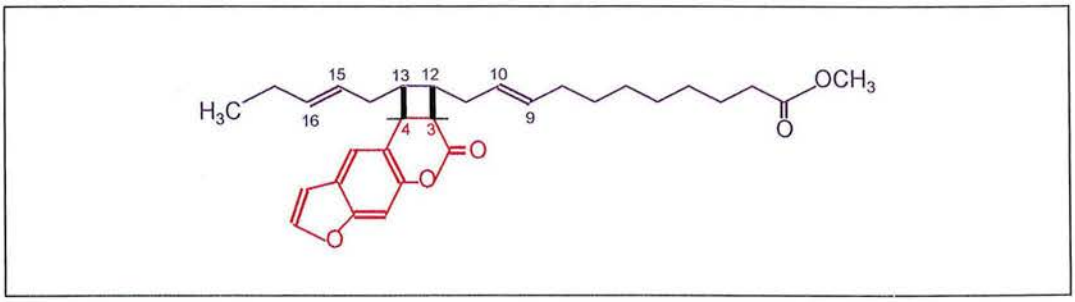


Figure A-8 : Structure moléculaire d'une cycloaddition C_4 entre le psoralène et le méthylester d'acide linolénique.

L'acide gras insaturé possède plusieurs double-liaisons, mais la photoaddition se produit principalement au niveau de la double liaison centrale 12,13.

D'après Dall'Acqua et Martelli, 1991.



avec l'ADN, en particulier grâce aux travaux de l'équipe de Musajo.

Interactions moléculaires ADN-furocoumarines

Musajo *et al.* (1965) ont montré la photo-cycloaddition du psoralène aux bases pyrimidiques (**Figure A-7**). La structure plane des furocoumarines permet une **intercalation** parfaite dans la double chaîne d'ADN, étape au cours de laquelle il y a formation d'un complexe à faibles forces moléculaires entre la furocoumarine et l'ADN (Song et Tapley, 1979). Ensuite, les furocoumarines se **lient** par le cycle furane aux bases de l'ADN (**Figure A-7A**) puis, la présence d'UVA permet la deuxième liaison sur le cycle pyrane (**Figure A-7B et C**) : les furocoumarines forment alors un pont moléculaire à fortes liaisons entre les 2 brins d'ADN et inhibent la réplication de l'ADN (Bordin *et al.*, 1975 ; Song et Tapley, 1979).

Les furocoumarines n'interagissent pas seulement avec l'ADN nucléaire. En effet, il existe de l'ADN à la surface des cellules et en particulier à la surface des leucocytes humains. Cet ADN membranaire peut être aussi interagir avec les furocoumarines (Malane et Gasparro, 1991). Les furocoumarines peuvent aussi s'additionner à l'ARN. Cependant, la photoliaison à l'ARN est apparemment moins efficace que celle avec l'ADN (Song et Tapley, 1979).

Interactions moléculaires protéines-furocoumarines

Les effets biologiques induits par les furocoumarines ne sont pas seulement dus aux modifications de la double hélice d'ADN. Les furocoumarines agissent aussi au niveau des protéines et des lipides. Il peut se produire des photoadditions entre les furocoumarines et les protéines, mais aucune étude n'a mis en évidence de liaison covalente entre furocoumarines et acides aminés. Il n'est donc pas possible de dire si les modalités de la liaison furocoumarine-protéine sont les mêmes que celles de la liaison furocoumarine-ADN (Cadet *et al.*, 1990).

Les furocoumarines peuvent ainsi inactiver des enzymes en présence de lumière UVA et d'oxygène. Les essais ont porté sur une large gamme d'enzymes[a] (Veronese *et al.*, 1982).

Interactions moléculaires lipides-furocoumarines

Les effets des furocoumarines sur les lipides ont été étudiés plus récemment (Dall'Acqua et Martelli, 1991). Les furocoumarines oxydent les **acides gras insaturés** selon un mécanisme à deux étapes : une furocoumarine activée par exposition aux UV constitue le premier intermédiaire. La furocoumarine activée réagit ensuite avec le lipide insaturé : il y a formation de liaisons covalentes par **cycloaddition C_4** (**Figure A-8**). Ces photoadditions et ces oxydations des lipides inhiberaient la prolifération cellulaire et altérerait la régulation du métabolisme (Dall'Acqua et Martelli, 1991).

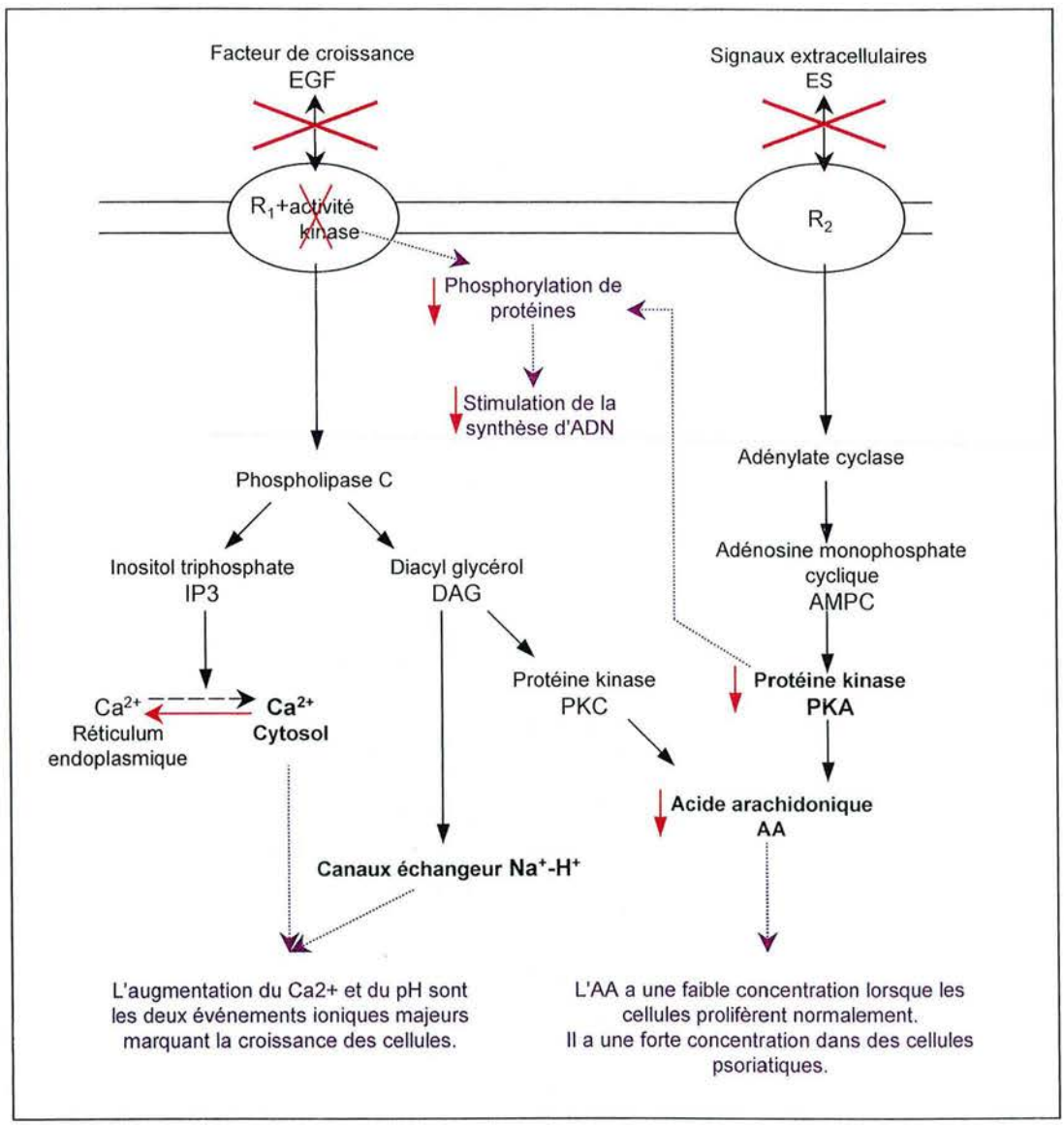
b. Action antiproliférative des furocoumarines

L'action antiproliférative des furocoumarines est due à plusieurs facteurs (Dall'Acqua et Martelli, 1991), dont le principal est la formation de liaisons monovalentes ou bivalentes entre l'ADN et les furocoumarines. Nous avons aussi vu que les furocoumarines se lient de façon covalente avec les lipides, qui peuvent jouer un rôle dans la

[a] *lysozyme, glutamate déshydrogénase, 6-phosphogluconate déshydrogénase, énolase, ribonucléase, thermolysine*

Figure A-9 : **Mécanisme de transduction de messages extracellulaires au travers de la membrane et réponses intracellulaires en cascade : conséquences sur la prolifération cellulaire et niveaux d'action des furocoumarines.**

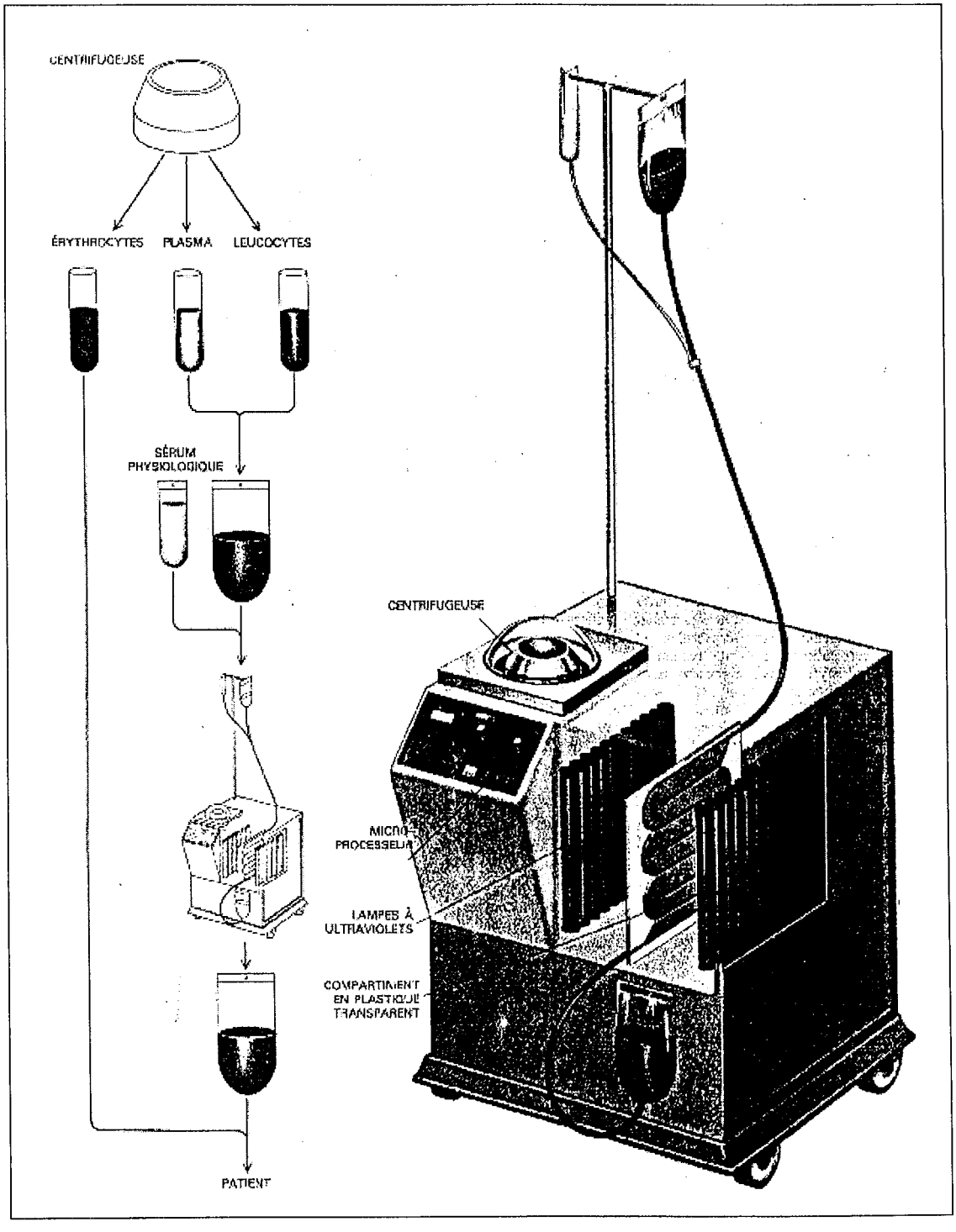
D'après Dall'Acqua et Martelli, 1991.



<u>Figure A-10</u> : Photophérèse.

500 ml de sang sont centrifugés pour séparer ses différents composants. Le plasma et les leucocytes sont mélangés à un sérum physiologique contenant des furocoumarines. Dans la machine à photophérèse, la suspensions de globules blancs passe sous la forme d'un film mince (1 mm) entre 2 lampes à UV A de forte intensité. Après irradiation, on recombine les érythrocytes avec les autres éléments du sang et on réinjecte l'ensemble au patient.

D'après Edelson, 1988.



modulation des signaux hormonaux ou dans la régulation cellulaire. Enfin, il semble que les furocoumarines activées inhibent certains récepteurs membranaires clefs de réactions intracellulaires en cascade (**Figure A-9**). Les furocoumarines, par ce biais, ont un rôle sur l'activité de kinases et d'enzymes de régulation ou sur l'ouverture de canaux ioniques. Ces événements participent aussi à la régulation de la prolifération cellulaire.

c. Stimulation de la mélanogénèse

Les furocoumarines activées par un rayonnement UV induisent l'augmentation des pigments de mélanine de la peau. Notamment, sur la peau de malades atteints de vitiligo, une recoloration des zones dépigmentées est observée après la prise de furocoumarines et l'exposition aux UV. La stimulation de la pigmentation (mélanine) par les furocoumarines est, semble-t-il, le résultat d'une prolifération des mélanocytes folliculaires (Scott *et al.*, 1976).

1.2.3. La PUVA thérapie

a. Photothérapie des maladies de peau

Les propriétés des furocoumarines irradiées aux UV sont exploitées pour le traitement de maladies de peau, et principalement contre le vitiligo et le psoriasis.

Le psoriasis est une maladie non cancéreuse pour laquelle les cellules de l'épiderme se divisent rapidement, conduisant à un épaississement et à une desquamation de la peau. Les furocoumarines permettent de traiter les symptômes disgracieux de la maladie. Elles altèrent la croissance et la différenciation des cellules épidermiques par liaisons covalentes avec l'ADN et par l'inhibition de la liaison entre le facteur de croissance EGF (Epidermal Growth Factor) et les récepteurs de ce facteur sur la surface des cellules de l'épiderme (**Figure A-9**).

b. Photophérèse

La PUVA thérapie est aussi utilisée pour le traitement des affections de lymphomes cutanés. Il s'agit d'un cancer des globules blancs (lymphocytes) se localisant d'abord dans la peau et dont l'issue est souvent fatale. Dans ce cas, une forme extracorporelle de cette thérapie a été mise au point : la photophérèse (Edelson, 1988). Dans cette méthode, le patient reçoit oralement de la xanthotoxine. Les globules blancs sont prélevés puis exposés aux UVA et ensuite réinjectés dans le sang (**Figure A-10**).

Dans le cas de ce traitement, la PUVA thérapie semble engendrer un mécanisme immunologique puisque les lymphocytes T anormaux deviennent des cibles pour le système immunitaire. Les furocoumarines ont des effets directs sur les cellules T malignes, via des interactions avec leur ADN nucléaire et membranaire, avec les protéines et avec les lipides (Malane et Gasparro, 1991). Les lymphocytes T endommagés par le traitement furocoumarines-UVA sont réinjectés chez le patient (Edelson, 1988).

1.2.4. Autres applications thérapeutiques possibles des furocoumarines

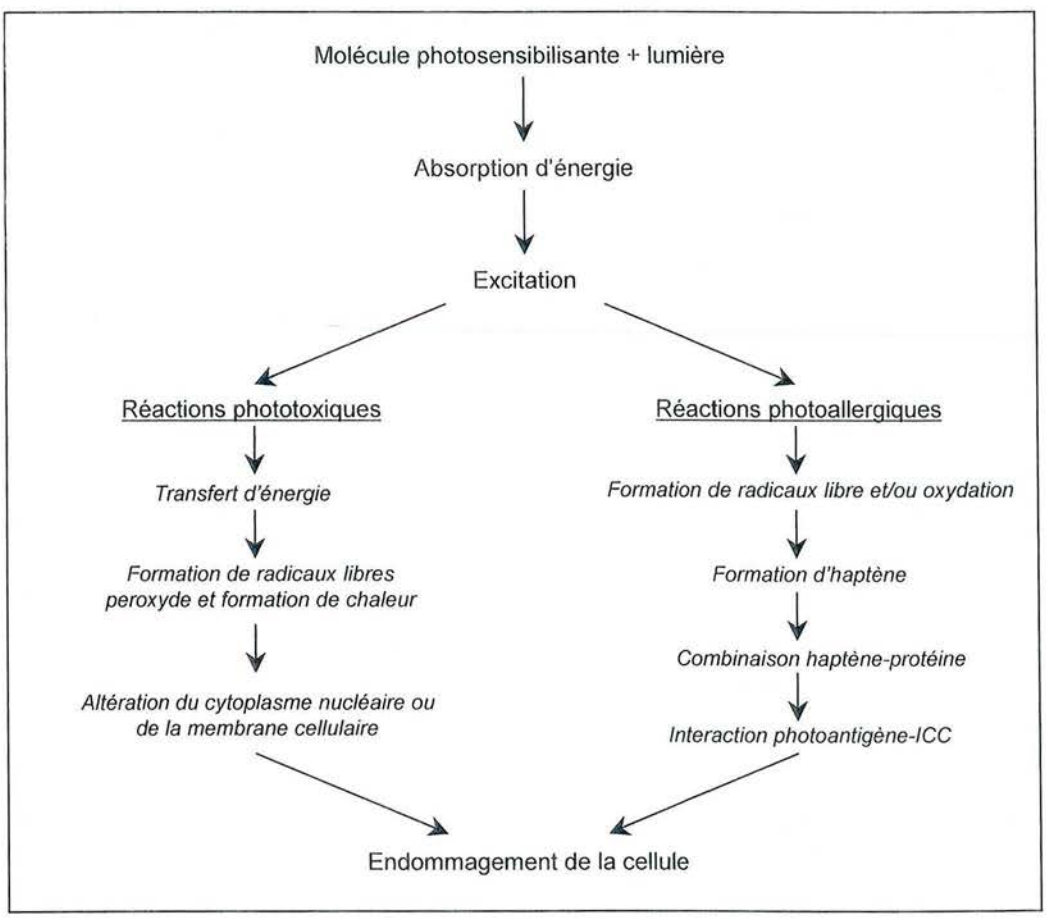
a. Sécrétion de mélatonine

Le bergaptène (5-MOP) stimule la sécrétion de mélatonine chez des sujets humains (Souetre *et al.*, 1990). La mélatonine interagit avec la régulation du système circadien humain qui module les fonctions physiologiques du

Planche 1 : **Effet photosensibilisant des furocoumarines.**

Figure A-11 : **Hypothèses des mécanismes de réactions phototoxiques et photoallergiques dans les dermites de contact.**

Proposées par Harber et Baer, 1972 .



corps et le comportement de l'être, notamment sous l'action des successions jour/nuit. Cette stimulation spécifique, par le bergaptène, peut être d'un grand intérêt dans le traitement des désordres liés à des anomalies du rythme circadien, en particulier lors de décalages horaires (Souetre *et al.*, 1990).

b. Sclérose en plaques

La qualité de vie des patients atteints de sclérose en plaques dépend de la réponse aux traitements par des interférons (Bétaféron® et Avonex®): ils permettent un ralentissement de la maladie dans le cas de formes rémittentes de sclérose en plaques, mais pas dans le cas de formes chroniques de la maladie (comm. pers. Wermersch).

Les furocoumarines sous la forme de PUVA thérapie font partie des molécules qui pourraient être prometteuses pour le traitement symptomatique de la sclérose en plaques. Elles semblent agir sur les canaux ioniques des neurones. En effet, les lésions principales de la sclérose en plaques proviennent d'une démyélinisation des neurones (Waxman, 1987). Les zones myélinisées servent à isoler la membrane plasmique pour le passage des ions. Au niveau des nœuds de Ranvier, la myéline s'interrompt. Cette interruption régulière de la gaine de myéline conduit à un parcours saltatoire de l'influx nerveux, beaucoup plus rapide qu'un influx continu. La démyélinisation explique les troubles de conduction de l'influx nerveux et la fuite d'ions potassiques au travers de la membrane du neurone, dont les conséquences sont fatales pour le malade. Les furocoumarines semblent avoir un effet bloquant sur les canaux potassiques, ce qui permettrait de restaurer une conduction correcte de l'influx nerveux (Bohuslavizki *et al.*, 1994).

1.2.5. Limites de l'utilisation des furocoumarines : toxicité, effets secon-daires

a. Principaux effets toxiques des furocoumarines

La phototoxicité des furocoumarines se traduit par des lésions érythémato-bulleuses sur la peau, c'est-à-dire par l'apparition de rougeurs, de boursouflures, de brûlures ou de taches (**Planche 1**). Harber et Baer ont proposé des mécanismes expliquant les **réactions phototoxiques et photoallergiques** des furocoumarines (**Figure A-11 ;** Harber et Baer, 1972 ; Bickers, 1987). Elles interagissent avec les constituants cellulaires. Les conséquences de ces réactions sont la modification des érythrocytes par liaison covalente des furocoumarines aux protéines ainsi que la dégradation de la membrane des cellules par la péroxydation des lipides. Les produits de la péroxydation des lipides sont liés à la **réponse inflammatoire** (érythèmes, rougeurs, oedèmes de la peau).

Les furocoumarines photoactivées créant des liaisons mono ou bivalentes avec l'ADN peuvent avoir des **effets mutagènes** et causer divers **dommages chromosomiques** (Rodighiero et Dall'Acqua, 1976 ; Dall'Acqua et Martelli, 1991). Les effets létaux et mutagéniques des furocoumarines ont uniquement été montrés sur des micro-organismes et sur des cultures de tissus *in vitro* (Fowlks *et al*, 1958 ; Song et Tapley, 1979). Les UV nécessaires à l'excitation des furocoumarines augmentent aussi les risques mutagènes et carcinogènes. Cependant, il semble que le risque à court terme de développer un cancer de la peau est faible en PUVA thérapie (Roelandts, 1984).

b. Solutions pour diminuer la toxicité des furocoumarines

D'une part, la PUVA thérapie montre de nombreux effets secondaires : érythèmes, nausées, maux de tête. D'autre

part, les furocoumarines sont considérées comme photomutagènes et photocarcinogènes chez l'animal, même si aucune étude à long terme n'a pu le montrer clairement (McNeely et Goa, 1998). Une première solution serait de développer des furocoumarines synthétiques plus actives et moins toxiques (Edelson, 1988). L'autre solution est d'administrer des compléments (rétinoïdes, β-carotène) qui augmentent l'efficacité des furocoumarines utilisées et/ou d'en réduire les effets secondaires (Fritsch *et al.*, 1978 ; Giles *et al.*, 1985).

Enfin, la xanthotoxine a longtemps été utilisée en PUVA thérapie. Des études ont montré que le bergaptène présente moins d'effets secondaires, même s'il semble moins efficace que la xanthotoxine (**Tableau A-1**) (McNeely et Goa, 1998 ; Berg et Ros, 1993).

	Intercalation à l'ADN base = xantho	**Liaisons croisées à l'ADN base = xantho**	**Dose pour induire une réponse érythémale**	**Dose pour induire une photoréaction**
Psoralène	1,2	2,0	5	
Xanthotoxine	1	1	15	10
Bergaptène	0,6	0,5-0,9	50	33
Isopimpinelline	-	-	2000	100
référence	*Grossweiner, 1984*	*Grossweiner, 1984*	*Pathak et Fitzpatrick, 1959*	*Ivie, 1978*

Tableau A- 1 : Photoactivité des quatre furocoumarines

Les furocoumarines sont efficaces pour le traitement de nombreuses maladies de peau. Elles paraissent intéressantes pour d'autres maladies (ex : sclérose en plaques). Cependant, les études n'ont pas forcément conduit à une mise sur le marché du fait des effets secondaires et des effets toxiques reconnus des furocoumarines (Dall'Acqua et Martelli, 1991).

2. LES FUROCOUMARINES DANS LE REGNE VEGETAL

2.1. SIGNIFICATION ET ROLE ECOLOGIQUE DES FUROCOUMARINES DANS LE REGNE VEGETAL

2.1.1. Rôle des métabolites secondaires chez les végétaux

Les métabolites secondaires ont été définis, il y a près de 200 ans, comme des molécules non essentielles à la vie de la plante. Cependant, ils contribuent à l'aptitude de survie de l'individu : en d'autres mots, l'absence de métabolites secondaires n'est pas nécessairement critique pour la survie, mais leur présence est un avantage démontré. Comparés aux métabolites primaires, les métabolites secondaires sont souvent caractéristiques d'une famille ou d'un genre : la machinerie biosynthétique engagée dans la formation des métabolites secondaires reflète le mécanisme d'évolution de l'espèce (Torssell, 1997).

Les interactions génotype-milieu sont le moteur de l'évolution de l'espèce, notamment l'évolution biochimique. Le milieu dans lequel se développe l'espèce ou la plante se caractérise non seulement par les conditions environnementales (climat, sol) mais aussi par les êtres vivants qui cohabitent avec la plante (Rhodes, 1994). Une plante a des relations avec plusieurs acteurs vivants du milieu : relations plante-animaux, plante-plante, plante-microorganismes.

a. Relations plante-animaux : parfums, pigments, appétants, répulsifs

Les plantes synthétisent des molécules qui attirent les insectes et les vertébrés, ou au contraire, les repoussent.

Les parfums (composés volatils de faible poids moléculaire) et les couleurs attirent les insectes, augmentant ainsi les chances de pollinisation. Les parfums sont en général des molécules aromatiques dérivées du métabolisme de l'acide shikimique ou des terpènes. Les pigments des fleurs sont des composés phénoliques (flavonoïdes, quinones) ou encore des terpènes (carotènes).

Les plantes synthétisent également des molécules qui interfèrent avec l'alimentation des insectes et des vertébrés : se sont soit des appétants, soit des répulsifs qui donnent un goût désagréable, ou bien sont tout simplement toxiques lorsque l'animal ingère le végétal en question (Wink, 1988). Les arbres eux synthétisent en grande quantité des tannins, des polyphénols ou des résines d'origine terpénoïque, qui sont des inhibiteurs de la croissance des phytophages. Les plantes de taille plus réduite produisent de petites quantités de toxines qui interfèrent avec le métabolisme des herbivores : alcaloïdes, glycosides cyanogéniques, glycosinolates, composés phénoliques (Torssell, 1997).

b. Relations plante-plante : notion de molécules allélopathiques

En plus des compétitions pour l'espace, la lumière, l'eau ou les nutriments du sol, il existe aussi des interactions allélopathiques entre les plantes. Ce sont des interactions chimiques entre individus ou populations d'espèces différentes, mettant en jeu des molécules dites allélopathiques. Celles-ci sont des composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les acides cinnamiques ou les coumarines. Elles sont souvent toxiques contre les plantes, comme

inhibiteur de germination, mais aussi contre les microorganismes. Ces molécules, sous forme glycosylée dans les tissus végétaux, sont activées par des enzymes lors de l'attaque des tissus par des microorganismes et deviennent alors toxiques (Torssell, 1997).

c. Relations plante-microorganismes : les phytoalexines

Il est considéré que l'attaque des cultures par les microorganismes pathogènes constitue une énorme perte économique. Pour s'introduire dans la plante, les microorganismes doivent passer une première barrière en surface, pouvant être couverte de répulsifs, avant d'entrer dans le tissu, où l'intrus rencontre des composés inhibant sa croissance. Si le pathogène réussit à s'installer et à produire ses effets toxiques, la plante peut encore réagir en détoxifiant les toxines fongiques ou bactériennes (oxydation ou glycosylation).

Les défenses chimiques des plantes peuvent être constitutives, c'est-à-dire présentes avant l'attaque du pathogène, ou bien inductibles, c'est-à-dire que les molécules de défense sont synthétisées en réponse à l'attaque du pathogène. Dans ce dernier cas, les molécules sont appelées phytoalexines. Ce terme a été introduit en 1940 par Müller et Börger. Müller l'a défini en 1956 comme des substances antibiotiques, résultat de l'interaction de 2 systèmes métaboliques, celui de l'hôte et celui du parasite, qui inhibent la croissance des micro-organismes pathogènes pour les végétaux. Cette définition s'est élargie car les phytoalexines peuvent être élicitées par de nombreux agents, biotiques ou abiotiques : virus, polypeptides, polysaccharides, métaux lourds, cuivre, UV, froid... (Torssell, 1997)

2.1.2. Théories écologiques de défense des plantes

Toute défense pour la plante entraîne un coût. La plante doit en effet mobiliser des ressources qu'elle ne pourra pas investir pour sa croissance et sa reproduction. Le coût des défenses chimiques peut être dû à la fabrication, au transport, au stockage ou au fonctionnement de l'organisme. La production de défenses chimiques se justifiera pour un individu si le coût est inférieur aux pertes de production imputables aux prédateurs (herbivores, pathogènes).

Les plantes fabriquent des produits toxiques pour les animaux et les pathogènes. Par mutation ou recombinaison, les animaux et pathogènes arrivent à leur tour à contourner ces défenses chimiques, plus ou moins bien. C'est une coévolution permanente entre les espèces en interaction.

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer l'allocation des ressources à la défense :

• **Hypothèse de l'apparence ou "optimal defense theory"** (McKey, 1974 ; Feeny, 1976 ; Rhoades, 1979) : 1) toute défense chimique est coûteuse ; 2) la perte d'une partie d'un tissu de la plante a un impact sur la valeur reproductive (fitness) de l'individu et cet impact dépend du type de tissu ; 3) certaines parties de la plante sont plus souvent attaquées. Ainsi, cette théorie prédit que les plantes vont défendre plus fortement les tissus dont la perte induira un grand coût, de façon à conserver une bonne valeur reproductive de l'individu. L'investissement en défenses sera aussi le reflet des attaques subies par la plante de la part des herbivores et pathogènes.

• **Hypothèse de la qualité du milieu ou "growth rate hypothesis"** (Coley *et al.*, 1985) : la défense des plantes varie en fonction du taux de croissance. Dans des habitats riches en ressources comme la forêt tropicale, la compétition est forte pour l'espace, et les attaques des herbivores ont peu d'impact puisque les plantes ont une croissance rapide. L'allocation des ressources à la défense sera fonction de la disponibilité des réserves. En

revanche dans les habitats où les nutriments sont restreints, la croissance est limitée, et la perte d'une partie de la biomasse ne peut facilement être compensée : ces plantes renouvellent peu leur biomasse et la défendent donc plus.

• **Hypothèse de l'équilibre entre carbone et autres nutriments ou "carbon/nutrient balance theory"** (Bryant *et al.*, 1983) : cette théorie tente de prédire si la plante se défend plus avec des composés carbonés (phénols, terpènes) ou des composés azotés (alcaloïdes, composés cyanogéniques). La croissance des plantes est souvent plus limitée par l'absorption des nutriments et de l'eau que par la photosynthèse. Dans ce cas, les carbohydrates ont tendance à s'accumuler (augmentation du rapport C/N) et des défenses telles que les composés phénoliques ou les terpènes vont s'accumuler.

Beaucoup d'études d'interactions insectes-plantes confirment les deux premières théories.

2.1.3. Propriétés biologiques spécifiques des furocoumarines

a. Molécules protectrices contre les pathogènes et les herbivores

Les furocoumarines sont des agents protecteurs contre les herbivores et pathogènes (Berenbaum et Zangerl, 1986). De nombreuses études *in vitro* ont confirmé la nocivité des furocoumarines pour les pathogènes et micro-organismes. Par exemple, des furocoumarines contenues dans les graines d'*Heracleum laciniatum* inhibent la croissance *in vitro* du champignon *Cladosporium* (Junttila, 1976). La présence de furocoumarines dans ces graines présente un avantage adaptatif certain face aux micro-organismes qui menacent l'embryon au moment de la germination. Les furocoumarines sont encore retrouvées en plus grande quantité dans les plantes infectées par des micro-organismes ou des virus : c'est le cas, par exemple, lors de l'inoculation de *Glehnia littoralis* par *Pseudomonas cichorii* (Masuda *et al.*, 1998), ou de l'infection du céleri par le virus de la mosaïque du céleri (Lord *et al.*, 1988).

Les furocoumarines sont également efficaces contre les insectes. Cependant, ces derniers ont parfois acquis la capacité à contourner ces défenses. Les larves de *Depressaria pastinaccella*, qui se développent sur le panais (*Pastinaca sativa*), une plante à furocoumarines, ont la capacité de métaboliser la xanthotoxine ou le bergaptène *in vitro* (Zangerl et Berenbaum, 1993). Des monooxygénases de type P450 sont impliquées dans cette détoxification par les insectes (Brattsten, 1992 ; Berenbaum et Zangerl, 1993 ; Zumwalt et Neal, 1993).

La plante a réussi à contourner le système de détoxification enzymatique d'insectes. En effet, les furocoumarines linéaires sont reconnues pour être plus efficaces en mélange (Berenbaum *et al.*, 1991) car il semble que les enzymes de détoxification soient spécifiques d'une furocoumarine. Si une autre furocoumarine se fixe sur cette enzyme, elle bloque irréversiblement la métabolisation de la première (Labbe *et al.*, 1987 ; Tinel *et al.*, 1987 ; Berenbaum et Zangerl, 1993). De plus, le mélange de furocoumarines linéaires et d'une faible part de furocoumarines angulaires est plus efficace contre insectes qui métabolisent les furocoumarines linéaires (Berenbaum et Zangerl, 1993). Les furocoumarines angulaires ne montrent pas de bi-additions avec l'ADN comme les furocoumarines linéaires (Murray *et al.*, 1982). Cependant, elles semblent agir en synergie pour contrer l'adaptation aux furocoumarines linéaires par des insectes spécialisés.

Figure A-12 : Concentrations (% de MS) en furocoumarines linéaires identifiées chez quelques espèces végétales supérieures . (1/2)

P+B+X = somme des teneurs en psoralène, bergaptène et xanthotoxine confondues

APIACEES

Genre	espèces	molécules				Références
		psoralène	bergaptène	xanthotoxine	isopimpinelline	
Heracleum	*H. lanatum*	0	0,08	0,12	*	*Steck, 1970; Pathak et al., 1962; Zobel et Brown, 1990*
	"	0,02	0,25	0,26		*Zobel et Brown, 1991b (fruit)*
	"		P+B+X = 0,50			*Zobel et Brown, 1991b (fruit)*
	H. sphondylium		0,01	0	0	***Ceska et al. 1987***; *Pathak et al., 1962*
	H. giganteum		*			*Pathak et al., 1962*
	H. nepalens		*			*Pathak et al., 1962*
	H. mantegazzianum	0,48	0,22	0,24	0,40	*Pira et al., 1989*
	"	0,11	0,08	0,15	0,14	*Pira et al., 1989 (stem)*
	"	0,33	0,48	0,40	0,38	*Pira et al., 1989 (fruit)*
Ammi	*A. majus*		0,10	0,09	0,08	***Abu-Mustafa et al., 1970; Pathak et al., 1962***
Pasticana	*P. sativa*		*	*	*	*Berenbaum et al., 1984; Pathak et al., 1962*
	"		0,04	0,06	0,02	*Ceska et al., 1987*
	"	0,02	0,32	1,04		*Zobel et Brown, 1991b (fruit)*
	"		P+B+X = 1,28			*Zobel et Brown, 1991b (fruit)*
	"		0,08	0,6		*Zangerl et Berenbaum, 1993;*
	"			0,58		*Zangerl et Rutledge, 1996 (xanth, fruit)*
	P. urens		*	*	*	*Pagani, 1981*
Apium	*A. graveolens*		0	*	0	*Innocenti et al., 1976; Ceska et al., 1987*
	"	0,01	0	0		*Zobel et Brown, 1991b (fruit)*
	"		P+B+X = 0,02			*Zobel et Brown, 1991b (fruit)*
Petroselium	*P. crispum*	0	0	0	*	*Chaudhary et al., 1986; Ceska et al., 1987*
Petroselium	*P. sativum*	0,01	0,015	0,01	0,008	*Innocenti et al., 1976; Pathak et al., 1962; Beier et al, 1994*
Angelica	*A. archangelica*	*	*	*	*	*Steck, 1969; Pathak et al., 1962;*
	"	*	0,35	0,04	0,01	*Ceska et al., 1987*
	"	0,02	0,76	0,30		*Zobel et Brown, 1991a (fruit)*
	"		P+B+X = 1,02			*Zobel et Brown, 1991a (fruit)*
	"	0,01	0,70	0,20		*Zobel et Brown, 1991a (seeds)*
	A. sylvatica			*		*Carbonnier et Molho, 1982*
Glehnia	*G. littoralis*	0,02	0,04	0,03		*Masuda et al., 1998*
Pimpinella	*P. magna*		*			*Floss et Paikert, 1969; Pathak et al., 1962*
	P. saxifraga		*		*	*Pathak et al., 1962*
	P. anisum	*	0	0		*Ceska et al., 1986; Ceska et al., 1987*
	"	0		0		*Zobel et Brown, 1991b (fruit)*
	"		P+B+X = 0			*Zobel et Brown, 1991b (fruit)*
Levisticum	*L. officinale*	0	0	*		*Ceska et al., 1986; Ceska et al., 1987*
Ligusticum	*L. acutifolium*		*			*Pathak et al., 1962*
	L. acutilobum		*			*Pathak et al., 1962*
Foeniculum	*F. vulgare*	0	0	0	0	*Ceska et al., 1986; Ceska et al., 1987*
	"	0		0		*Zobel et Brown, 1991b (fruit)*
	"		P+B+X = 0			*Zobel et Brown, 1991b (fruit)*
	C. libanotis		*	*	*	*Ena et al., 1991*
	A. prostatum	*	*	*		*Diawara et al., 1992*
Coriandrum	*C. sativum*		0	0		***Ceska et al., 1987***
Sesli	*S. indicum*		*		*	*Pathak et al., 1962*
Daucus	*D. carota*	0	0	?		***Ceska et al., 1986***
	"	0	0	0		*Zobel et Brown, 1991b (fruit)*
	"		P+B+X = 0			*Zobel et Brown, 1991b (fruit)*

0 = "concentration < 0,01%"

* = "concentration non déterminée"

résumé dans le Tableau A-2

MORACEES

Genre	espèces	molécules				Références
		psoralène	bergaptène	xanthotoxine	isopimpinelline	
Ficus	*F. carica*	0,40	0,60	*		*Khastagir, 1947; Abu-Mustafa et al., 1964; Swain et Downum, 1991; Pathak et al., 1962*
	F. sycomorus	*	*			*Abu-Mustafa et al., 1964; Swain et Downum, 1991*
	F. salicifolia	*	*			*Abu-Mustafa et al., 1964; Swain et Downum, 1991*
	F. asprima		*			*Swain et Downum, 1991*
	F. palmata		*			*Swain et Downum, 1991*
	F. pumila	*	*			*Swain et Downum, 1991*
	F. religiosa		*			*Swain et Downum, 1991*
Dorstenia	*D. zanzibrica*	0	0			*Swain et Downum, 1991*
	D. foetida	0	0			*Swain et Downum, 1991*
	D. contrajerva	0	0			*Swain et Downum, 1991*
Fatoua	*F. villosa*		0			*Swain et Downum, 1991*

0 = "concentration < 0,01%"

* = "concentration non déterminée"

résumé dans le Tableau A-2

Figure A-12 : Concentrations (% de MS) en furocoumarines linéaires identifiées chez quelques espèces végétales supérieures . (2/2)

P+B+X = somme des teneurs en psoralène, bergaptène et xanthotoxine confondues

FABACEES

Genre	espèces	molécules				Références
		psoralène	bergaptène	xanthotoxine	isopimpinelline	
Psoralea	*P. corylifolia*	0,02				*Innocenti et al., 1977; Pathak et al., 1962; Innocenti et al., 1984*
	"	0,08				*Bourgaud et al., 1994*
	"	0,03-0,50%				*Cappelletti et al., 1984 (fruit)*
	P. glandulosa	0,09				*Innocenti et al., 1991*
	P. onobrychis	0,01				*Innocenti et al., 1991*
	"	0,09				*Bourgaud et al., 1994*
	"	0,015				*Cappelletti et al, 1992 (fruit)*
	P. plumosa	0,02				*Innocenti et al., 1977; Innocenti et al., 1984*
	P. cinerea	0				*Innocenti et al., 1977; Innocenti et al., 1984*
	"	0,03				*Bourgaud et al., 1994 (fruit)*
	"	0,15				*Bourgaud et al., 1994*
	"	0,11				*Bourgaud et al.1992*
	P. machnostachys	0,02				*Innocenti et al., 1977; Innocenti et al., 1991; Innocenti et al., 1984*
	"	0,04				*Bourgaud et al., 1994*
	"	0,03-0,28%				*Cappelletti et al, 1992 (fruit)*
	P. martinii	0				*Innocenti et al., 1977; Innocenti et al., 1984*
	"	0,30				*Bourgaud et al., 1994 (fruit)*
	P. pustulata	0				*Innocenti et al., 1977; Innocenti et al., 1984*
	P. leucantha	0				***Innocenti et al., 1984***
	P. subacaulis	*				*Baskin et al., 1967a*
	P. bituminosa	0,35	0	0,15		*Innocenti et al., 1991; Zobel et al., 1991b (seed)*
	"	0,56				*Zobel et Brown, 1991b (fruit)*
	"	P+B+X = 0,54				*Zobel et Brown, 1991b (fruit)*
	P. obtusifolia	0,30				*Bourgaud et al., 1994*
	P. canescens	0,04				*Bourgaud et al., 1994*
	P. lupinellus	1,30				*Bourgaud et al., 1994*
	P. drupacea	*				*Kartashakina et al., 1966*
	P. plicata	*				*Ahmad et Basha, 1972*
	P. psoralioides	*				*Baskin et al., 1967b*
Coronilla	*C. juncea*	*				*Innocenti et al., 1977*
	C. glauca	*				*Fedorin et al, 1975; Pathak et al., 1962*
	C. scorpioides	*				*Fedorin et al, 1975*

0= "concentration < 0,01%"

* = "concentration non déterminée"

résumé dans le Tableau A-2

RUTACEES

Genre	espèces	molécules				Références
		psoralène	bergaptène	xanthotoxine	isopimpinelline	
Ruta	*R. pinnata*	*	*	*	*	*Reyes et Gonzalez, 1970*
	R. graveolens	0,52	0,22	0,64		*Reinhard et al., 1968; Pathak et al., 1962; Zobel et Brown, 1989*
	"	0	0	0		*Zobel et Brown, 1991b (fruit)*
	"	P+B+X = 0				*Zobel et Brown, 1991b (fruit)*
	R. chalepensis	P+B+X = 0,58				*Pathak et al., 1962;* ***Zobel 1991***
	R. montana			*		*Pathak et al., 1962*
	R. bracteosa			*		*Pathak et al., 1962*
Citrus	*C. bergamia*		*			*Späth, 1937; Pathak et al., 1962*
	C. limonum		*			*Rodighiero et al., 1953; Pathak et al., 1962*
	C. acida		*		*	*Khastagir, 1947; Pathak et al., 1962*
	C. aurantifolia				*	*Pathak et al., 1962*
Thamnosma	*T. montana*		*		*	*Bennet et Bonner, 1953; Pathak et al., 1962*
	F. shinofolia		*		*	*Nakaoki et al., 1953*
Xanthoxylum	*X. americanum*	*	*	*		*Saqib et al., 1990*
	X. flavum	*		*		*Pathak et al., 1962*
Fagara	*F. xantholoides*		*	*		*Pathak et al., 1962*
	F. schinofolia		*			*Pathak et al., 1962*
	F. oilanthoides				*	*Pathak et al., 1962*
	P. goudotianus		*	*		*Macias et al., 1993*
Evodia	*E. danielli*	P+B+X = 0,09				*Zobel et Brown, 1991b (fruit)*
	"	0	0,04	0,05		*Zobel et Brown, 1991b (fruit)*
Skimmia	*S. laureola*		*		*	*Pathak et al., 1962*
Luvanga	*L. scandens*			*	*	*Pathak et al., 1962*
Phellodendron	*P. chinensis*	P+B+X = ?				*Zobel et Brown, 1991b (fruit)*

0 = "concentration < 0,01%"

* = "concentration non déterminée"

résumé dans le Tableau A-2

b. Effets allélopathiques des furocoumarines

Baskin et son équipe ont été les premiers à étudier les effets allélopathiques des furocoumarines, notamment en montrant les propriétés anti-germinatives des furocoumarines situées dans les graines de *Psoralea subacaulis* (Baskin *et al.*, 1967a).

Beaucoup d'études ont été ensuite réalisées pour montrer que les furocoumarines confèrent des propriétés allélopathiques aux plantes qui les produisent. Par exemple, les furocoumarines de la Rue officinale (*Ruta graveolens* L.) retardent la germination de graines de radis et diminuent le taux de germination, surtout en présence de lumière. La xanthotoxine et le bergaptène ont notamment été testés : c'est le bergaptène qui montre le plus fort pourcentage d'inhibition de germination (Aliotta *et al.*, 1994). L'isopimpinelline et le bergaptène de graines d'*Heracleum laciniatum* ont aussi inhibé la germination de graine de laitue (Junttila, 1976). Dans ce cas, l'action synergétique des différentes furocoumarines présentes a été testée, mais aucun effet spécifique n'a été observé.

2.2. SYNTHESE DES FUROCOUMARINES CHEZ LES PLANTES

2.2.1. Niveaux de production

Les furocoumarines se rencontrent principalement dans 4 familles de plantes supérieures : les Apiacées (Ombellifères), les Légumineuses, les Moracées et les Rutacées (voir **Annexe 1**). Les genres contenant le plus communément des furocoumarines sont :

- *Ammi*, *Angelica*, *Apium*, *Heracleum*, *Pastinaca*, *Petroselium* et *Pimpinella* chez les Apiacées ,
- *Coronilla* et *Psoralea* dans la famille des Légumineuses,
- *Ficus* chez les Moracées,
- *Ruta* et *Citrus* pour les Rutacées.

Une large gamme de furocoumarines est détectée dans les différentes espèces représentant les familles des Apiacées et des Rutacées. En revanche, les Moracées ne produisent que deux furocoumarines linéaires : le psoralène et son dérivé méthoxylé, le bergaptène. Dans la famille des Légumineuses, seules les deux furocoumarines simples sont détectées : l'angélicine (angulaire) et le psoralène (linéaire).

La **Figure A-12** est un bilan bibliographique pour les teneurs des 4 furocoumarines linéaires (psoralène, bergaptène, xanthotoxine et isopimpinelline). Ces teneurs sont difficilement comparables puisque les dosages ont été réalisés avec des méthodes analytiques différentes, sur différents organes, et sur du matériel sec ou bien frais. Dans ce dernier cas, les teneurs ont été arbitrairement multipliées par 4 pour obtenir une estimation grossière de la teneur dans la matière sèche.

Les plus fortes concentrations dans les différentes familles sont encadrées dans la **Figure A-12** et récapitulées dans le **Tableau A-2** (page suivante): ces teneurs varient de 0,2% à 1,3% de la matière sèche. Cependant, beaucoup d'espèces n'ont pas été analysées quantitativement.

	Apiacées	*Légumineuses*	*Moracées*	Rutacées
Psoralène	**0,5%** (ref 1) *Heracleum mantegazzanum*	**1,3%** (ref 3) *Psoralea lupinellus*	**0,4%** (ref 4) *Ficus carica*	**0,5%** (ref 5) *Ruta graveolens*
Bergaptène 5-MOP	**0,8%** (ref 2) *Angelica archangelica* (fruit)		**0,6%** (ref 4) *Ficus carica*	**0,2%** (ref 5) *Ruta graveolens*
Xanthotoxine 8-MOP	**1,0%** (ref 2) *Pastinaca sativa* (fruit)			**0,6%** (ref 5) *Ruta graveolens*
Isopimpinelline 5,8-MOP	**0,4%** (ref 1) *Heracleum mantegazzanum*			*

Tableau A- 2 : Concentrations maximales (% de MS) détectées dans les 4 familles productrices de furocoumarines, d'après l'Annexe 2

** = détectée mais non mesurée*

Ref 1 = Pira et al., 1989 ; ref 2 = Zobel et Brown, 1991a ; ref 3 = Bourgaud et al., 1994b ; ref 4 = Abu-Mustafa et al., 1964 ; ref 5 = Zobel et Brown, 1989

2.2.2. Localisation au sein d'une plante

a. Localisation dans les différents organes de la plante

Chez l'espèce *Pastinaca sativa*, les furocoumarines sont localisées en majorité au niveau des organes reproducteurs de la plante (fleurs, fruits, graines), 10 fois plus que dans les feuilles et 100 fois plus que dans les racines (Zangerl et Bazzaz, 1992 ; Zangerl et Rutledge, 1996). Cette localisation est observée chez d'autres espèces et dans d'autres familles de métabolites secondaires telle que la morphine dans *Papaver somniferum*, (Suphla *et al.*, 1998).

Des études de localisation ont montré que chacune des furocoumarines ne se comporte pas de manière identique selon les tissus : le psoralène est plutôt concentré au niveau des graines que dans le péricarpe des fruits chez plusieurs espèces de *Psoralea* (Cappelletti *et al.*, 1984 ; Zobel *et al.*, 1991 ; Cappelletti *et al.*, 1992), alors que la xanthotoxine a une distribution inverse chez les mêmes espèces.

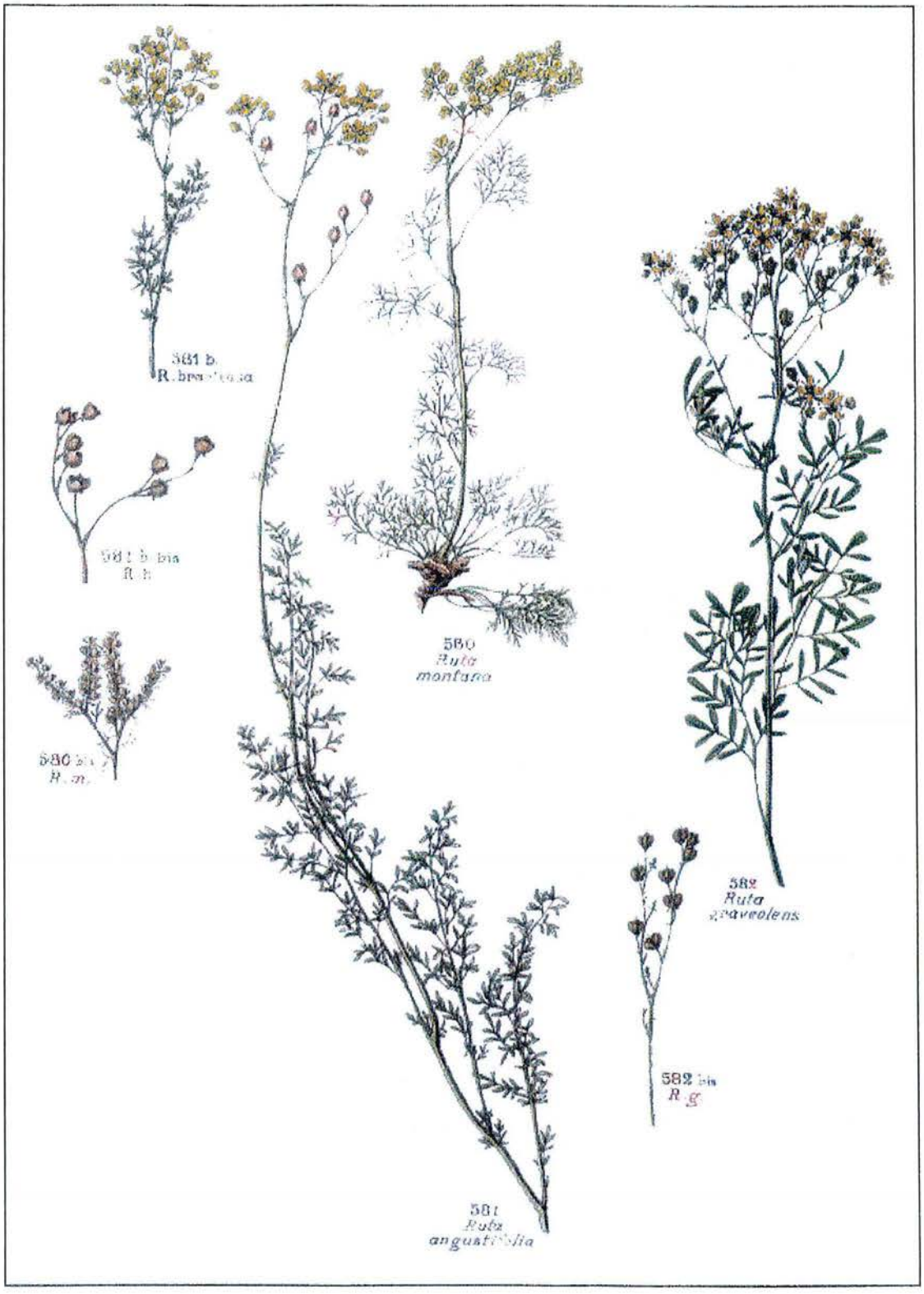
b. Localisation cellulaire dans un tissu

La localisation des furocoumarines et leurs modes de mobilisation doivent être efficaces pour freiner les agressions des pathogènes et prédateurs. Nous savons que les furocoumarines peuvent se fixer à l'ADN et exprimer des propriétés génotoxiques. Cette capacité reste valable pour l'ADN végétal. Ainsi, le stockage des furocoumarines peut poser problème puisque ces molécules présentent un risque de toxicité pour la plante elle-même. Par conséquent, leur mode de stockage doit aussi protéger les propres tissus de la plante vis-à-vis des effets toxiques des furocoumarines. Les furocoumarines peuvent être stockées dans 2 compartiments :

- **La vacuole** : les furocoumarines y seraient présentes sous forme glycosylée. Cette liaison à un glucide inhibe momentanément la capacité des furocoumarines à se lier à l'ADN. Les furocoumarines redeviennent actives par perte de ce groupement glucidique, après action d'une β-glucosidase. Une attaque de prédateurs entraîne une décompartimentation cellulaire des β-glucosidases cytosoliques et des furocoumarines glycosylées de la vacuole. Les furocoumarines sont alors libres et retrouvent immédiatement leur toxicité. Cette localisation permet une réponse rapide à une agression mécanique et empêche la progression du pathogène (Nguyen *et al.*, 1997).

<u>Planche 2</u> : Dessins de quelques espèces du genre *Ruta*.

(Flore Bonnier)



	Apiacées	*Légumineuses*	*Moracées*	Rutacées
Psoralène	**0,5%** (ref 1) *Heracleum mantegazzanum*	**1,3%** (ref 3) *Psoralea lupinellus*	**0,4%** (ref 4) *Ficus carica*	**0,5%** (ref 5) *Ruta graveolens*
Bergaptène 5-MOP	**0,8%** (ref 2) *Angelica archangelica* (fruit)		**0,6%** (ref 4) *Ficus carica*	**0,2%** (ref 5) *Ruta graveolens*
Xanthotoxine 8-MOP	**1,0%** (ref 2) *Pastinaca sativa* (fruit)			**0,6%** (ref 5) *Ruta graveolens*
Isopimpinelline 5,8-MOP	**0,4%** (ref 1) *Heracleum mantegazzanum*			*

Tableau A- 2 : Concentrations maximales (% de MS) détectées dans les 4 familles productrices de furocoumarines, d'après l'Annexe 2

** = détectée mais non mesurée*

Ref 1 = Pira et al., 1989 ; ref 2 = Zobel et Brown, 1991a ; ref 3 = Bourgaud et al., 1994b ; ref 4 = Abu-Mustafa et al., 1964 ; ref 5 = Zobel et Brown, 1989

2.2.2. Localisation au sein d'une plante

a. Localisation dans les différents organes de la plante

Chez l'espèce *Pastinaca sativa*, les furocoumarines sont localisées en majorité au niveau des organes reproducteurs de la plante (fleurs, fruits, graines), 10 fois plus que dans les feuilles et 100 fois plus que dans les racines (Zangerl et Bazzaz, 1992 ; Zangerl et Rutledge, 1996). Cette localisation est observée chez d'autres espèces et dans d'autres familles de métabolites secondaires telle que la morphine dans *Papaver somniferum*, (Suphla *et al.*, 1998).

Des études de localisation ont montré que chacune des furocoumarines ne se comporte pas de manière identique selon les tissus : le psoralène est plutôt concentré au niveau des graines que dans le péricarpe des fruits chez plusieurs espèces de *Psoralea* (Cappelletti *et al.*, 1984 ; Zobel *et al.*, 1991 ; Cappelletti *et al.*, 1992), alors que la xanthotoxine a une distribution inverse chez les mêmes espèces.

b. Localisation cellulaire dans un tissu

La localisation des furocoumarines et leurs modes de mobilisation doivent être efficaces pour freiner les agressions des pathogènes et prédateurs. Nous savons que les furocoumarines peuvent se fixer à l'ADN et exprimer des propriétés génotoxiques. Cette capacité reste valable pour l'ADN végétal. Ainsi, le stockage des furocoumarines peut poser problème puisque ces molécules présentent un risque de toxicité pour la plante elle-même. Par conséquent, leur mode de stockage doit aussi protéger les propres tissus de la plante vis-à-vis des effets toxiques des furocoumarines. Les furocoumarines peuvent être stockées dans 2 compartiments :

- **La vacuole** : les furocoumarines y seraient présentes sous forme glycosylée. Cette liaison à un glucide inhibe momentanément la capacité des furocoumarines à se lier à l'ADN. Les furocoumarines redeviennent actives par perte de ce groupement glucidique, après action d'une β-glucosidase. Une attaque de prédateurs entraîne une décompartimentation cellulaire des β-glucosidases cytosoliques et des furocoumarines glycosylées de la vacuole. Les furocoumarines sont alors libres et retrouvent immédiatement leur toxicité. Cette localisation permet une réponse rapide à une agression mécanique et empêche la progression du pathogène (Nguyen *et al.*, 1997).

• **Le compartiment extracellulaire** : dans ce cas, des furocoumarines libres sont excrétées à l'extérieur de la cellule c'est-à-dire dans les méats du parenchyme, à la surface de la cuticule foliaire ou au niveau de glandes ou canaux sécréteurs, sous forme libre et donc toxique. Cette localisation permet une réponse systémique (dans les vaisseaux conducteurs de la plante) à plus long terme.

La localisation des furocoumarines a été vérifiée à ces deux niveaux. D'une part, grâce à l'application d'eau bouillante sur la cuticule des feuilles, il a été montré que les furocoumarines des feuilles sont situées à 60% sur la surface chez *Ruta graveolens*, (Brown et Zobel, 1990). D'autre part, la fluorescence naturelle de ces molécules a permis de les localiser sur des coupes histologiques de feuilles de différentes espèces : elles se situent dans les lacunes du parenchyme, les glandes sécrétrices et les canaux sécréteurs des nervures principales (Brown et Zobel, 1990; Poli *et al.*, 1995 ; Zangerl et Berenbaum, 1987). Dans les fruits, des travaux sur les Apiacées ont montré par fluorescence que la quasi totalité des furocoumarines est localisée dans les téguments du fruit, plus précisément dans des canaux sécréteurs (Carbonnier-Jarreau *et al.*, 1978). En revanche, d'autres travaux chez les Psoralées ont montré que les furocoumarines sont localisées à la surface de l'embryon (Zobel *et al.*, 1990). Cependant la localisation par fluorescence manque cruellement de spécificité, puisque de nombreux autres composés végétaux fluorescent dans la même gamme de longueurs d'onde.

2.3. LES RUTACEES : FAMILLE PRODUCTRICE DE FUROCOUMARINES

2.3.1. Les Rutacées

Deux principaux genres (*Citrus* et *Ruta*) représentent cette famille, parmi d'autres moins connus (comme *Fagara*, *Thamnosma* ou *Evodia*, **Annexe 1**). Les citronniers, orangers et autres agrumes représentent le genre *Citrus* dans l'alimentation humaine. Le bergamotier (*Citrus bergamia*) est exploité en Calabre et Côte d'Ivoire pour l'extraction d'huile essentielle, utilisée comme arôme par l'industrie alimentaire et comme parfum par l'industrie cosmétique.

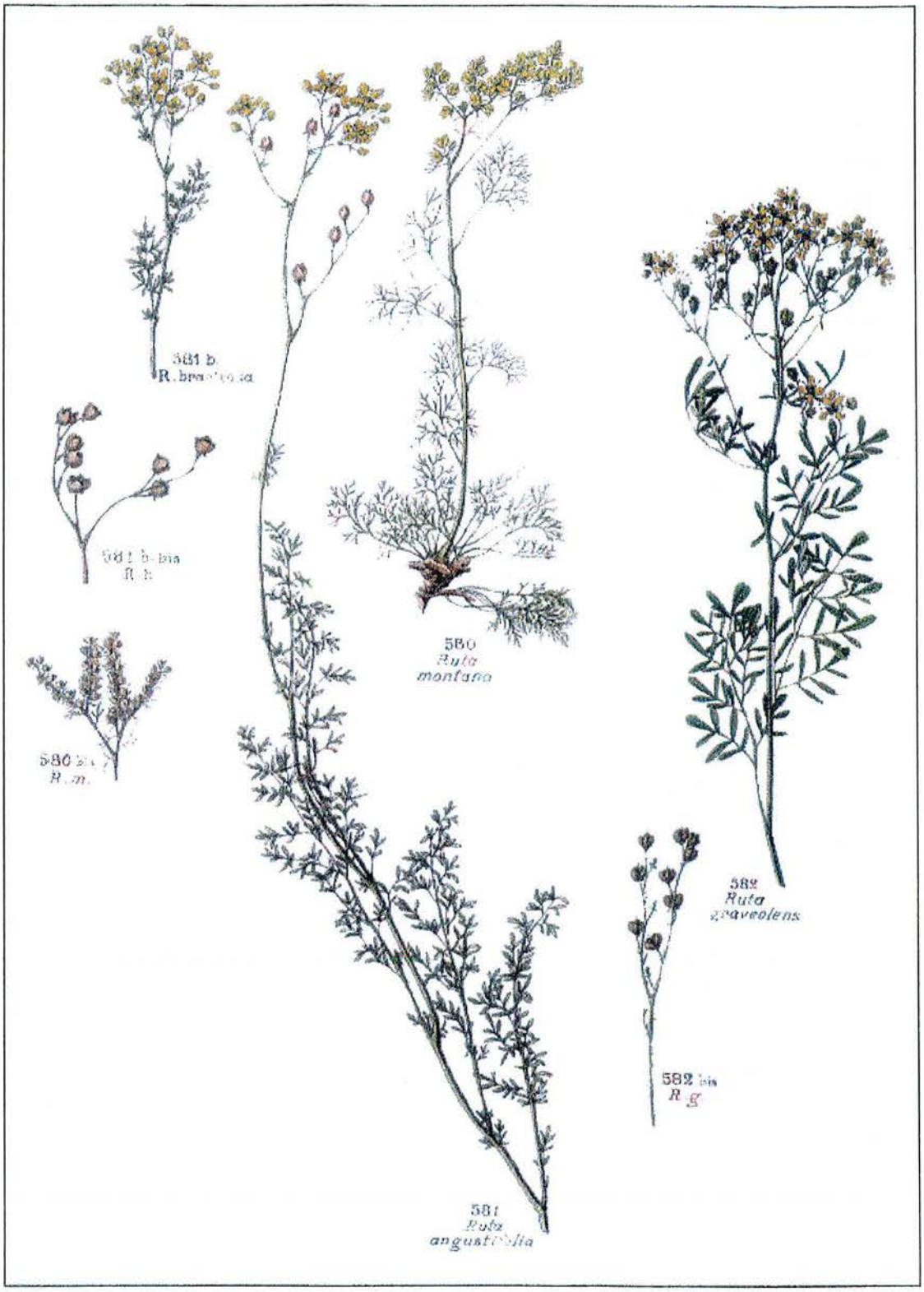
L'extraction de bergaptène à partir de l'huile de bergamotier est un sous-produit de l'industrie des parfums. Cependant, les surfaces cultivées de bergamotier régressent. Par conséquent, les quantités de bergaptène produites sont en diminution. Ainsi, il serait souhaitable de trouver de nouvelles sources végétales afin de fournir l'industrie en bergaptène. Notre laboratoire s'est donc intéressé au genre *Ruta*. En effet, les plantes du genre *Ruta* contiennent du bergaptène et les 3 autres furocoumarines linéaires qui lui sont proches, le psoralène, la xanthotoxine et l'isopimpinelline. L'étude du genre *Ruta* est apparue intéressante puisque les plantes ont un port herbacé et pérenne, ce qui constitue un avantage en terme de croissance vis-à-vis d'un arbre comme le bergamotier.

2.3.2. Fiche botanique de la Rue officinale

Selon la Flore Européenne, plusieurs espèces sont assignées au genre *Ruta* parmi lesquelles figurent *Ruta graveolens* L., *R. chalepensis* L., *R. chalepensis* sous-espèce *angustifolia*, *R. montana* L. ou *Ruta corsica* (**Planche 2**). Cependant, les espèces du genre *Ruta* ne sont pas toujours définies de manière uniforme et les limites entre les espèces sont donc floues. Dans certains cas par exemple, *Ruta angustifolia* est considérée comme une espèce à part entière et non une sous-espèce de *Ruta chalepensis*.

Planche 2 : Dessins de quelques espèces du genre *Ruta*.

(Flore Bonnier)



Rue officinale (ou encore Rue des jardins, Rue fétide, Herbe-de-Grâce) : *Ruta graveolens* L.

La Rue officinale est une plante à feuilles persistantes, semi-arbustive de 0,5 à 1 m de haut, dont les feuilles sont découpées. Ses fleurs sont petites, jaunes, distribuées en cymes avec la fleur terminale pentamère et les autres fleurs tétramères. Les fruits sont des follicules à graines noires. La plante a une odeur très forte et un goût âcre et amer, dus à son huile volatile.

La Rue officinale est originaire de l'Europe méridionale. Elle pousse dans la Péninsule des Balkans, la Crimée et les régions méditerranéennes. Elle fait partie des plantes médicinales utilisées traditionnellement sur la côte Amalfitaine en Italie (De Feo et Senatore, 1993). Des usages traditionnels populaires sont répertoriés dans le **Tableau A-3**.

Partie utilisée de la plante	**Formulation**	**Usage interne ou externe**	***Utilisation populaire***
Fruits	Jus	Externe	*Hémostatique, anti-infectieux oculaire*
Parties aériennes	Infusion	Interne	*Appétant, tonique, laxatif modéré ; contre les rhumatismes et les maux de tête accompagnés de vertiges*
Parties aériennes	Décoction	Interne	*Vermifuge, abortif, vasorégulateur périphérique, antidote pour poison*
Parties aériennes	Décoction	Externe	*« halt subcutaneous bleeding », décongestionnant de la peau, contre les rhumatismes*
Feuilles séchées	Poudre	Externe	*Antiparasitique*

Tableau A- 3 : Usages médicaux de *Ruta graveolens* L. sur la côte amalfitaine (Province de Salerne, Italie)

D'après De Feo et Senatore, 1993

3. STRATEGIES DE PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES PAR DES TISSUS VEGETAUX

Dans cette partie, nous proposons un aperçu des différentes stratégies de production de métabolites secondaires par des tissus végétaux. La démarche est la suivante : plusieurs types de tissus peuvent être cultivés (cultures *in vitro*, plantes entières) ; le choix du type de tissus se fera en fonction de la faisabilité de sa mise en culture, de sa capacité à produire le métabolite désiré et du rendement en molécule. Divers traitements et conditions de culture peuvent être testés sur le tissu végétal choisi dans le but produire un maximum de molécules d'intérêt.

3.1. CHOIX DU TISSU PRODUCTEUR

Deux méthodes de culture sont possibles. Soit la plante est cultivée dans son intégrité, ce sont les **cultures de plantes entières** ; soit des parties de la plante sont cultivées, en conditions aseptisées, ce sont les **cultures *in vitro***.

3.1.1. Cultures de plantes entières

a. Cultures au champ, en serre ou en aéroponie

La culture de plantes entières peut être réalisée au champ, en serre (sur terre, substrats minéraux ou synthétiques, tels que laine de roche, sable, perlite, vermiculite, avec circulation de solution nutritive), ou en aéroponie (projection de la solution nutritive). La culture au champ des plantes reste la plus rentable (Drapeau *et al.*, 1987 ; Payne *et al.*, 1991) même si elles sont soumises de manière importante aux aléas climatiques et aux attaques parasitaires. Les cultures en serre et en aéroponie permettent de contrôler les conditions de culture, voire de pouvoir cultiver des plantes dans des régions climatiques complètement différentes de sa région d'origine (Morard, 1995).

b. Exemples de cultures de plantes entières pour la production de métabolites secondaires

Le pavot (*Papaver somniferum*), la digitale (*Digitalis lanata*) ou la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) sont des espèces cultivées au champ pour la production de molécules d'intérêt pharmaceutique : la codéine et la morphine sont deux alcaloïdes analgésiques synthétisés par *Papaver somniferum* (Facchini *et al.*, 1997 ; Singh *et al.*, 1999); la digoxine est un cardiotonique synthétisé par *Digitalis lanata* (Brugidou et Jacques, 1990); la vincristine et la vinblastine sont deux alcaloïdes antileucémiques synthétisés par *Catharanthus roseus* (Bajaj, 1998).

D'autres espèces sont cultivées pour la production de métabolites secondaires à usage non pharmaceutique : c'est le cas de la vanille (*Vanilla planifolia*) exploitée pour extraire la vanilline utilisée dans l'industrie alimentaire comme arôme. La menthe (*Mentha arvensis*) permet de produire de l'huile essentielle pour l'industrie alimentaire (arôme) ou bien l'industrie cosmétique (parfum).

La plupart des plantes médicinales ou aromatiques sont cultivées pour être utilisées sans extraction préalable (exploitation des feuilles par exemple). Leur biomasse séchée est utilisée directement comme herbes aromatiques ou fait partie de la préparation d'infusions, décoctions, boissons, et aussi de "médicaments" (phytothérapie, aromathérapie, homéopathie). C'est le cas de la Rue officinale (*Ruta graveolens*) : elle entre dans la composition des

comprimés homéopathiques HOMEOGENE[a], DAFLON[b] et dans la composition de la pommade RUDISTROL[c]. Dans ce cas, la plante représente moins de 1% du médicament.

3.1.2. Cultures de tissus

a. Cultures d'organes et cultures de cellules indifférenciées

La production industrielle de métabolites végétaux par des cultures *in vitro* est considérée comme un moyen de contourner le principal problème rencontré lors des cultures de plantes entières : une qualité de production très variable à cause des conditions environnementales hasardeuses (conditions climatiques, maladies, mauvaises herbes) (Zenk, 1978 ; Smith, 1995). Haberlandt a été le premier à tenter la culture de cellules végétales isolées (Haberlandt, 1902). C'est dans les années 1930 que les premières cultures *in vitro*, présentant des divisions mitotiques, purent être établies (Gautheret, 1939).

La majorité des travaux concerne les cultures de cals, initiés à partir des plantes entières et ensuite cultivés en milieu liquide sous forme de suspension de cellules indifférenciées. Les cellules végétales indifférenciées ont été établies par rapprochement aux cultures de micro-organismes. Elles peuvent produire les mêmes métabolites que la plante dont elles sont issues mais ce n'est pas systématique : par exemple, les cultures *in vitro* de cals de Psoralea ne produisent pas de furocoumarines alors que la plante entière en contient (Bourgaud *et al.*, 1995 ; Bouque, 1997). Parfois, de nouveaux métabolites peuvent être détectés, comme par exemple la rutacultine, produite par les cellules de *Ruta graveolens* (Steck *et al.*, 1971).

De nombreuses études ont déjà montré la présence constitutive de coumarines dans des cultures de cellules indifférenciées de *Ruta graveolens*. Quelques résultats sont résumés dans le **Tableau A-4** (page suivante).

Certains métabolites, liés à une étape de différenciation cellulaire, font souvent défaut dans les cultures de cellules indifférenciées. L'initiation de cultures d'organes ou de tissus différenciés est alors un moyen d'obtenir la synthèse des composés. Les tissus différenciés présentent des structures particulières ou une compartimentation spécialisée qui permet la synthèse et le stockage de certains métabolites. Chez les espèces du genre *Mentha*, les feuilles possèdent des glandes olifères épidermiques, sites primaires de biosynthèse et d'accumulation des monoterpènes (Dornenburg et Knorr, 1995).

Les tiges feuillées ou les racines peuvent être obtenues en jouant sur l'équilibre des phytohormones du milieu ou bien être induites par transformation génétique avec *Agrobacterium tumefaciens* ("shooty teratoma") et *A. rhizogenes* ("hairy roots") (Oksman-Caldentey *et al.*, 1996): ces méthodes permettent d'obtenir des taux de croissance supérieures à ceux des tissus non transformés.

[a] *affections rhumatismales (Laboratoires BOIRON)*
[b] *insuffisances veinolymphatiques (Laboratoires SERVIER)*
[c] *douleurs rhumatismales (Laboratoires BOIRON)*

Coumarines	Cultures de cellules	Références
Herniarine	Cals de *Ruta graveolens* L.	*Reinhard et al., 1968*
Gravelliférone méthylester		*Reinhard et al., 1968*
Psoralène		*Reinhard et al., 1968*
Bergaptène		*Reinhard et al., 1968*
Xanthotoxine		*Reinhard et al., 1968*
Umbelliférone		*Reinhard et al., 1968 ; Varga et al., 1975*
Scopolétine		*Reinhard et al., 1968 ; Varga et al., 1975*
*Ruta*rétine		*Reinhard et al., 1968 ; Varga et al., 1975*
*Ruta*rine		*Varga et al., 1975*
Isorutarine		*Varga et al., 1975*
Marmésine		*Varga et al., 1975*
Xanthylétine		*Von Broke et al., 1971*
*Ruta*cultine	Suspensions de *Ruta graveolens* L.	*Steck et al., 1971*
*Ruta*marine		*Steck et al., 1971*
Isopimpinelline		*Steck et al., 1971*
Umbelliférone	Cals de *Ruta graveolens* L. spp. *hortensis*	*Varga et al., 1978*
Marmésine		*Varga et al., 1978*
*Ruta*rine		*Varga et al., 1978*
Isorutarine		*Varga et al., 1978*

Tableau A- 4 : Coumarines constitutives dans les cultures de cellules de *Ruta graveolens* L.

b. Exemples de cultures *in vitro* pour la production de métabolites secondaires

Comme les plantes entières, les cultures de tissus sont source de produits allant des molécules pharmaceutiques aux arômes, parfums, pigments, édulcorants, composés aromatiques, polysaccharides ou enzymes.

Le succès de la production de shikonine par des cultures de cellules fut une étape majeure de l'histoire des biotechnologies végétales. Les cellules de *Lithospermum erythrorhizon* sont effectivement cultivées à l'échelle industrielle, comme les autres espèces signalées dans le **Tableau A-5**.

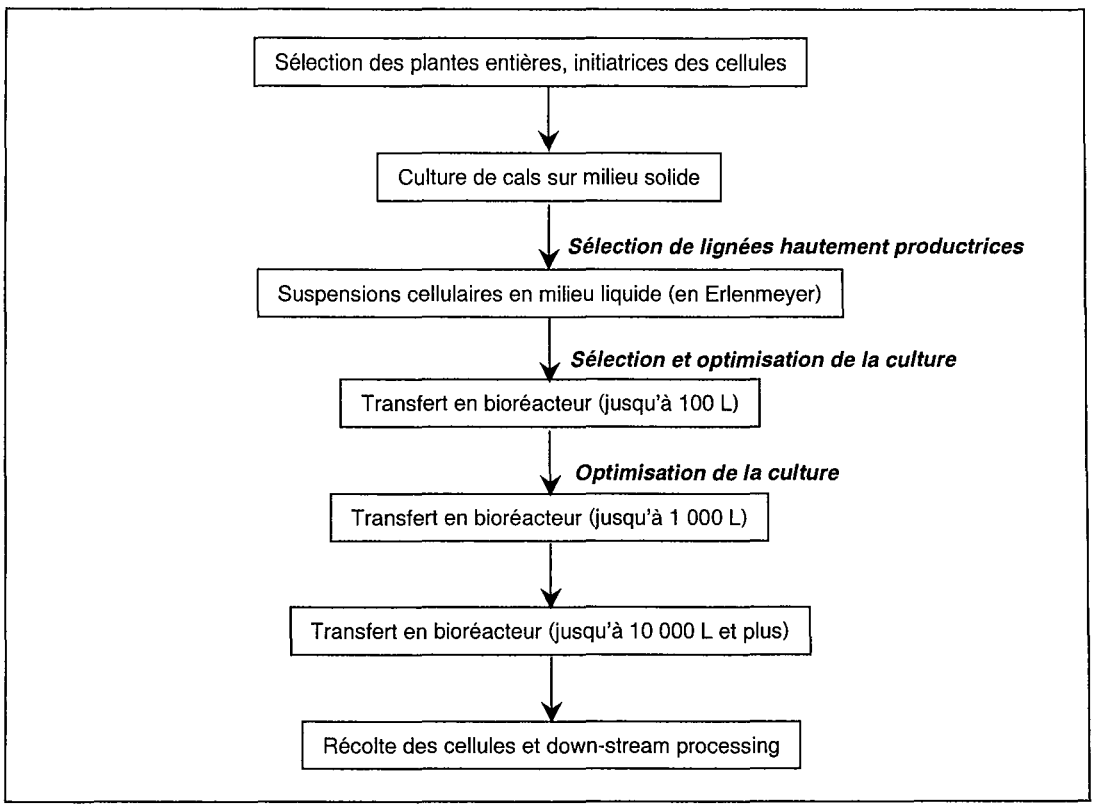
Produit	Espèce cultivée	Type de bioréacteur	Volume
Shikonine	*Lithopermum erythrorhizon*	Culture en batch, à deux phases	750 L
Berbérine	*Thalictrum minus, Coptis japonica*	Culture en batch et flux continu, impeller-driven	4 000 L
Saponines du Ginseng	*Panax ginseng*	Cultures de cellules et de racines	20 000 L
Taxol	*Taxus brevifolia*	Impeller-driven	75 000 L
Sanguinarine	*Papaver somniferum*	Airlift reactor	300 L

Tableau A- 5 : Exemples de bioréacteurs utilisés en industrie pour la production de métabolites secondaires de végétaux

D'après Muhlbach, 1998 et Smith, 1995

Beaucoup d'autres espèces végétales sont étudiées dans l'optique d'une éventuelle production de composés pharmaceutiques et quelques-unes figurent dans le **Tableau A-6** (page suivante).

Figure A-13 : Procédure de montée en échelle pour des cultures de cellules végétales. Proposée par Muhlbach, 1998 .



Produit	Espèce cultivée	Rendement	Stimulation de la production	*Références*
Acide rosmarinique	*Coleus blumei*	3,3 g/L	-	*Ulbrich, 1986*
Sanguinarine	*Papaver somniferum*	3,6mg/g MF	chitine solubilisée	*Kurz et al.,1990*
Alcaloïdes	*Thalictrum bulgaricum*	0,4 mg/mL	levure	*Kammere et al., 1996*
Polyssaccharides	*Echinacae purpurea*	10-100 ppm de vol	-	*Westphal, 1990*
Anthraquinone	*Morinda citrifoloa*	2,5 g/L	-	*Zenk et al., 1975*
Berbérine	*Coptis japonica*	7 g/L	-	*Fujita et Tabata, 1987*
Scopoline	*Solanum aviculare*	127 µg/g MF	immobilisation (billes d'alginate-calcium)	*Roisin et al., 1997*
Ginkgolides	*Ginkgo biloba*	0,0000013% MS	-	*Carrier et al., 1990*
Paclitaxel (taxol)	*Taxus media*	110 mg/L	méthyl-jasmonate	*Yukimune et al., 1996*
Shikonine	*Lithopermum erythrorhizon*	4 g/L	agaropectine	*Tabata et Fujita, 1985*

Tableau A- 6 : Rendement en métabolites secondaires par des cultures de cellules végétales. La production peut être stimulée par certains traitements
D'après Muhlbach, 1998

3.2. STRATEGIES D'AMELIORATION DE LA PRODUCTION

3.2.1. Sélection des plantes ou des souches cultivées

Dans le cas des cultures de plantes entières, dés lors que la teneur du métabolite secondaire désiré est un caractère fortement héritable chez l'espèce végétale choisie, un programme de sélection classique est possible pour obtenir une variété ou un groupe de génotypes correspondant aux attentes agronomiques et biochimiques de l'exploitant. La sélection portera principalement sur la quantité de biomasse et sur la teneur en métabolites.

Dans le cas des cultures *in vitro* de cellules indifférenciées, la sélection des souches hautement productrices se fait tout au long du processus d'industrialisation (**Figure A-13**) car une variabilité extrêmement élevée des teneurs en métabolites secondaires est observée dans les cultures de cellules.

3.2.2. Effets de facteurs environnementaux

a. Cultures de plantes entières

Le rendement en métabolites d'une culture végétale peut être décomposé comme :

rendement/ha = (biomasse/ha) x (teneur en molécule dans la biomasse)

Un grand nombre de facteurs environnementaux est connu pour influencer la production de biomasse. Ces facteurs peuvent aussi avoir un effet sur la teneur en métabolites des plantes cultivées.

La **zone géographique** choisie détermine un pédoclimat (sol et climat) sous lequel vont se développer les plantes.

En particulier, le climat détermine les conditions thermiques, la luminosité, les précipitations et le rythme saisonnier sous lesquelles les plantes sont cultivées. Par exemple, le critère de température est déterminant pour le choix de la zone de culture de certaines espèces de Psoralées (Légumineuses) (Bourgaud *et al.*, 1990). En effet, *Psoralea cinerea* a besoin de 2900 degrés.jour pour effectuer un cycle végétatif complet, jusqu'à la fructification. Cette somme des températures est réalisée dans le sud de la France. En revanche, Les espèces *Psoralea plumosa* et *Psoralea martinii* ont besoin de 3600 degrés.jour, somme de température atteinte dans des zones plus méridionales (Italie, Espagne).

Les cultures en serre peuvent constituer une alternative intéressante pour maîtriser les aléas climatiques et ainsi cultiver les plantes dans des conditions contrôlées.

La **nutrition minérale** des plantes joue un rôle majeur dans l'élaboration de la biomasse. L'azote, le phosphore et le potassium sont les principaux minéraux qui permettent d'obtenir des rendements importants en matière sèche. Il convient de déterminer les doses optimales qui permettent de produire un maximum de métabolites secondaires par unité de surface (Kahar et Nigam, 1990 ; Singh et Shivaraj, 1998). Ces doses varient en fonction du métabolite considéré et de l'espèce cultivée (Dachler, 1990).

L'ajout de micro-éléments a été l'objet d'études pour la production de métabolites secondaires par des plantes cultivées en plein champ. L'effet favorable de l'ajout de manganèse, de fer ou de zinc a été montré sur les rendements en alcaloïdes (Anwar *et al.*, 1993).

D'autres pratiques culturales (la densité de peuplement, la date de récolte, la taille, l'irrigation...) influencent le rendement en métabolites secondaires. La densité de peuplement au champ peut avoir une influence sur le développement de la plante et sur la biosynthèse des métabolites secondaires. Par exemple, la densité d'un peuplement de *Papaver somniferum* influence à la fois la quantité de biomasse sèche, le rendement en tête (capsules où se situe la morphine) et le rendement en morphine (Chung, 1990).

La teneur de certains métabolites varie dans la plante au cours de la journée. Le rythme de production de ces métabolites déterminera le moment précis de la récolte. C'est le cas des alcaloïdes présents dans le pavot (morphine, codéine, thébaine, narcotine), qui montrent 2 pics de synthèse à 12h00 et 16h00 (Singh *et al.*, 1999). Ce rythme de production peut également être annuel dans d'autres cas. En effet, la teneur en métabolites varie en fonction du stade phénologique de la plante. Par exemple, les Psoralées montrent une production maximale de daidzeine au moment de la fructification (Bouque, 1997).

Enfin, des **traitements plus "drastiques"** peuvent être étudiés : la simple pulvérisation de solutions salines (NaCl, $Ca(OCl)_2$, $CuSO_4$) a montré un effet favorable sur la production de psoralène chez une Psoralée (teneur multipliée par 2 ou 3 dans les fruits) (Bourgaud *et al.*, 1992). L'épandage d'herbicide peut aussi constituer un traitement permettant d'augmenter la biosynthèse de métabolites secondaires dans les plantes (Choudhury et Gupta, 1996). Cependant, des effets phytotoxiques peuvent apparaître après de tels traitements, notamment sous la forme d'une diminution de la quantité de biomasse produite par les plantes (Pank, 1990).

b. Cultures *in vitro*

Le rendement en métabolites secondaires par des tissus cultivés *in vitro* peut être décomposé comme le produit de la biomasse produite par unité de volume et la teneur en métabolites dans la biomasse et le milieu. En effet, on recherche non seulement une synthèse maximale des molécules d'intérêt mais aussi le relargage dans le milieu des métabolites, ce qui permet une récupération plus facile des produits. Trois catégories de facteurs sont étudiées afin d'optimiser la culture et la production de métabolites d'intérêt : la composition de base du milieu et les conditions de culture, des traitements avec des additifs qui ne rentrent pas dans la composition basale du milieu (élicitation, perméabilisation, précurseurs métaboliques) et les procédés de culture.

L'influence de la **composition du milieu de culture, de la température, de la lumière ou du pH** sur la croissance *in vitro* et la production de métabolites secondaires est étudiée de façon systématique lors de l'initiation d'une culture. Des paramètres tels que les nutriments (macro-éléments, micro-éléments, vitamines), la source carbonée et les phytohormones déterminent la composition du milieu de culture. Pour les cultures *in vitro*, l'utilisation des phytohormones est autant un moyen de diriger la culture vers un type de tissu (feuilles, racines, cellules indifférenciées) que d'augmenter le rendement du produit (Funk et Brodelius, 1990). Par exemple, une culture de cal de *Lithospermum erythrorhizon* ne produit pas de shikonine sur un milieu contenant du 2,4D (acide 2,4-dichloroacétique) alors qu'à la même concentration, l'AIA (acide indolacétique) induit la production de ce métabolite (Tabata *et al.*, 1974). La lumière est également un facteur important pour la production de molécules tels que les composés aromatiques. Les enzymes impliquées dans leurs synthèses sont localisées dans les chloroplastes et sont dépendantes de la lumière.

Face à des stress biotiques et abiotiques, les plantes synthétisent des phytoalexines, composés antibiotiques de faible poids moléculaire (Bailey *et al.*, 1980 ; Ebel, 1986 ; Dixon *et al.*, 1999). Dans la plante, ces molécules sont induites par des agents d'origine biotique comme des polysaccharides, des peptides ou des fragments de cellules provenant de bactéries, de champignons ou même de plantes (Darvill et Albersheim, 1984 ; Dixon, 1986 ; Fernandez-Bolanos et Heredia, 1993 ; Sharp *et al.*, 1984). Ces agents déclenchant la synthèse des phytoalexines sont appelés éliciteurs. Comme dans les plantes entières, les cellules cultivées *in vitro* réagissent aussi aux éliciteurs et constituent ainsi des modèles d'étude des processus d'élicitation, en particulier pour l'étude des cascades enzymatiques. En biotechnologies, **l'élicitation** a été une approche très attractive. En effet, elle constitue un moyen d'augmenter la production de métabolites par des cultures *in vitro* et favorise aussi le relargage des métabolites dans le milieu (Payne *et al.*, 1991).

La **perméabilisation** chimique est un moyen de favoriser l'excrétion des métabolites retenus dans le milieu (Boitel-Conti *et al.*, 1995). Cependant, elle est très délicate à utiliser puisqu'elle peut entraîner une augmentation de la mortalité des cellules.

Les **précurseurs métaboliques** peuvent être utilisés de deux manières : on peut augmenter la production d'un métabolite désiré en ajoutant un précurseur, plus ou moins éloigné dans la chaîne métabolique, ou bien on peut biotransformer un substrat non actif en son produit actif qui a un intérêt pharmaceutique. Ce dernier cas a été exploité notamment pour la production de la digoxine, glucoside cardiaque : les cellules de *Digitalis lanata* permettent d'obtenir l'hydroxylation de la digitoxine et obtenir la digoxine (Alfermann *et al.*, 1985).

Les **bioréacteurs** ont été initialement développés pour la culture de micro-organismes. Des modifications ont dû être apportées pour s'adapter aux exigences et caractéristiques des cellules végétales : volume cellulaire (3 ou 4 fois supérieur aux bactéries), sensibilité au cisaillement, formation d'agrégats, faible taux de croissance. Les bioréacteurs actuellement utilisés pour la culture en masse des cellules végétales peuvent être répertoriés en fonction du type d'agitation. On peut distinguer les réacteurs dont l'agitation se fait grâce à la rotation de pales ("impeller-driven reactors") et ceux dont l'agitation se fait par un flux d'air ("air-lift ou bubble column") (Muhlbach, 1998). Depuis plusieurs années, l'agitation par flux d'air semble être une alternative intéressante pour réduire le stress dû au cisaillement. Cependant, les réacteurs agités par des hélices sont utilisés avec succès pour un grand nombre de culture (**Tableau A-5**, p 28).

L'immobilisation des cellules dans des matrices d'alginate, d'agar, de gellan, de pectine, de polyacrylamide ou de carrageenan, permet de contourner les faiblesses des cellules végétales indifférenciées (Gontier, 1993 ; Dornenburg and Knorr, 1995) :

- les cellules sont protégées par la matrice, ce qui facilite le passage en bioréacteur,
- si la synthèse a lieu pendant la phase stationnaire, l'immobilisation permet de maintenir les cellules en état de production en ralentissant leur croissance,
- les cellules ont tendance à s'organiser et à se redifférencier, ce qui augmente leur productivité,
- de plus, l'immobilisation entraîne parfois une perméabilisation des membranes des cellules, augmentant la quantité de métabolites relargués dans le milieu (Roisin *et al.*, 1997).

Le critère économique est très important pour choisir le type de cultures végétales qui produira le métabolite secondaire désiré. Or, les cultures in vitro entraînent plus de charges que les plantes entières (coût d'utilisation des bioréacteurs, locaux, stérilisation, main d'œuvre). Il faut donc obtenir des rendements très élevés et abaisser un maximum les coûts de production pour espérer commercialiser un métabolite secondaire issu de cultures in vitro de cellules ou de tissus.

3.2.3. Modification génétique et contrôle enzymatique des voies métaboliques : génie métabolique

Le génie métabolique peut être utilisé sur tous les tissus végétaux (plantes entières ou cultures *in vitro*). Cette méthode consiste à **modifier des gènes ou la régulation de l'expression de gènes** codant pour les enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse des molécules étudiées. Lorsque des éliciteurs sont utilisés pour augmenter ou déclencher la synthèse des furocoumarines (Bohlmann *et al.*, 1995 ; Eilert, 1989 ; Bohlmann et Eilert, 1994), ceux-ci agissent effectivement sur l'expression des gènes (Hamerski et Matern, 1986; Dixon et Paiva, 1995 ; Lee *et al.*, 1997) mais leurs effets sont difficilement ciblés et maîtrisables (Eilert, 1989). En revanche, la modification génétique des voies de biosynthèse (transgénèse par exemple) permet de cibler les molécules dont on veut modifier la biosynthèse. Cette approche implique de connaître les gènes mis en jeu dans la voie de biosynthèse, ce qui est possible grâce à deux approches (cas des furocoumarines):

- **L'approche enzymatique** : il s'agit de **purifier et séquencer les protéines d'intérêt** (enzymes) pour ensuite "remonter" au gène.
- **L'approche génomique** : il s'agit de **constituer une banque d'ARNm** d'un tissu d'une plante produisant les

furocoumarines d'intérêt (banque d'ARNm à partir de feuilles de Rue par exemple). Ensuite, un **criblage différentiel** est réalisé : sur une empreinte de la banque, l'hybridation de sondes issues d'ARNm codant pour les enzymes de type P_{450}[a] du tissu témoin est comparée avec l'hybridation de sondes issues d'ARNm codant pour les mêmes enzymes, sur un tissu de la même plante mais qui a un défaut de production d'une ou plusieurs furocoumarines. Les ARNm manquant dans le deuxième tissu pourront être isolés dans la banque constituée à partir du tissu contenant tous les furocoumarines.

Dans le cas des furocoumarines, deux solutions sont envisageables pour en augmenter la teneur dans les tissus :

- D'une part, surexprimer les gènes codant pour les enzymes en amont de la voie générale des phénylpropanoïdes. Les enzymes comme la PAL ou la C4H (voir **Figure A-3**, p 10) sont très étudiées. Elles ont été purifiées, séquencées et clonées chez plusieurs espèces (C4H : Fahrendorf et Dixon, 1993; Mizutani *et al.*, 1993 ; Teutsch *et al.*, 1993. PAL : Elkind *et al.*, 1990 ; Howles *et al.*, 1996). En surexprimant des enzymes si éloignées des métabolites souhaités, il y a un risque de ne pas voir les bénéfices sur les furocoumarines, du fait de la dilution dans les nombreuses voies dérivant de la phénylalanine et de l'acide cinnamique, en particulier celle de la lignine.

- D'autre part, agir sur les gènes codant pour les enzymes impliquées dans les voies plus spécifiques aux furocoumarines linéaires. Deux stratégies peuvent alors être discutées : la stratégie **sens**, ou *comment augmenter la formation du métabolite souhaité en introduisant une copie des gènes flanquée d'un promoteur fort*, et les stratégies **anti-sens** et **knock-out**, ou *comment réprimer les voies concurrentes ayant les mêmes substrats que le composé étudié*. Si l'on souhaite augmenter la synthèse de bergaptène, il faudra alors surexprimer la synthèse de la psoralène-5-monooxygénase et/ou réprimer celle de la psoralène-8-monooxygénase (voir **Figure A-4**, p 12).

Des plantes transgéniques ont été obtenues pour des espèces végétales à usage alimentaire, mais peu pour des plantes médicinales. Les exemples sont encore plus faibles pour des transformations génétiques de plantes médicinales qui ont pour but de modifier la production de métabolites secondaires. La culture d'organes transgéniques (racines et tiges transformées) est déjà réalisée chez plusieurs espèces pour améliorer la croissance, et ce grâce aux transformations par *Agrobacterium*, (Mukundan *et al.*, 1999). Des plantes, dont l'expression de la PAL a été modifiée, ont aussi été obtenues chez le tabac (Elkind *et al*, 1990; Bate *et al.*, 1994 ; Howles *et al.*, 1996).

4. CONCLUSIONS

Nous avons choisi de travailler sur le genre *Ruta* pour différentes raisons. D'abord la Rue est naturellement présente en Europe, ce qui permet une mise en culture facile, contrairement aux Psoralées qui sont des plantes australiennes et qui doivent être cultivées dans des régions suffisamment ensoleillées (Bourgaud, 1990). De plus, les Rues ont un port buissonnant. Les plantes arrivent à maturité plus rapidement, contrairement à des espèces végétales arborescentes comme *Ficus carica*. Ensuite, les furocoumarines linéaires sont naturellement synthétisées par la Rue (voir **Annexe 1**). Le psoralène, le bergaptène ou la xanthotoxine ont aussi été détectés dans des cals de *Ruta graveolens* (voir **Tableau A-4**, p 28), ce qui n'a pas été le cas dans les cals de Psoralées (Bouque, 1997).

[a] *voir chapitre A paragraphe 1.1.3 : Contrôle enzymatique de la synthèse des furocoumarines*

Les expérimentations, présentées dans le chapitre suivant, ont pour objectif d'étudier la possibilté de produire des furoccoumarines à l'aide de cultures de Rue (plantes entières et suspensions cellulaires).

Trois directions de recherche ont été étudiées afin d'évaluer la faisabilité de la bio-production de furocoumarines par des plantes entières de Rue :

• Quantification de la variabilité phénotypique de la production de furocoumarines par plusieurs espèces du genre *Ruta* : ces résultats permettront de dégager les espèces ayant un fort potentiel de production,

• Etude de la répartition des furocoumarines dans les différents organes de la plante et variation de cette répartition au cours de son développement : la détermination des lieux de stockage des furocoumarines pourra permettre de mieux gérer une éventuelle exploitation de la Rue et rendre efficace la production de furocoumarines à partir de ces plantes,

• Evaluation des effets sur le rendement surfacique et la productivité en furocoumarines de diverses pratiques culturales, telles que la fertilisation, la densité de peuplement, la récolte des plantes.

Le potentiel de production de furocoumarines par des suspensions cellulaires de Rue a été évalué suivant trois directions de recherche :

• Quantification de la variabilité de la production en furocoumarines par des suspensions cellulaires de Rue,

• Suivi, au cours du temps, de la production en furocoumarines par des suspensions cellulaires de Rue,

• Evaluation des effets de certains traitements tels que l'élicitation et l'immobilisation.

La bibliographie montre que la xanthotoxine et le bergaptène ont les mêmes propriétés mais que le bergaptène est moins toxique. Le but est donc de produire un maximum de bergaptène. Ces deux métabolites ont pour précurseurs le psoralène et sont elles-mêmes précurseurs de l'isopimpinelline. Ainsi, il nous est apparu essentiel de déterminer le profil de ces 4 métabolites dans les plantes ou cellules récoltées, afin de montrer l'effet des traitements sur le bergaptène mais aussi sur les 3 autres métabolites qui lui sont proches dans la voie de biosynthèse. Nous pourrons mettre en évidence de quelle façon les équilibres sont modifiés par les traitements pratiqués.

Nous avons étudié des suspensions cellulaires de Rue à deux titres : d'une part afin de comparer leur productivité à celle des plantes entières ; d'autre part parce que les cultures *in vitro* sont un modèle pour l'étude des enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse.

B. MATERIELS, METHODES ET PROTOCOLES

B. MATERIELS, METHODES ET PROTOCOLES

Ce chapitre présente le matériel végétal et les moyens techniques employés dans les expérimentations. Il y figure aussi les protocoles expérimentaux, ainsi que quelques mises au point méthodologiques qui ne répondent pas directement au questionnement général du sujet mais qui sont nécessaires à l'acquisition des résultats.

1. CULTURES DE PLANTES ENTIERES

1.1. OBTENTION DU MATERIEL VEGETAL

1.1.1. Collection d'espèces du genre *Ruta*

Un ou plusieurs écotypes (= lots) de 4 espèces du genre *Ruta* ont été étudiés au champ afin de connaître leur teneur en furocoumarines. Les semences de *Ruta chalepensis* sous-espèce *angustifolia*, *Ruta chalepensis*, *Ruta graveolens* et *Ruta montana* ont été fournies par des jardins botaniques et des entreprises européennes, comme il est décrit dans le **Tableau B-1**.

Espèces	***R. chal. ssp. angustifolia***	***R. chalepensis***		***R. graveolens***							***R. montana***
Provenance	*1*	*2*	*3*	*1*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*	*9*	*3*
Ecotype (lot)	6	43	18	5	8	10	14	16	23	27	19
Nombre de répétitions*	2	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3
(Total)	**2**	**6**					**19**				**3**

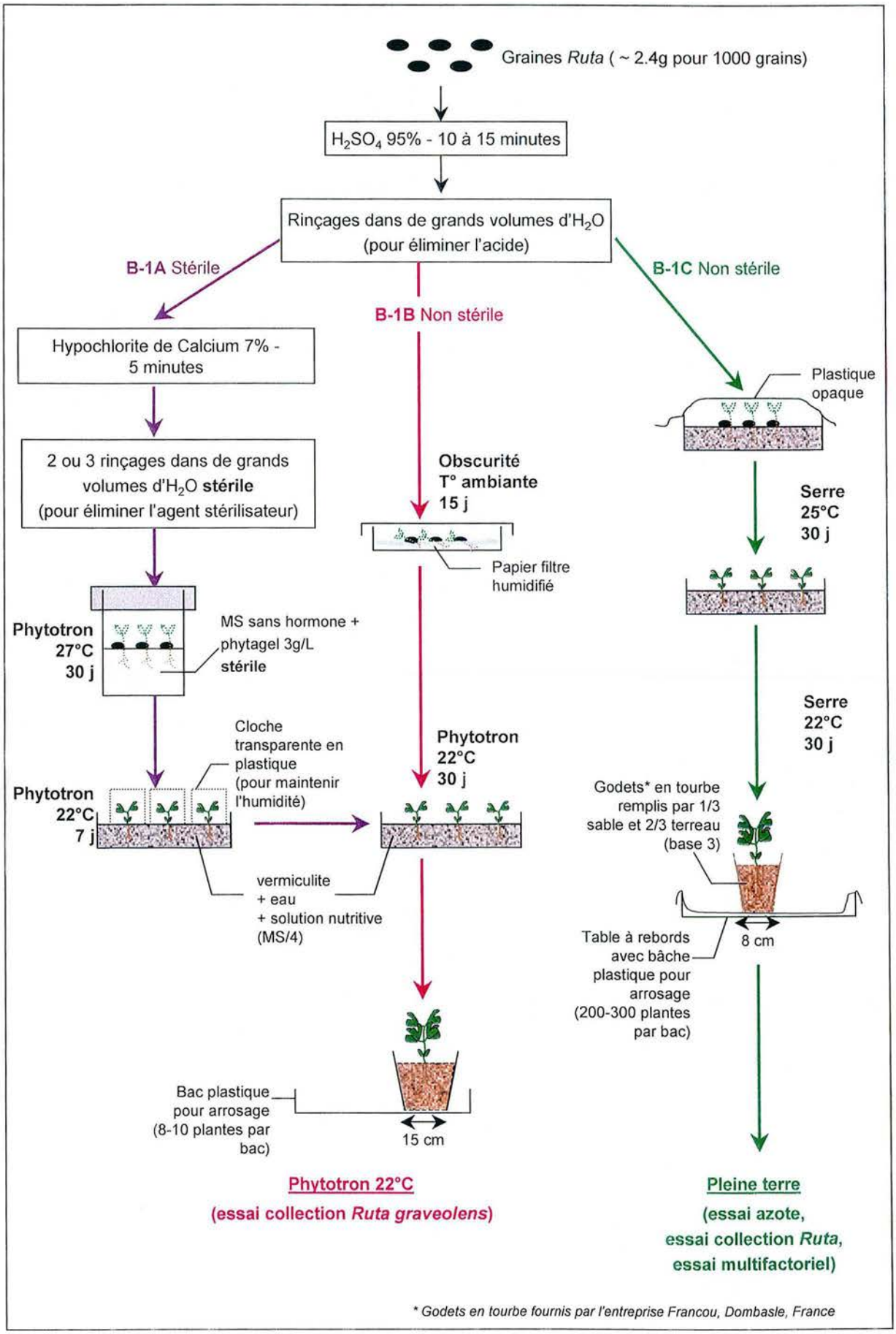
Tableau B- 1 : Provenances des semences du genre *Ruta* et nombre de répétitions testées pour la production de furocoumarines

* nombre de plantes sur lesquelles ont été effectués les prélèvements de feuilles

1 *– Museum d'Histoire Naturelle, Paris, France ;* ***2*** *– Orto Botanico Dell'Università, Siene, Italie ;* ***3*** *– Botanischer Garten und Botaniches Museum, Berlin, Allemagne ;* ***4*** *– Botanischer Garten der Stadt, Krefeld, Allemagne ;* ***5*** *– Botanischer Garten der Universität, Leipzig, Allemagne ;* ***6*** *– Jardin Botanique, Nancy, France ;* ***7*** *– Station* Fédérale de *Recherches Agronomiques, Changins, Suisse ;* ***8*** *– Hortus Botanicus, Leuven, Belgique ;* ***9*** *– Botanischer Garten der Universität, Wien, Autriche.*

Seize écotypes de l'espèce de *Ruta graveolens* ont été testés en phytotrons pour leur teneur en furocoumarines linéaires. Les semences des différents écotypes ont été fournies par des jardins botaniques et des entreprises européennes (**Tableau B-2**, page suivante).

Figure B-1 : Scarification, germination et mise en culture des plantes entières.



Ecotype	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
Provenance	*5*	*5*	*10*	*1*	*6*	*6*	*11*	*3*	*8*	*8*	*8*	*11*	*12*	*13*	*13*	*2*
Lot	10	11	1	5	13	14	15	17	22	23	24	27	32	34	36	42
Nombre de répétitions	**14**	**15**	**12**	**10**	**12**	**12**	**12**	**2**	**12**	**10**	**8**	**11**	**11**	**11**	**11**	**12**

Tableau B- 2 : Provenances des semences des écotypes de l'espèce *Ruta graveolens* et nombre de répétitions testées pour la production de furocoumarines

1 *- Museum d'Histoire Naturelle, Paris, France;* ***2*** *- Orto Botanico Dell'Università, Siene, Italie;* ***3*** *- Botanischer Garten und Botaniches Museum, Berlin, Allemagne;* ***5*** *- Botanischer Garten der Universität, Leipzig, Allemagne;* ***6*** *- Jardin Botanique, Nancy, France;* ***8*** *- Hortus Botanicus, Leuven, Belgique;* ***10*** *- CNPPMAI, Milly-La-Forêt, France;* ***11*** *- M. Lemoine, EARL La Gitinière, Soings-en-Sologne, France;* ***12*** *- Hortus Botanicus of Instituti Oecologici et Botanic Academiae Scientiarum Hungarica, Vacratot, Hongrie;* ***13*** *- Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Allemagne.*

1.1.2. Autre origine des semences de *Ruta graveolens*

Dans le cas des expérimentations réalisées au champ et destinées à évaluer l'effet de différents facteurs agronomiques, les semences de *Ruta graveolens* ont été fournies par l'entreprise Bertrand Frères (Orléans, France) et correspondaient au lot 7284.

1.1.3. Conditions de germination et d'obtention de plantules

Quelle que soit l'origine de la semence, les graines ont été scarifiées 10 à 15 minutes dans H_2SO_4 95% afin de faciliter la germination (Bourgaud, 1990). Après scarification, les graines sont rincées à l'eau distillée puis mises à germer suivant les modalités décrites ci-après.

Cas des cultures en phytotrons : une partie des germinations a été réalisée dans des boîtes de Pétri à l'obscurité sur papier filtre (**Figure B-1B**). Cependant, le développement démesuré de champignons sur les filtres et les plantules nous a contraint à réaliser les germinations en conditions stériles (**Figure B-1A**).

Cas des plantes qui seront transférées ensuite en plein champ : le protocole de germination a été extrêmement simplifié en raison du nombre élevé de plantules à obtenir (**Figure B-1C**).

1.2. CONDITIONS DE CULTURE

1.2.1. Conditions contrôlées

La culture des 16 écotypes de l'espèce *Ruta graveolens* (essai COLLECTION *Ruta graveolens*) a été réalisée en conditions contrôlées dans un phytotron du laboratoire. Les conditions ont été fixées comme indiqué dans le **Tableau B-3** (page suivante).

Humidité	Photopériode	Lumière	Température diurne	Température nocturne
60%	16 : 8 (J : N)	300 µmol.m^{-2}.s^{-1}	22°C	18°C

Tableau B- 3 : Conditions de culture en phytotron

Les godets de tourbe contenant les plantules destinées à la culture en plein champ ont été entreposés en serre, où la température était comprise entre 12 et 25°C.

1.2.2. Expérimentations en plein champ

Trois essais ont été réalisés au champ.
Un essai MULTIFACTORIEL se situe en Sologne, sur une parcelle de 1 hectare appartenant à M. Bourdillon (EARL La Noue, Soings-en-Sologne, France) en collaboration avec M. Lemoine (EARL La Gitinière, Soings-en-Sologne, France). L'analyse de sol figure dans l'**Annexe 2**. Le sol a une structure sableuse.

Les deux autres essais en plein champ, l'essai AZOTE et l'essai COLLECTION d'espèces du genre *Ruta*, ont été implantés à la Ferme expérimentale de l'ENSAIA, La Bouzule (Champenoux, France), dirigée par M. Guimont. Les parcelles ont une surface de 100 m^2 pour l'essai azote et 50 m^2 pour l'essai COLLECTION *Ruta*. Auparavant, du ray-grass avait été cultivé pendant 3 ans sur ce terrain. L'analyse de sol figure dans l'**Annexe 3**. Le sol a une structure limono-argileuse.

1.3. PLANS DES ESSAIS ET PROTOCOLES D'OBTENTION DES PLANTES

1.3.1. Essai COLLECTION *Ruta*

Quinze lots de graines du genre *Ruta*, provenant de différentes origines (jardins botaniques, **Tableau B-1**), ont été scarifiés et mis à germer selon la **Figure B-1C** (environ 20 graines/lot, mars 1999). Sur ces 15 lots : 2 lots représentaient *R. montana*, 1 lot *R. chal.* ssp. *angustifolia*, 3 lots *R. chalepensis*, 1 lot *R. corsica* et 8 lots *R. graveolens*. Certains lots n'ayant pas levé la première fois, 10 à 30 graines pour 12 lots ont été à nouveau scarifiées (avril 1999). Un mois après la mise en germination, les plantules ont été placées en godets de tourbe (avril 1999) puis transplantées en pleine terre en mai 1999 (La Bouzule, Champenoux, France) selon le plan figurant dans l'**Annexe 4**.

Deux pulvérisations d'azote ont été pratiquées en 1999, équivalant chacune à 50 kg/ha (en juin et juillet 1999).

Afin de déterminer la teneur en furocoumarines linéaires des différentes espèces, un prélèvement de feuilles (3 feuilles prises au hasard sur la plante) a été fait sur 3 plantes par lot lorsque cela était possible (voir **Tableau B-1**), en octobre 1999, soit 5 mois environ après l'implantation. La teneur en furocoumarines linéaires a été déterminée sur les feuilles lyophilisées.

1.3.2. Essai COLLECTION *Ruta graveolens*

Au départ de cet essai, 29 écotypes ont été mis à germer. Cependant, certaines graines avaient perdu leur pouvoir germinatif. Nous n'avons donc pas obtenu des plantes pour chacun des 29 écotypes : seulement 17 origines, dont 16

Figure B-2 : Découpage des plantes récoltées sur l'essai AZOTE (Bouzule 2000).

Le poids de matière fraîche et le poids de matière sèche sont mesurés pour chaque compartiment. Les furocoumarines sont analysées pour les compartiments Fruit et Feuille.

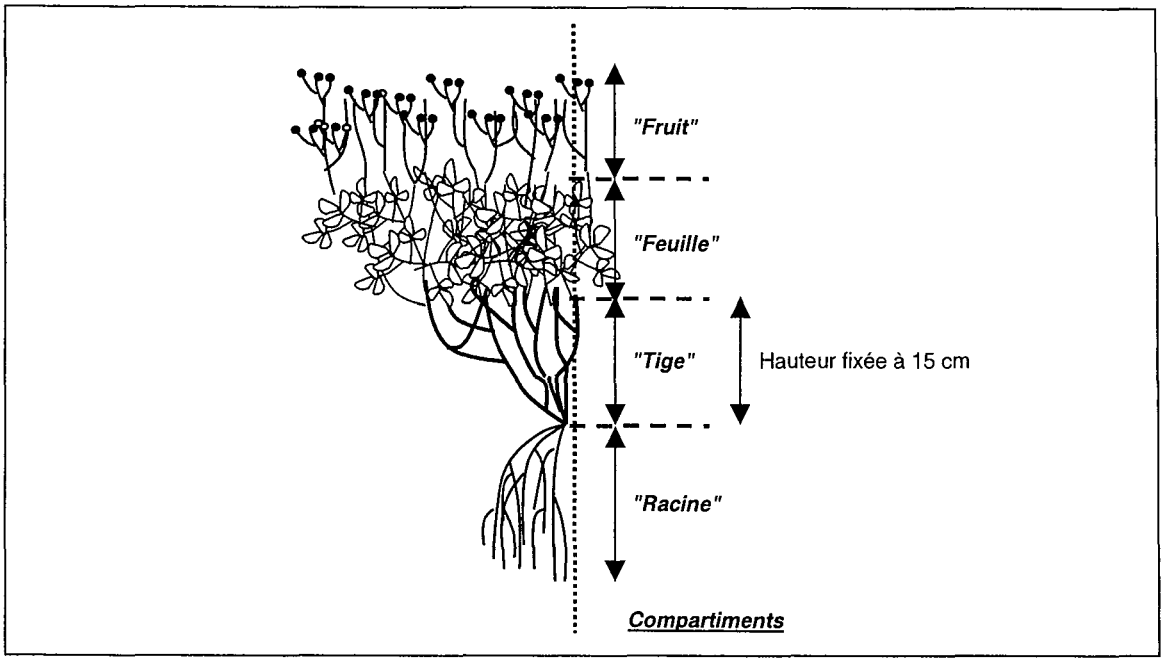


Tableau B-5 : Récapitulatif des modalités-coupe sur l'essai MULTIFACTORIEL (Sologne 1997-2000) pour 15 000 plantes/Ha ou 30 000 plantes/Ha.

Légende: = plantation = coupe = prélèvement ***X*** = pas de coupe ***C*** = coupe

	1997			1998			1999			2000			***Ref. prélèv.***	***nb plantes par prélèv.***
	avr	juil	oct	avr	juil	oct	avr	juil	oct	avr	juil	oct		
Modalités														
aucune coupe - récolte 1998													***x-avr***	*16*
													x-juil	*16*
													x-oct	*6*
1 coupe – récolte 1998													***c-avr***	*4*
													c-juil	*4*
													c-oct	*6*
Aucune coupe													***x-98***	*16*
													xx-99	*6*
													xxx-00	*6*
1 coupe par an													***c-98***	*4*
													cc-99	*6*
													ccc-00	*3*
1 coupe par an sauf 1998													***x-98***	*16*
													xc-99	*6*
													xcc-00	*6*

de l'espèce *Ruta graveolens*, ont pu fournir suffisamment de plantes (selon **Figure B-1A** et **1B**) pour permettre de comparer leur teneur en furocoumarines. L'essai nous a donc permis de déterminer la variabilité intraspécifique au sein de l'espèce *Ruta graveolens*, avec 10 à 15 plantes par origine (voir **Tableau B-2**). Les plantes ont été placées de façon aléatoire, dans le phytotron.

La teneur en furocoumarines a été déterminée sur les feuilles lyophilisées prélevées sur des plantes de 210 jours.

1.3.3. Essai AZOTE

Les 441 plantules, nécessaires pour mesurer l'effet d'un apport azoté (sur le développement de plantes de l'espèce *Ruta graveolens* et sur la teneur en furocoumarines), ont été obtenues suivant les modalités exposées sur la **Figure B-1C**. La transplantation en pleine terre a été réalisée au mois de mai 1999 à une densité de 40 000 plantes/ha. **Quatre doses annuelles** ont été testées 0 U[a], 50 U, 100 U, 150U, suivant le plan d'expérience figurant dans l'**Annexe 5**. Nous avons choisi un plan d'essai contenant 4 blocs. Les blocs ont été disposés perpendiculairement à une hétérogénéité de pente observée sur le terrain. Afin d'éviter les effets de bordures, une rangée a été plantée entre chaque traitement et chaque bloc. Les 4 plantes récoltées pour les analyses sont situées au centre d'1 unité expérimentale contenant au total 16 plantes.

L'apport des doses d'azote a été fractionné selon le mode figurant dans le **Tableau B-4**.

Deux prélèvements ont été effectués : le premier non destructif en 1999 et le second en 2000 au cours duquel les plantes ont été prélevées en totalité (**Tableau B-4**). Trois feuilles par plante ont été prélevées au hasard en 1999, et la teneur en furocoumarines linéaires a été déterminée sur les feuilles lyophilisées.

Le prélèvement 2000 a été réalisé au cours de la fructification des plantes. Les plantes ont été découpées en 4 compartiments (FRUIT, FEUILLE, TIGE, RACINE), suivant la **Figure B-2**. Le poids de matière fraîche et le poids de matière sèche de chaque compartiment ont été mesurés. Les furocoumarines linéaires ont été dosées sur les compartiments FRUIT et FEUILLE lyophilisés.

	1999			2000		
	1er apport	**2ième apport**	**Prélèvement**	**1er apport**	**2ième apport**	**Prélèvement**
Traitement	*9/6/1999*	*8/7/1999*	*1/10/1999*	*26/4/2000*	*6/6/2000*	*1/8/2000*
0 U	0 kg.ha^{-1}	0 kg.ha^{-1}	3 feuilles x 4 plantes x 4 blocs	0 kg.ha^{-1}	0 kg.ha^{-1}	3 plantes x 3 blocs
50 U	50 kg.ha^{-1}	0 kg.ha^{-1}	"	50 kg.ha^{-1}	0 kg.ha^{-1}	"
100 U	50 kg.ha^{-1}	50 kg.ha^{-1}	"	50 kg.ha^{-1}	50 kg.ha^{-1}	"
150 U	75 kg.ha^{-1}	75 kg.ha^{-1}	"	75 kg.ha^{-1}	75 kg.ha^{-1}	"

Tableau B- 4 : Apports azotés et prélèvements sur l'essai AZOTE

[a] *U= unité d'azote ou kg de N/ha*

Figure B-3 : Coupes et prélèvements sur l'essai MULTIFACTORIEL (Sologne 1997-2000).

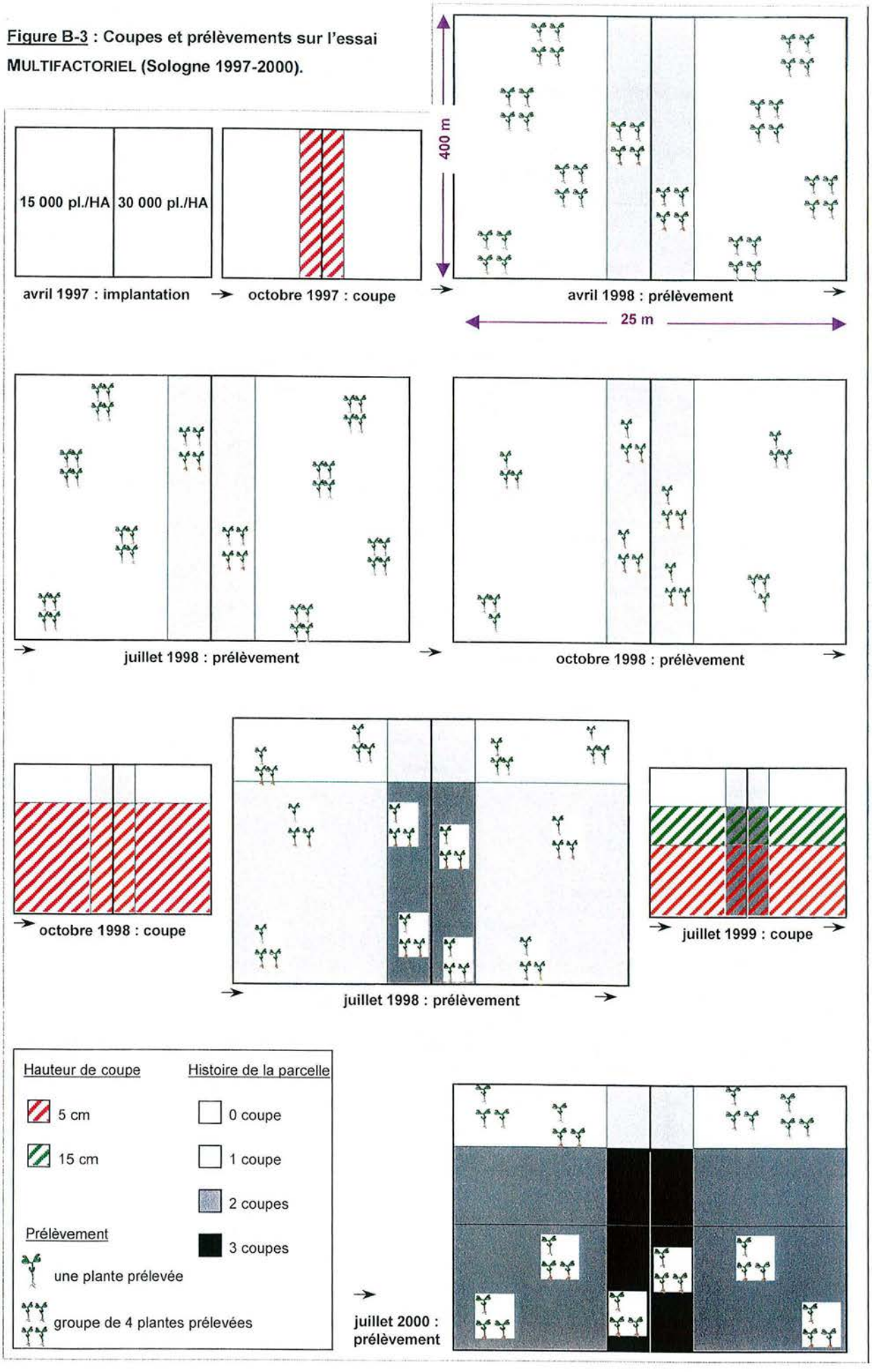
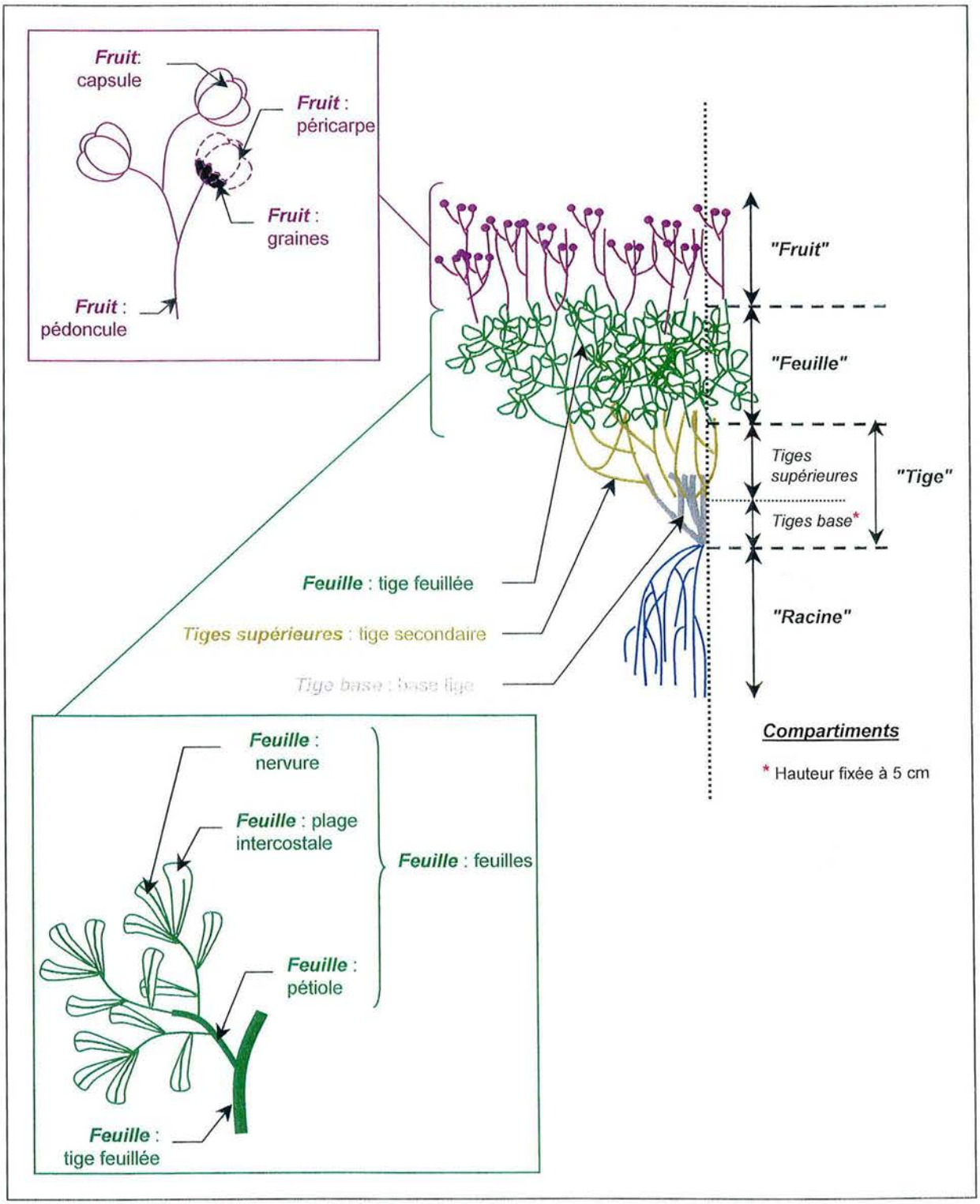


Figure B-4 : Découpage des plantes récoltées sur l'essai MULTIFACTORIEL (Sologne 1997-2000).

Hauteurs, poids de matière fraîche, poids de matière sèche, teneurs en furocoumarines linéaires sont déterminés pour chaque compartiment. Les dissections plus fines ont été faites en juillet 1998 et juillet 2000



1.3.4. Essai MULTIFACTORIEL

Cet essai s'est déroulé sur 4 années, sur une parcelle de **1 hectare** située en Sologne. Les plants de Rue cultivés au préalable en serre, ont été repiqués au champ en avril 1997. La moitié de la parcelle a été plantée à une densité de 15 000 plantes/ha et l'autre moitié à 30 000 plantes/ha. La parcelle a été fertilisée tous les ans par l'apport d'un engrais NPK (14-6-20) à hauteur de 500 kg/ha.

Cet essai nous a permis d'étudier l'effet de différents facteurs sur la croissance de la Rue et sur sa production en furocoumarines : l'effet densité (15000 et 30000 plantes/ha), l'effet date de récolte (au cours de l'année et sur 3 années pour un même stade phénologique) et l'effet de coupes rases. Les coupes et les prélèvements sont représentés dans la **Figure B-3** et les modalités-coupe sont récapitulées dans le **Tableau B-5**.

De plus, nous avons pu étudier, sur un grand nombre de plantes (85 plantes au cours de la campagne), la répartition de la biomasse et des furocoumarines au sein même de la plante. Le découpage des plantes est schématisé sur la **Figure B-4**.

Le dispositif expérimental ayant été mis en place avant notre arrivée, il ne nous a pas été possible de contrôler d'éventuelles hétérogénéités par un dispositif en bloc. Nous avons fait des prélèvement sur toutes la parcelles pour déterminer la présence d'hétérogénéités (voir chapitre **C**, paragraphe **2.1**, p69).

1.4. DISSECTIONS DES PLANTES PRELEVEES AU CHAMP

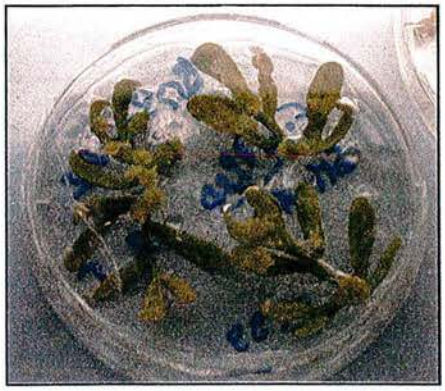
Deux raisons nous ont conduit à découper les plants de Rue récoltés au champ en compartiments horizontaux (**Figures B-2** et **B-4**):

• La morphologie de la Rue est de type "stratifié". En effet, les différents organes-clefs de la plante (fruits, feuilles, racines) sont bien différenciés en couches. Les compartiments horizontaux définis par ces couches ont donc une signification biologique.

• Nous avons cherché à reproduire la récolte de la plante au champ. Pour cela, il nous a semblé pertinent de découper la partie aérienne à différentes hauteurs, afin de pouvoir reproduire différents scénarios de récolte.

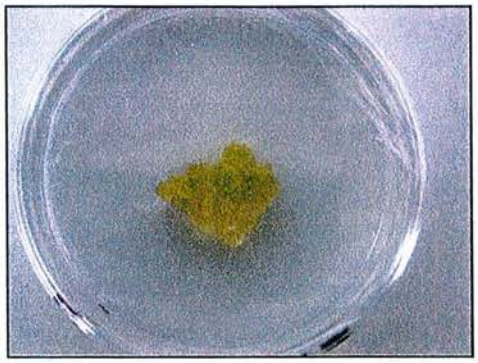
Planche 3 : **Initiation de cals de *Ruta graveolens*.**

Milieu = $B_5(30)D_2$ = milieu Gamborg B_5, 30 g.L^{-1} saccharose, 2 mg.L^{-1} 2,4D.



Cal sur feuille

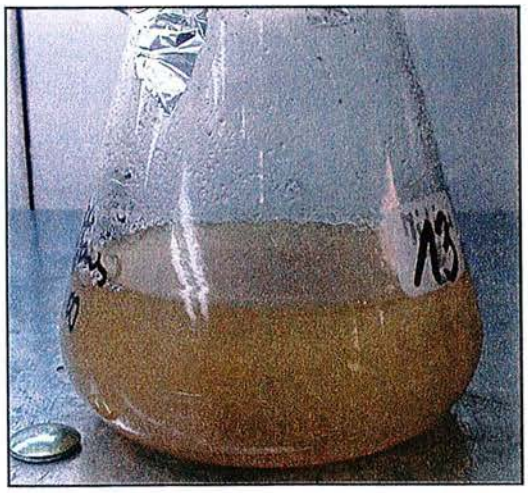
Cal sur pétiole



Cal repiqué sur milieu neuf

Planche 4 : **Suspensions cellulaires de *Ruta graveolens*.**

Milieu = $B_5(30)D_2$ = milieu Gamborg B_5, 30 g.L^{-1} saccharose, 2 mg.L^{-1} 2,4D.

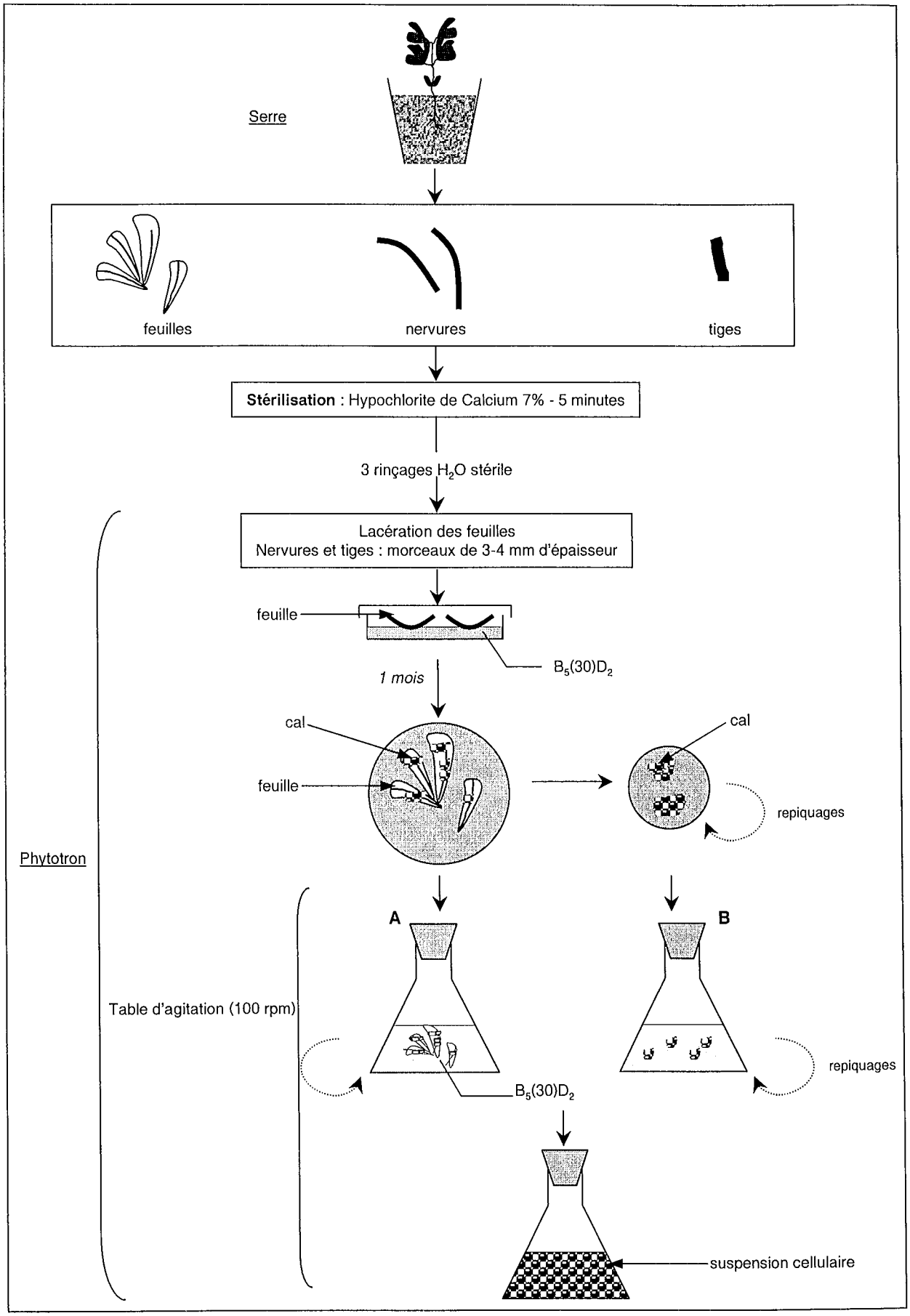


Suspension cellulaire fine

Suspension cellulaire avec agrégats

Figure B-5 : Etablissement des suspensions cellulaires

$B_5(30)D_2$ = milieu Gamborg B_5, 30 g.L^{-1} saccharose, 2 mg.L^{-1} 2,4D.



2. CULTURES *IN VITRO*

2.1. ETABLISSEMENT DES SUSPENSIONS CELLULAIRES

Deux séries de suspensions cellulaires de *Ruta graveolens* ont été initiées : **SC** (*lot 18, Botanischer Garten und Botaniches Museum, Berlin, Allemagne*) et **DEO** (*lot 13, Jardin Botanique, Nancy, France*). **SC** provient de cals (**Figure B-5B**) et **DEO** provient de feuilles et de nervures blessées et mises en milieu liquide après le développement de microcals de cicatrisation (**Figure B-5A, Planches 3 et 4**).

Une collection de souches de cellules indifférenciées (SC7284) a été aussi initiée à partir de cellules libres relarguées par des plantules germées stérilement (*lot 7284, Bertrand frères, Orléans, France*), cultivées en milieu liquide (milieu $B_5(30)K_2D_2$[a]). Chaque flacon a été inoculé avec une graine germée. Au bout de 3 semaines, des suspensions cellulaires se sont formées dans le milieu de culture, où des tiges feuillées se sont également développées. Les cellules indifférenciées ont été prélevées et remises en culture dans un milieu $B_5(30)D_2$ (milieu standard de culture des suspensions cellulaires décrit ci-après).

2.2. MILIEU STANDARD DE CULTURE

Suspensions cellulaires

Quelle que soit la méthode d'obtention des suspensions, le milieu de culture est un milieu Gamborg B_5 (Gamborg *et al.*, 1968), contenant 30 g/L de saccharose et 2 mg/L de 2,4 D, que l'on nommera **$B_5(30)D_2$** (composition des milieux de cultures dans l'**Annexe 6**). Les milieux semi-solides sont obtenus par addition de phytagel (3 $g.L^{-1}$) au milieu liquide. La verrerie et les milieux de culture sont stérilisés par passage à l'autoclave, avec un pallier de 20 minutes à 120°C. Le matériel en acier (pince, spatule) est stérilisé au moins 24 heures dans un four Pasteur à 150°C.

La culture en petits volumes se fait en flacon Erlenmeyer de 250 mL, contenant 75 ou 100 mL de milieu $B_5(30)D_2$. L'oxygénation des milieux est assurée par une agitation rotative (100 rotations par minute). Les cultures *in vitro* sont menées en phytotron à 25°C.

Quatre autres milieux, initiallement développés pour *Ammi majus*, ont été testés afin de vérifier leurs effets sur la croissance, la morphologie et la production en furocoumarines par les suspensions de *Ruta graveolens*. Ces 4 milieux sont basés sur le milieu MS de Murashige et Skoog (Murashige et Skoog, 1962), supplémentés de diverses hormones : MS sans hormones ; MS + 0,1 mg/L NAA + 0,5 mg/L BAP ; MS + 0,5 mg/L BAP + 0,25 mg/L GA3 ; MS + 0,05 mg/L NAA + 0,25 mg/L BAP.

L'essai de culture en grand volume a été réalisé dans un bioréacteur Biostat de 2,5L (**Planche 5**, p 43) dont les paramètres suivants ont été contrôlés : température 27°C, pression partielle d'oxygène 45%, agitation 65 rpm.

[a] *$B_5(30)K_2D_2$ = milieu standard Gamborg, + 30 g/L de saccharose + 2 mg/L de kinétine + 2mg/L de 2,4D*

Figure B-6 : Dispositif d'évaluation de la croissance de suspensions cellulaires sans ouverture du flacon de culture

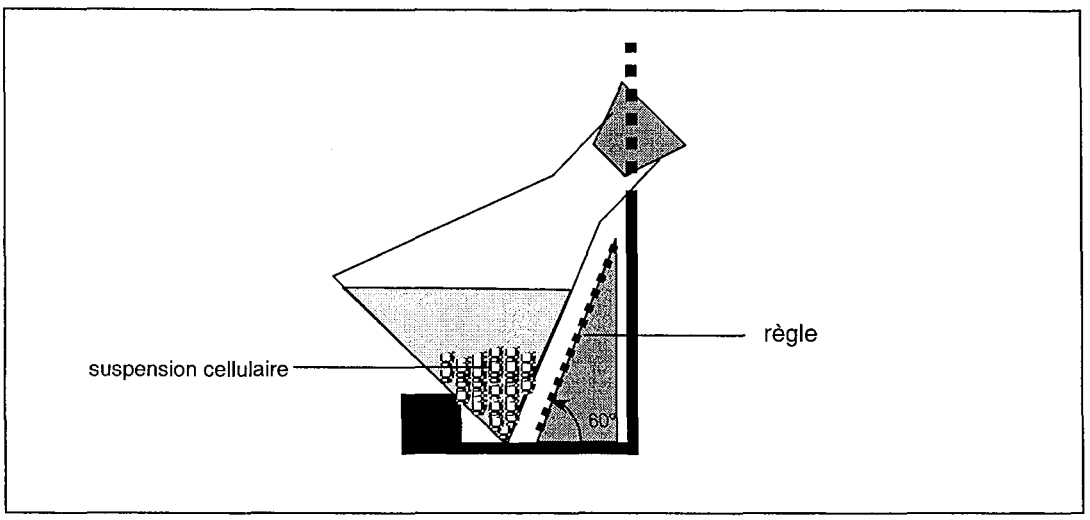
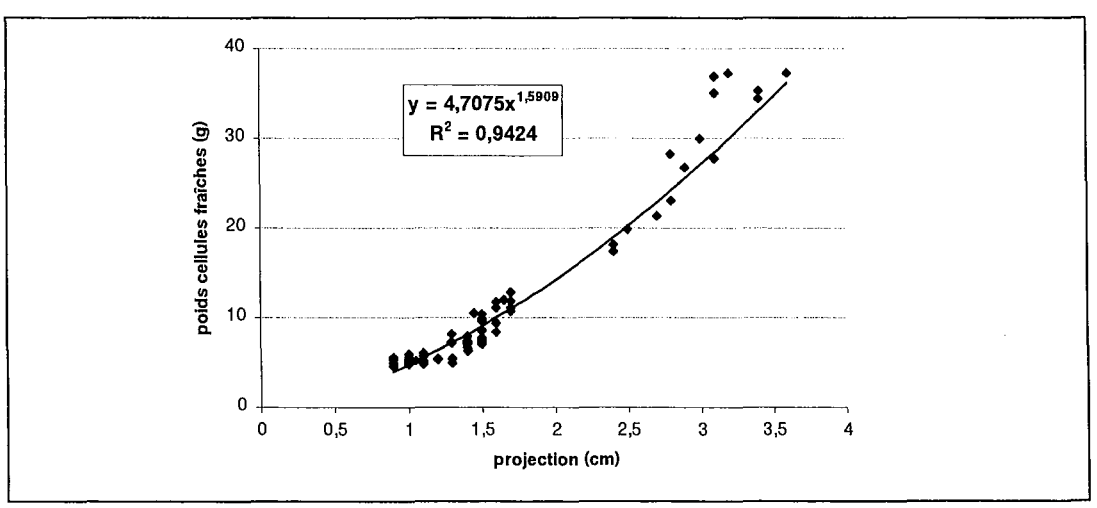


Figure B-7 : Calibration de la méthode de mesure indirecte de la croissance de suspensions cellulaires en flacon Erlemeyer de 250 ml.

Milieu = 75 ml de $B_5(30)D_2$ dans des flacons de 250 ml.



2.3. CROISSANCE

Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer la croissance des suspensions cellulaires en flacon Erlenmeyer.

La première méthode, destructive, nécessite de sacrifier les cellules d'au moins un flacon de culture (plusieurs pour pouvoir évaluer la répétabilité) par point de la courbe. En général, une courbe de croissance est obtenue sur 24 jours, avec un point tous les 3 jours : ceci implique de mettre en culture 27 flacons de culture pour obtenir 3 répétitions par point. Plusieurs facteurs sont mesurés : poids (de matière fraîche et sèche) des cellules, volume de milieu restant, teneur en furocoumarines dans les cellules et dans le milieu.

Cette première méthode nécessite un grand nombre de flacons de culture. Cette lourdeur nous a conduit à mettre en place un protocole de mesure indirecte de la biomasse produite par la suspension cellulaire. Il s'agit faire une estimation de la croissance par une évaluation du volume de cellules dans le flacon de culture même. Le volume est mesuré de façon indirecte, comme le montre la **Figure B-6**, par la projection du ménisque correspondant aux cellules sédimentées dans le flacon Erlenmeyer incliné à 60° (Blom *et al.*, 1992). Afin d'utiliser cette méthode, il faut évaluer la corrélation entre la projection des cellules et le poids de matière fraîche ou de matière sèche de ces cellules et obtenir l'équation de la courbe-étalon, donnant l'équation reliant.

Mise au point d'un système de mesure indirecte de la croissance

La méthode a été calibrée avec des suspensions cellulaires de la souche DEO. Presque 80 mesures ont permis d'obtenir la relation entre la projection en centimètres de ménisque (projection) et le poids de matière fraîche en grammes (PMF) (**Figure B-7**):

$PMF = 4{,}71 \times projection^{1{,}59}$ $(R^2 = 0{,}94)$

Le coefficient de corrélation permet de confirmer que la méthode est acceptable. Cependant, cette méthode est peut applicable pour l'estimation de la production de la matière sèche ($R^2 = 0{,}57$).

La méthode permet d'alléger les protocoles de suivi de biomasse des cultures de suspensions cellulaires. Elle permet de diminuer le nombre de flacon mis en culture et d'augmenter le nombre de répétitions. Des micro-prélèvements de cellules et de milieux permettront de déterminer la production en furocoumarines. Il convient cependant de faire une correction mathématique des volumes des cellules et des volumes de milieux après les prélèvements.

La méthode pose cependant deux principaux problèmes :

- Au fur et à mesure de la culture, le milieu se trouble par des cellules très fines en suspension et des débris cellulaires : ce trouble du milieu limite la visibilité du ménisque des cellules décantées.
- Les suspensions cellulaires ne sont pas agrégées de la même façon : il y a un mélange des cellules individualisées et d'agrégats cellulaires, ou microcals, de tailles très variables. La sédimentation des suspensions cellulaires n'est pas homogène en fonction de la proportion des 2 types d'agrégats. Cet élément apporte une source d'erreur supplémentaire à l'interprétation des données.

Aussi, il conviendra de calibrer à nouveau la méthode si on se trouve face à plusieurs souches ayant des

Planche 5 : Bioréacteur de culture des suspensions cellulaires de *Ruta graveolens*.

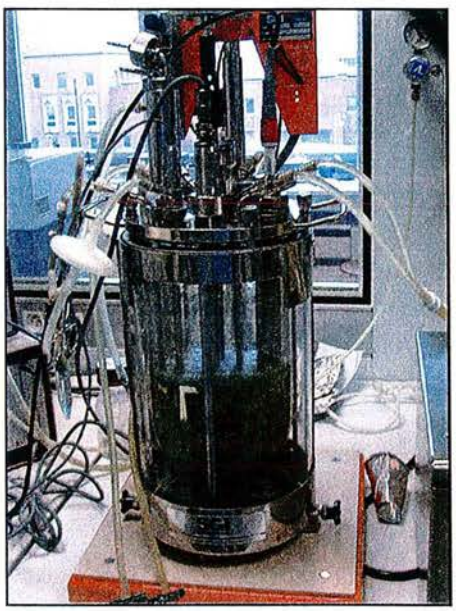


Planche 6 : Culture de *Verticillium dahliae* en milieu liquide (= $B_5(30)D_2$).

$B_5(30)D_2$ = milieu Gamborg B_5, 30 g.L^{-1} saccharose, 2 mg.L^{-1} 2,4D.

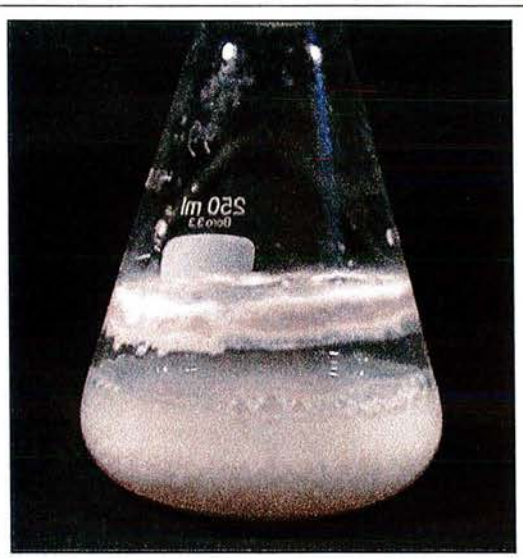
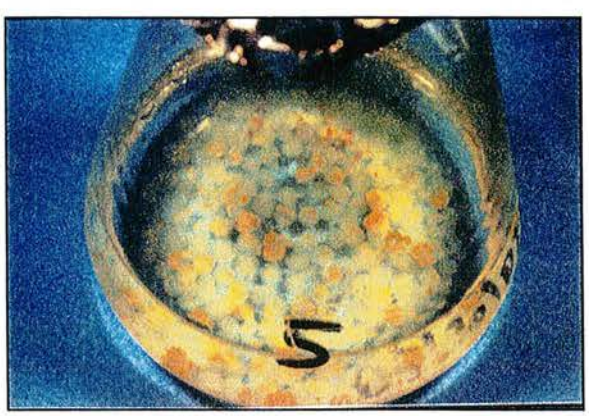


Planche 7 : Cellules de *Ruta graveolens* immobilisées dans des billes d'alginate.



morphologies différentes, par la taille des agrégats cellulaires notamment.

2.4. ELICITATION

Trois expériences d'élicitation ont été réalisées sur des suspensions de *Ruta graveolens*. A chaque fois, l'éliciteur utilisé était *Verticillium dahliae* (**Planche 6**). Les expériences diffèrent pour la durée d'élicitation ainsi que pour la quantité et l'âge de l'éliciteur.

2.4.1. Expérience 1

Préparation de l'agent éliciteur : une souche de *Verticillium dahliae* (brm 1, ATCC n° 44571) a été cultivée sur un milieu PDA[a] gélifié, pendant 6 jours (éliciteur 1 = E_1) et 30 jours (éliciteur 2 = E_2). Après culture, le champignon est lyophilisé 24 heures.

Mise en culture : les agents éliciteurs sont ajoutés avant autoclavage à raison de 10 mg de poudre E_1 ou E_2 pour 100 mL de milieu $B_5(30)D_2$. Sept grammes de cellules de *Ruta graveolens* sont inoculés dans ce milieu éliciteur. La croissance des cellules et leur teneur en furocoumarines ont été déterminées après 7 et 10 jours de culture et comparées à celles de cultures cellulaires témoins (sans éliciteur).

2.4.2. Expérience 2

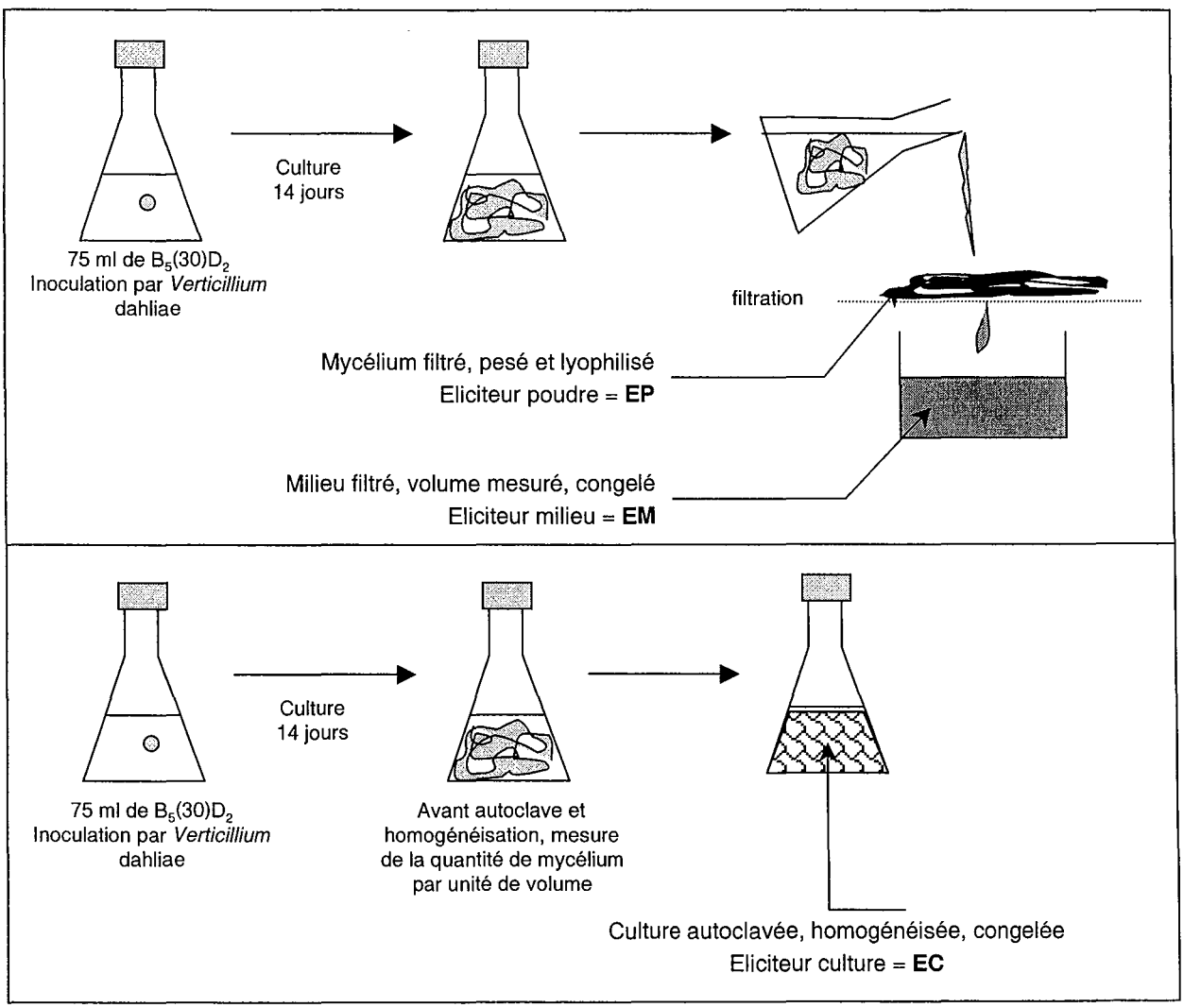
Préparation de l'agent éliciteur : trois types d'agent éliciteur ont été initiés à partir d'inocula de *Verticillium dahliae* maintenus en boite de Pétri sur milieu PDA. Les inocula de *V. dahliae* ont été mis en flacon Erlenmeyer de 250 mL, contenant 75 mL de milieu B_5 + 30mg.L^{-1} de saccharose. Les flacons de culture sont placés en phytotron, sur un agitateur rotatif. L'agent éliciteur $\mathbf{E_{2j}}$ a été récolté après 2 jours de culture, $\mathbf{E_{6j}}$ après 6 jours et $\mathbf{E_{13j}}$ après 13 jours. Après récolte, les cultures de *Verticillium dahliae* sont lyophilisées.

Mise en culture : le protocole est résumé dans le **Tableau B-6** (page suivante). Après 15 jours de culture en phytotron, à 25°C sur un agitateur rotatif (100 rpm), les cellules sont récoltées, ainsi que le milieu. Différents paramètres sont déterminés : biomasses fraîches et sèches, teneurs en furocoumarines des cellules, volumes et concentrations en furocoumarines des milieux.

[a] *PDA déshydraté, fourni par DIFCO Laboratories (Detroit, USA) : 39 g dans 1 L*

Figure B-8 : Obtention des cultures de *Verticillium dahliae*, pour l'élicitation de cultures cellulaires de *Ruta graveolens*.

EP, EM *et* ***EC*** *seront ajoutés au milieu de culture cellulaire neuf,* ***avant autoclave.*** *$B_5(30)D_2$ = milieu Gamborg B_5, 30 g.L^{-1} saccharose, 2 mg.L^{-1} 2,4D.*



Milieu	75 mL de milieu $B_5(30)D_2$ par flacon									
Agent éliciteur **Age**	E_{2j} 2 jours			E_{6j} 6 jours			E_{13j} 13 jours			**témoin**
Quantité d'éliciteur	*3 mg* *0,004%*	*6 mg* *0,008%*	*9 mg* *0,012%*	*3 mg* *0,004%*	*6 mg* *0,008%*	*9 mg* *0,012%*	*3 mg* *0,004%*	*6 mg* *0,008%*	*9 mg* *0,012%*	*0 mg* *0%*
Nb de répétitions	4 flacons par traitement (40 flacons au total)									
autoclavage										
Inoculum de cellules	4g de cellules fraîches par flacon, souche DEO									
Récolte après 15 jours de culture										

Tableau B- 6 : Mise en culture de cellules de *Ruta graveolens* élicitées par *Verticillium dahliae* autoclavé. Expérience 2

$B_5(30)D_2$, milieu Gamborg B_5 supplémenté de 30 g.L^{-1} de saccharose et 2 mg.L^{-1} de 2,4D.

E_{2j}, Verticillium dahliae cultivé pendant 2 jours en milieu liquide, E_{6j} pendant 6 jours, E_{13j} pendant 13 jours.

DEO, lignée cellulaire de Ruta graveolens

x % d'éliciteur = x g de poudre pour 100 ml de milieu

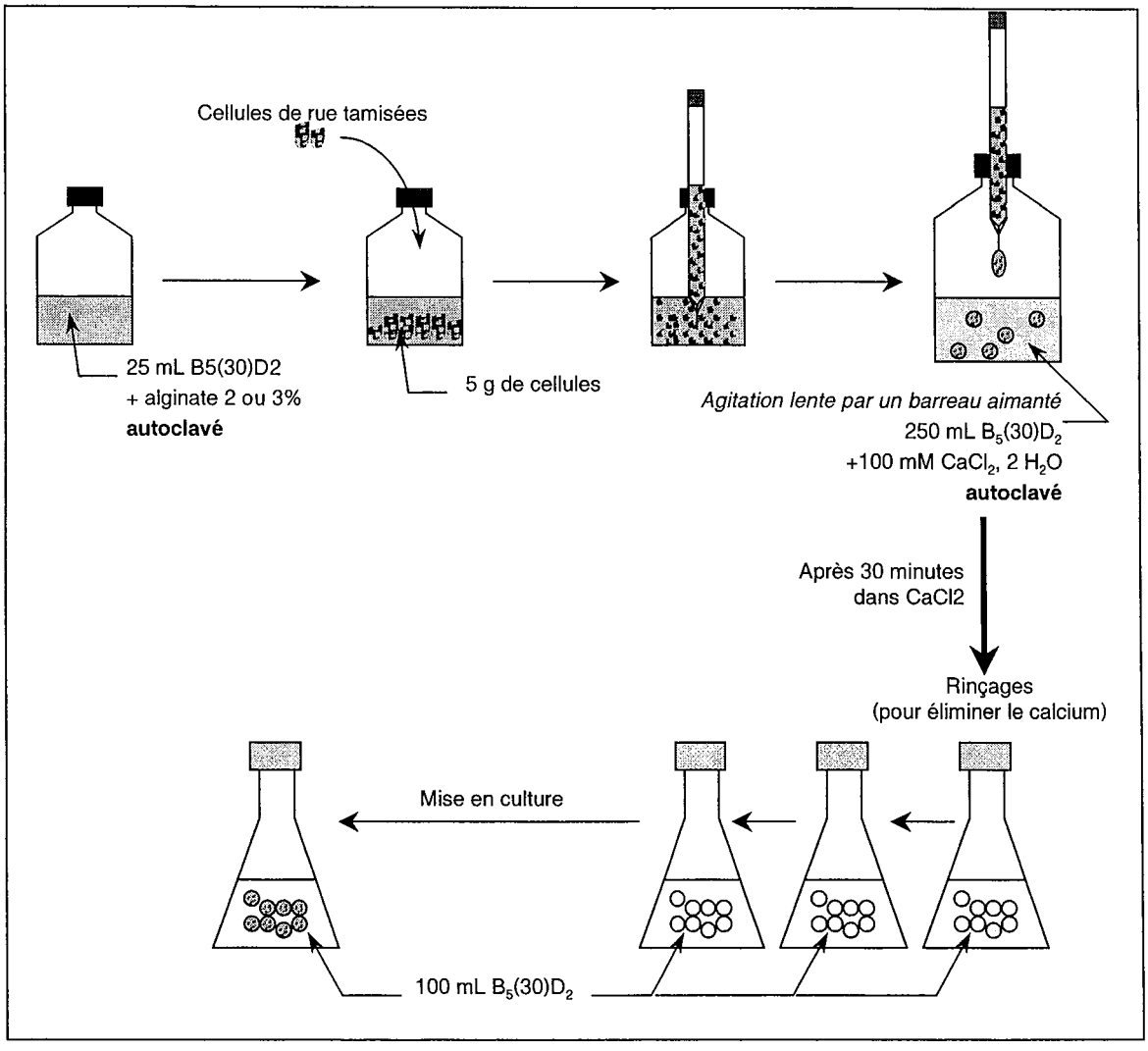
2.4.3. Expérience 3

Préparation de l'agent éliciteur : 3 types d'éliciteur, **EP** (mycélium de *V. dahliae* cultivé en milieu liquide), **EM** (milieu filtré de *V. dahliae* cultivé en milieu liquide), **EC** (mycélium et milieu homogénéisés de *V. dahliae* cultivé en milieu liquide) ont servi à traiter les cultures de cellules de Rue. Leur obtention est schématisée dans la **Figure B-8**.

Mise en culture : le protocole est résumé dans le **Tableau B-7**. Après 24h, 48h, 72h, 6j ou 14j de culture en phytotron, à 25°C sur un agitateur rotatif (100 rpm), les cellules sont récoltées, ainsi que le milieu. Différents paramètres sont déterminés : matières fraîches et sèches, teneurs en furocoumarines des cellules ; volumes, concentrations en furocoumarines des milieux. De plus, les projections à 60° du ménisque, correspondant aux cellules décantées dans les flacons (**Figure B-6**), ont été suivies à 24h, 72h, 6j, 8j, 10j, 14j pour obtenir une estimation de la croissance.

Figure B-9 : Immobilisation de cellules végétales dans des billes d'alginate.

$B_5(30)D_2$ = milieu Gamborg B_5, 30 $g.L^{-1}$ saccharose, 2 $mg.L^{-1}$ 2,4D.



Milieu	75 mL de milieu $B_5(30)D_2$ par flacon				
Agent éliciteur	EC	EM	EP		témoin
Quantité d'éliciteur	*5,6 mL* *0,1%*	*6,4 mL* *0,1%*	*7,5mg* *0,01%*	*75mg* *0,1%*	*0 mg* *0%*
Nb de répétitions	3 flacons par traitement (48 au total)				
autoclavage					
Inoculum de cellules	5g de cellules fraîches par flacon, souche DEO				
Récolte	48h 14j	48h 14j	48h 14j	24h 48h 72h 6j 14j	24h 48h 72h 6j 14j

Tableau B- 7 : Mise en culture de cellules de *Ruta graveolens* élicitées par différentes cultures liquides de *Verticillium dahliae*. Expérience 3

$B_5(30)D_2$, milieu Gamborg B_5 supplémenté de 30 g.L^{-1} de saccharose et 2 mg.L^{-1} de 2,4D.

***EC**, éliciteur culture (mycélium et milieu homogénéisés de la culture de V. dahliae) ; **EM**, éliciteur milieu (milieu filtré de la culture de V. dahliae) ; **EP**, éliciteur poudre (mycélium lyophilisé de la culture de V. dahliae). x % = x g d'équivalent poudre pour 100 ml de milieu.*

souche DEO, lignée cellulaire de Ruta graveolens

2.5. IMMOBILISATION

Les cellules de *Ruta graveolens* (souche DEO) ont été immobilisées dans des billes d'alginate. Le procédé d'immobilisation est indiqué dans la **Figure B-9**. Deux types d'alginate ont été utilisés, l'alginate SIGMA (extrait de *Macrocystis pyrifera*, fourni par Sigma chemicals) et l'alginate SG 300 (satialgine SG 300, fourni par Sanofi Bio-industries). La solution initiale d'alginate est concentrée à 2% ou 3% (2 g ou 3 g pour 100 mL de solution). Les différentes billes contenant les cellules végétales ont été cultivées pendant 25, 66 et 75 jours (**Planche 7**, p 43). Au total, 14 modalités ont été testées (**Tableau B-8**).

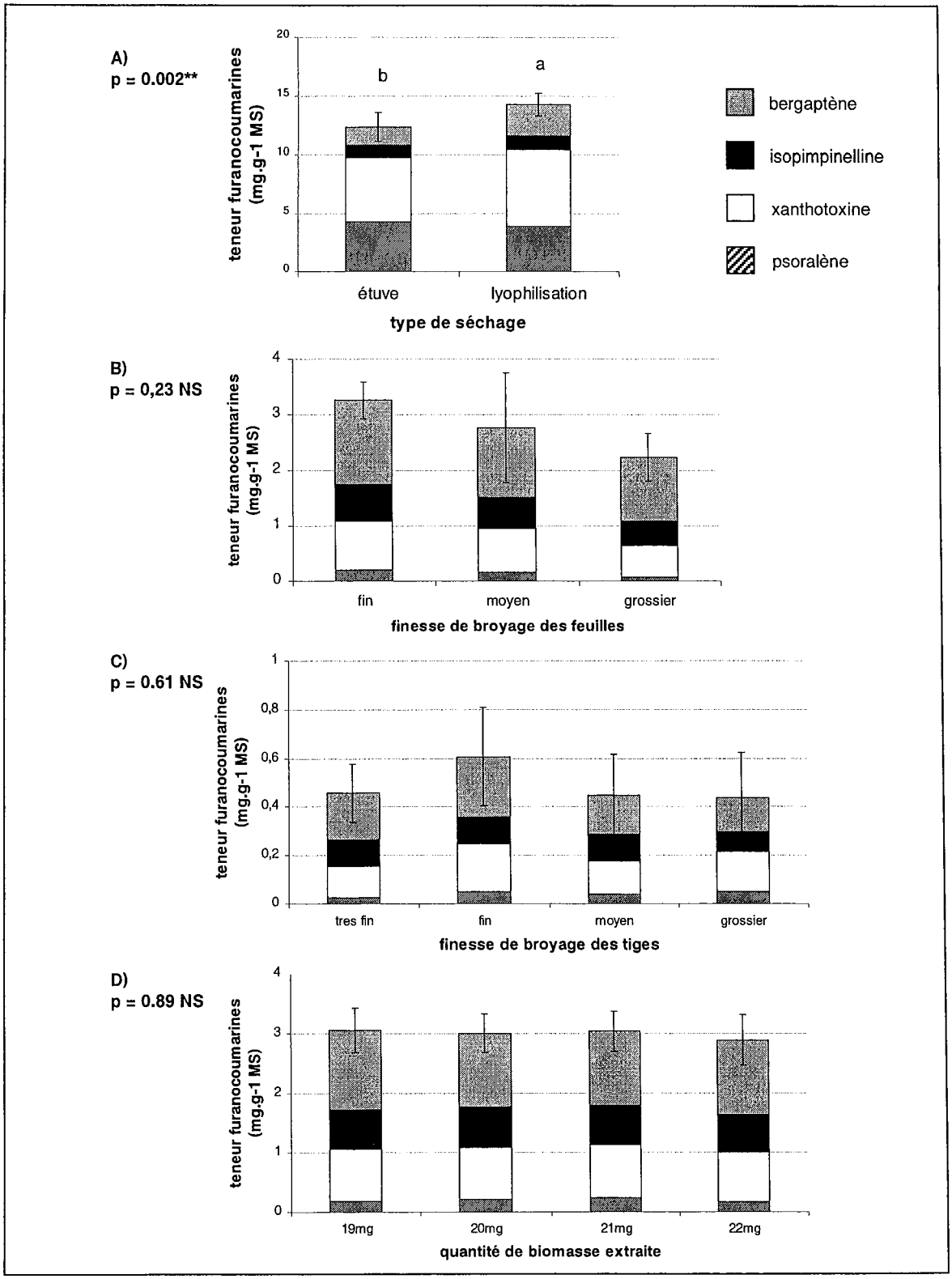
Cellules immobilisées	Durée de culture (jours)	Type d'alginate	% d'alginate	Ajout de calcium dans le milieu de culture (mM)
IC1	25	Sg300	2	0
IC2	25	Sigma	2	0
IC3	66	Sigma	2	0
IC4	66	Sg300	2	0
IC5	66	Sigma	2	3
IC6	75	Sigma	2	0
IC7	66	Sg300	3	3
IC8	25	Sg300	2	3
IC9	66	Sg300	3	0
IC10	66	Sigma	3	3
IC11	25	Sigma	2	3
IC12	66	Sigma	3	0
IC13	75	Sg300	2	0
IC14	66	Sg300	2	3

Tableau B- 8 : Cellules immobilisées préparées à partir de cellules de *Ruta graveolens*

Après culture, les billes sont en partie délitées (la moitié de chaque flacon) dans une solution de citrate disodique titrée à 50 mM. Les cellules sont récupérées sur papier filtre afin d'obtenir le pourcentage de cellules (matières fraîche et sèche) contenu dans les billes. L'autre partie est lyophilisée puis réservée pour le dosage des furocoumarines. Les furocoumarines sont aussi dosées dans le milieu.

Figure B-10 : Résultats des expérimentations pour évaluer les effets du séchage (A), de la finesse du broyage de feuilles (B) ou de tiges (C), de la quantité de biomasse extraite (D).

*Effet du facteur testé : NS non significatif (p>0.05); * significatif (p<0.05; ** hautement significatif (p<0.01); ***très hautement significatif (p<0.001). Barres d'erreurs = ±écart-type.*



3. DOSAGE DES FUROCOUMARINES

3.1. DESHYDRATATION DU MATERIEL VEGETAL

Deux modes de déshydratation ont été utilisés au cours de l'étude : le **séchage en étuve** à 70°C et la **lyophilisation**. Les échantillons volumineux (c'est-à-dire les différents compartiments des plantes récoltées au champ) ont été séchés alors que les échantillons de plus petites tailles (prélèvements de feuilles, échantillons de cultures *in vitro*) ont été lyophilisés. La lyophilisation permet une stabilisation des échantillons puisque, dès leur prélèvement, ceux-ci sont congelés. Nous avons voulu savoir si les deux modes de déshydratation entraînaient des modifications des teneurs en furocoumarines.

Comparaison des modes de séchage

*Le séchage à l'étuve et la lyophilisation ont été comparés sur les teneurs en furocoumarines de feuilles. Neuf répétitions par traitements ont été testées. L'effet du mode de séchage est significatif (**Figure B-10A**) sur la teneur en psoralène (0,027*), en xanthotoxine (0,000***) et en bergaptène (0,000***) et sur la somme des 4 furocoumarines (0,002**). Cependant, l'effet n'est pas significatif sur la teneur en isopimpinelline (0,17 NS). Un échantillon séché par lyophilisation contient 15% de furocoumarines en plus (somme des 4 furocoumarines) que lorsqu'il est séché à l'étuve. La molécule présentant la plus grande variation est le bergaptène, puisqu'un échantillon lyophilisé contient 70% en plus de cette furocoumarine, par rapport au même tissu passé à l'étuve.*

3.2. EXTRACTION DES FUROCOUMARINES

Après lyophilisation ou séchage, les tissus végétaux (ou les billes contenant les cellules) sont broyés : broyeur à billes pour les petits échantillons et broyeur (Retsch Gmbh, type SK1, Haan, Allemagne) pour les différents compartiments d'une plante cultivée au champ. Comme les tissus ont une tendresse variable, il est plus ou moins facile d'obtenir un broyage fin. Il était donc nécessaire de savoir si la grosseur du broyat pouvait intervenir sur les teneurs en furocoumarines extraites.

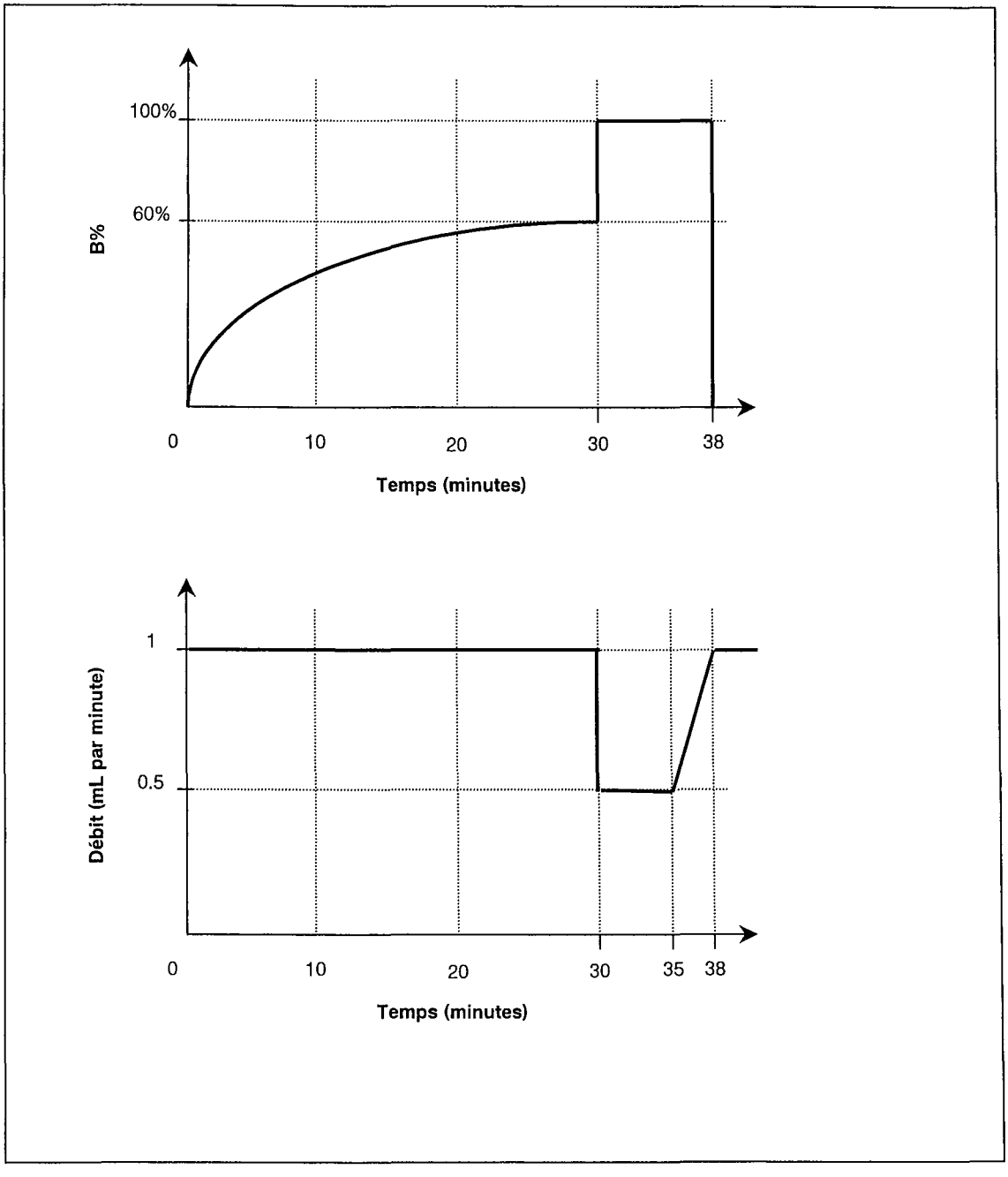
Effet de la finesse des broyages sur l'extraction de furocoumarines

*L'effet de la finesse du broyage (très fin, fin, moyen, grossier) a été évalué sur le compartiment feuille (tissus tendres) et sur le compartiment tige (tissus plus lignifiés) de plantes récoltées au champ. Cinq répétitions par traitement ont été établies. L'effet du broyage n'est pas significatif, sur aucune des 4 furocoumarines (**Figure B-10B et B-9C**). Cependant, sur les feuilles, l'efficacité d'extraction a tendance à augmenter avec la finesse du broyage.*

Pour l'analyse HPLC (High Performance Liquid Chromatography), 20 mg de poudre sèche doivent être mélangés à 1,2 mL de solvant d'extraction. Il est extrêmement long de peser précisément 20 mg pour chaque échantillon. Nous avons donc voulu savoir si, en pesant une gamme entre 19 et 22 mg de poudre (en notant précisément la quantité), cette quantité avait une influence sur la qualité de l'extraction, un trop gros volume de poudre pouvant empêcher le

Figure B-11 : Gradient de solvants de la phase mobile et débit, utilisés pour la séparation des furocoumarines par HPLC.

B% = pourcentage de la phase B (méthanol 50%-acétonitrile 50%) par rapport à la phase A (Eau).



liquide d'extraction d'atteindre tous les tissus.

Effet de la quantité de poudre végétale, extraite dans un même volume de solvant, sur la quantité de furocoumarines

*Quatre extractions ont été comparées : 19 mg, 20 mg, 21 mg et 22 mg extraits dans 1,2 mL de solvant d'extraction (éthanol 50%). Trois répétitions par traitement ont été mises en place. Dans la fourchette que nous nous sommes fixée (20,5 ± 1,5 mg), la quantité de biomasse extraite n'a pas d'effet significatif sur aucune des 4 furocoumarines (**Figure B-10D**).*

En conséquence de cette expérience préliminaire, et pour chaque dosage de furocoumarines, X mg (19 < X < 22 mg) sont pesés dans un tube Eppendorf de 1,5 mL (et notés précisément). On fait agir 1,2 mL de solvant pendant 30 minutes, en remuant une fois au début de l'extraction et une fois à 15 minutes du début de l'extraction. Puis le surnageant, obtenu après 8 minutes de centrifugation à 12 000 rpm, est filtré à 0,45 µm (filtres acétate de cellulose 0,45 µm Millipore®).

3.3. DOSAGE DES FUROCOUMARINES

Les furocoumarines sont dosées par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

Matériel

La séparation et la quantification des furocoumarines ont été obtenues sur une chaîne HLPC Beckman. Cette chaîne HPLC est constituée : d'un injecteur automatique (System Gold® Autosampler 508[a]), d'un système de pompes (System Gold® Programmable Solvent Module 126[a]) et d'un détecteur à barrettes de diode (System Gold® Diode Array Detector Module 168 [a]). Ces différents éléments sont pilotés par un ordinateur équipé du logiciel Beckman "system Gold" et "system Gold 32 Karats".

La phase mobile est un mélange du solvant A (eau ultrapure) et du solvant B (solvant organique méthanol 50%-acétonitrile 50%). Le gradient des solvants et le débit de la phase mobile sont indiqués dans la **Figure B-11**.

La phase stationnaire est une colonne de type phase inverse Purospher LiChroCART® 125-4 (MERCK, Darmstadt, Allemagne), protégée par une pré-colonne Purospher LiChroCART® 4-4 (MERCK, Darmstadt, Allemagne).

Dans ces conditions de séparation, les 4 furocoumarines sont éluées entre 15 et 20 minutes dans l'ordre suivant : psoralène, xanthotoxine, isopimpinelline, bergaptène.

Afin de déterminer les concentrations en furocoumarines des solutions injectées, il faut calculer un facteur de réponse pour chacune des molécules (**Tableau B-9**). Les solutions-étalon pour le calcul de ces facteurs sont préparées à partir de molécules du commerce (Extrasynthèse, Lyon, France). De plus, des témoins contenant les 4 furocoumarines sont injectées tous les 10 échantillons pour suivre l'évolution du système chromatographique (colonne, lampe UV). Le seuil de sensibilité de la méthode est fixé à 50 ng.mL^{-1} de solution injectée.

[a] *BECKMAN-COULTER*

Avant d'être injectés dans la colonne, les surnageants ou les milieux sont filtrés et sont dilués à 50% dans de l'eau ultrapure. La filtration protège la colonne des particules et la dilution permet d'obtenir une meilleure résolution (pics plus fins) et une meilleure symétrie des pics.

	a = FR = surface pic / concentration solution	Coefficient de corrélation r^2 de la régression y = **a**.x
Psoralène	259718	0,9996
Xanthotoxine	354444	0,9977
Isopimpinelline	169173	0,9991
Bergaptène	197330	0,9749

Tableau B- 9 : Calcul des facteurs de réponses des 4 furocoumarines (domaine de mesure = 1 - 50 mg.L^{-1})

FR = facteur de réponse

Solution exprimée en mg/L.

4. TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES

Deux types de tests ont été utilisés dans ce mémoire pour analyser les données : l'analyse de variance et l'analyse en composante principale.

4.1. ANALYSE DE LA VARIANCE ET COMPARAISON DE MOYENNES

Cette méthode est utilisée pour étudier l'effet de plusieurs facteurs sur des variables quantitatives. Nous avons ainsi utilisé l'analyse de variance comme un outil d'aide à la décision dans le cas où nous souhaitons savoir si les variables mesurées sont modifiées par les traitements que nous avons appliqués.

Pratiquement, nous avons considéré qu'un traitement (ou facteur) a un effet si la probabilité p, résultat du test de Fisher-Snédécor, est inférieure à 5%. L'effet peut être significatif ($p<0,05$), hautement significatif ($p<0,01$), très hautement significatif ($p<0,001$). Lorsque la probabilité p est supérieure à 5%, l'effet du facteur est considéré comme non significatif (il n'y a pas d'effet au risque de 5%).

Lorsque l'effet du facteur est significatif, il s'agit ensuite de déterminer quels sont les traitements dont les moyennes sont différentes. Nous pratiquons alors des tests Post-Hoc (Test de Newman-Keuls).

Deux logiciels nous ont permis de réaliser ces tests : StatboxPro sur Excel (Grimmer Logiciels, Paris, France), pour les analyses de variance pour lesquels tous les traitements ont le même nombre de répétitions, et Statistica (Statsoft, France) pour les échantillons dont le nombre de répétitions n'est pas homogène.

4.2. ANALYSE EN COMPOSANTES PRINCIPALES

Cette analyse a été utilisée pour traiter les résultats de l'immobilisation de cellules végétales (teneurs en furocoumarines dans les cellules et concentrations dans les milieux) afin de connaître le comportement de plusieurs individus n'ayant pas subi les mêmes modalités. Ce test a été réalisé grâce au logiciel Statbox (Grimmer Logiciels, Paris, France).

5. MICROIMAGERIE RMN

Le phénomène physique de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) fut découvert en 1946 par Bloch (Bloch *et al.*, 1946) et Purcell (Purcell *et al.*, 1946). Jusque dans les années 70, la RMN a surtout été utilisée en chimie analytique (spectroscopie RMN). Depuis la fin des années 70, elle est devenue un outil dans la recherche sur les processus biochimiques *in vitro* et *in vivo*, avec des méthodes combinant la RMN et l'imagerie qui ont permis l'observation des changements morphologiques dans des tissus vivants.

Les résolutions obtenues (au maximum 1 mm^3) par l'imagerie ont limité les domaines d'applications de cette technique. Une nouvelle dimension est aujourd'hui apportée par la plus récente application de la RMN, la microimagerie RMN, tant au niveau de la résolution spatiale atteignable qu'au niveau de l'accès à l'information sur le plan moléculaire. La microimagerie RMN a été rendue possible grâce à l'obtention d'aimants ayant des champs magnétiques de force élevée et grâce à l'obtention de forts gradients. Des résolutions en voxel (volumes) allant jusqu'à 10^{-5} mm^3 peuvent ainsi être obtenues (Kuhn, 1990; Pope *et al.*, 1993; MacFall et Johnson, 1994).

5.1. PRINCIPES DE LA MICROIMAGERIE RMN

Lors d'une expérimentation RMN, l'objet à analyser est placé dans un champ magnétique statique homogène B_0. Pour un échantillon ayant des noyaux identiques, dans un environnement identique (exemple: les protons dans l'eau), tous les spins reçoivent le même champ magnétique B_0, et ont donc la même fréquence de résonance ω ($\omega=\gamma B_0$). En revanche, des noyaux reçoivent plusieurs champs magnétiques différents lorsqu'ils sont situés dans des environnements magnétiques différents (exemple : noyaux recevant l'influence de diverses liaisons chimiques) : les signaux divers correspondent aux différents déplacements chimiques.

Dans un tel champ magnétique statique B_0, la localisation spatiale des noyaux ne peut être déterminée. Le moyen pour obtenir une résolution spatiale fut découvert par Damadian (1971) et Lauterbur (1973). Il faut superposer au champ B_0, un champ magnétique $G_{r,t}$, dépendant du temps et dépendant linéairement de la position. Le champ magnétique total imposé est alors :

$$B_{r,t} = B_0 + G_{r,t}$$

La fréquence de résonance ω a ainsi une relation linéaire avec la position. De plus, la gamme des fréquences $\Delta\omega$, dont dépend la résolution spatiale, est directement proportionnelle à la force du gradient ($|G|$) et aux dimensions de l'objet ($\Delta r = (\Delta x, \Delta y, \Delta z)$):

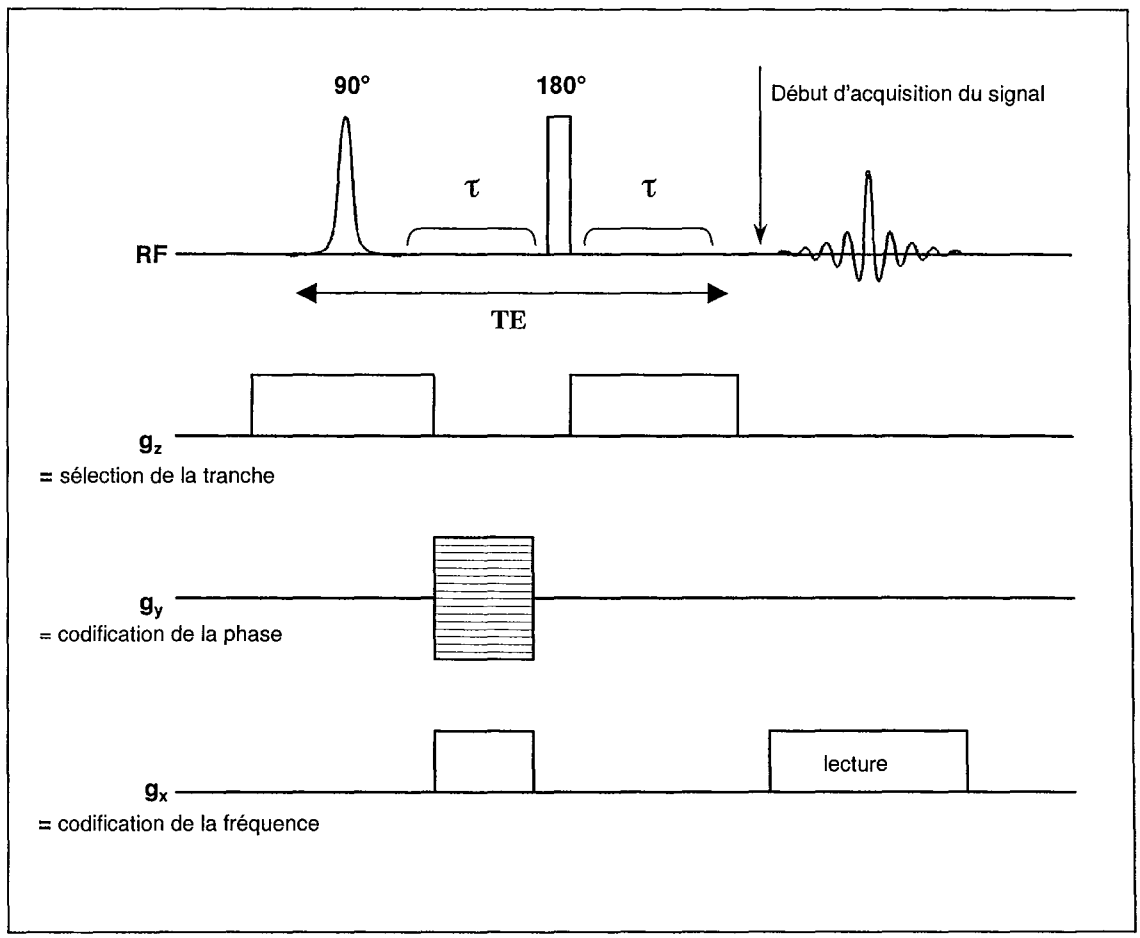
$$\Delta\omega = \gamma \cdot |G| \cdot \Delta r$$

5.2. METHODE EXPERIMENTALE DE MICROSCOPIE RMN

En imagerie RMN 2D, une tranche de l'objet est sélectionnée en appliquant une impulsion radiofréquence (RF) en présence d'un gradient magnétique constant. L'impulsion RF a une largeur de bande dépendant de sa durée et de sa forme. L'épaisseur de la coupe sélectionnée est déterminée par la largeur de bande de l'impulsion et la force du gradient magnétique. Par conséquent, une bonne résolution spatiale nécessite une bande d'impulsion très étroite ou

Figure B-12 : Séquence d'écho de spin utilisée pour obtenir les microimages RMN.

TE = temps d'écho ; RF = radiofréquence appliquée ; g_x et g_y = codification de la position spatiale ; gz = sélection de la tranche dans l'échantillon à analyser.



un fort gradient.

Un grand nombre de séquences d'impulsion différentes existe, permettant soit des processus d'acquisition d'images très rapide soit un meilleur contraste, grâce aux temps de relaxation spin-spin et spin-réseau. Parmi les nombreuses méthodes disponibles, la méthode d'écho de spin, que nous avons utilisée est une des plus couramment utilisées.

Méthode de spin-echo

Elle utilise une séquence d'impulsion RF, 90°-τ-180°-τ (**Figure B-12**). La composante g_z du gradient magnétique est utilisée pour la sélection de la tranche dans l'échantillon analysé. Les composantes g_x et g_y permettent de codifier la position spatiale dans l'image sélectionnée. L'impulsion 180° détermine la position de tranche par sa fréquence et l'épaisseur de la tranche par sa largeur.

Les méthodes d'écho de spin, ou spin-echo, correspondent aux séquences qui contiennent une impulsion de 180°. Cette impulsion de refocalisation permet d'avoir une méthode peu sensible aux défauts du champ magnétique statique B_0. Les images ont alors un bon rapport signal/bruit et reproduisent bien le profil de l'objet.

Quand une séquence 90°-180° est utilisée, la magnétisation doit être complètement relaxée avant chaque répétition de l'expérience. En pratique, il faut au moins un délai TR (temps de relaxation) entre l'acquisition de la donnée et la prochaine excitation (et de préférence 3 à 5 TR). Ces délais sont dans beaucoup de cas de l'ordre de quelques secondes et conduisent à des temps d'imaging relativement longs.

5.3. APPLICATIONS POSSIBLES DE LA MICROSCOPIE RMN

La faible sensibilité de la microscopie RMN signifie qu'il sera encore difficile d'obtenir, dans un futur proche, des résolutions comparables aux microscopes optiques (0,5 μm). Sur ce critère, la microscopie RMN est peu compétitive face au microscope optique, et son prix est aussi très élevé. Les applications de la microscopie RMN se situent dans d'autres domaines, où les capacités spéciales de cet outil peuvent être utilisées :

- recherches non destructives, avec des expérimentations sur des échelles de temps plus longues. Ceci inclut l'observation du déroulement d'une maladie sur des modèles animaux et la diffusion de fluides dans un polymère,
- cartographie des densités de spin qui permet une estimation quantitative de concentrations,
- cartographie des déplacements chimiques qui conduit à la détermination de la distribution spatiale de diverses substances dans un échantillon,
- cartographie des temps de relaxation qui donne le moyen de suivre des processus dynamiques.

Vu les applications de la microimagerie RMN en biomédecine, cette technique trouve aussi de nombreuses applications en biologie. On peut par exemple déterminer le degré de liaisons des protons (protons "libres" de l'eau ou protons liés aux molécules organiques) et la distribution de certains constituants des tissus tels que la cellulose, les sucres, les lipides (particulièrement intéressant dans les graines, organes de réserves), les tannins, la lignine ou les ions paramagnétiques. Il est aussi possible de suivre la diffusion d'eau dans un organe végétal ou bien les changements de teneur en eau. Grâce à l'imaging sur ^{17}O, on peut également suivre le transport de l'eau dans une plante.

La microscopie RMN est encore dans ses premiers stades de mise au point, au niveau de l'appareillage et des méthodes. L'utilisation par exemple de microrésonateurs rendra possible l'observation des cellules seules ou des petits groupes cellulaires, permettant des études métaboliques.

5.4. MATERIEL UTILISE DANS NOTRE RECHERCHE

Les microimages RMN ont été acquises avec un spectromètre Brucker AM 300 WB de l'hôpital de Trieste, équipé d'un accessoire standard de microimagerie (programme informatique CamRes). L'épaisseur de coupe pratiquée était de 350 µm, avec une séquence de type spin-écho, un temps de relaxation (TR) de 1,3 s et un temps d'écho (TE) de 15 ms. Les résolutions obtenues étaient de 35 µM.

C. RESULTATS ET INTERPRETATIONS

C. RESULTATS ET INTERPRETATIONS

Ce chapitre rassemble les résultats majeurs que nous avons obtenus sur l'étude de la production de furocoumarines par la Rue. Il a été divisé en 3 parties. Les 2 premières comportent des résultats obtenus à partir de plantes entières et la troisième partie présente une série d'expériences sur la Rue cultivée *in vitro*.

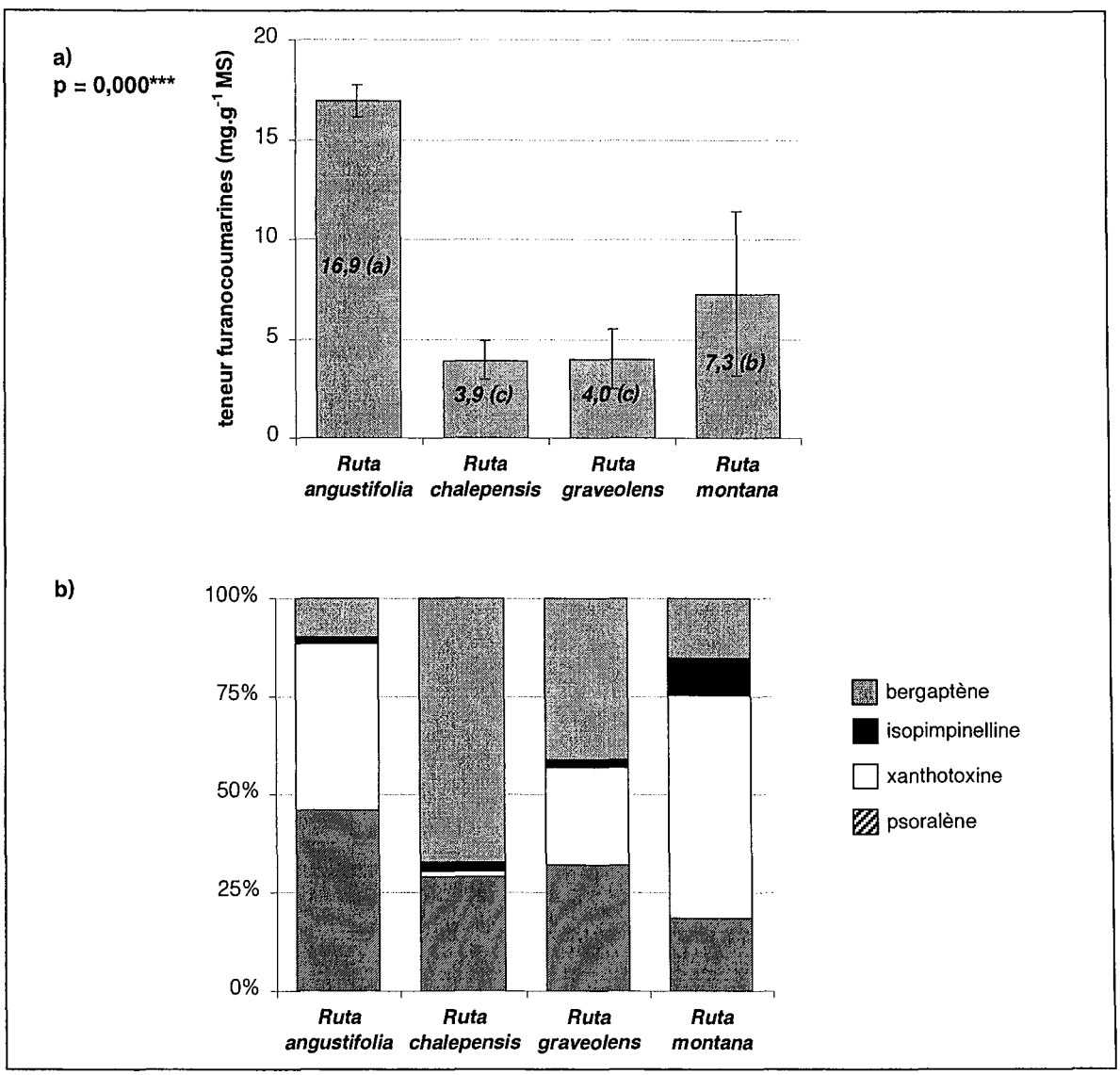
Dans la première partie de ce chapitre, nous avons caractérisé la production de furocoumarines par des plantes du genre *Ruta*. Des plantes de 4 espèces ont été cultivées afin de déterminer leur teneur en furocoumarines. Ces résultats nous ont conduit à une des 4 espèces pour laquelle nous avons évalué plus précisément la variabilité de la production en furocoumarines. En outre, plusieurs plantes de cette espèce ont été découpées et disséquées afin de déterminer la répartition des furocoumarines (en terme de teneur et de quantité) dans la plante, et ceci en fonction du stade de développement.

La deuxième partie présente les résultats des essais au champ ayant pour objectif l'évaluation des effets de pratiques culturales telles que la fertilisation azotée, la densité de peuplement ou les coupes successives des plantes, sur le rendement en furocoumarines. Ces effets de la densité et des coupes successives des plantes ont été suivis sur 3 années de récolte.

Dans la troisième partie, sont présentés les résultats obtenus à partir de suspensions cellulaires de *Ruta graveolens*. Plusieurs suspensions cellulaires ont été initiées afin d'évaluer la variabilité de la production en furocoumarines. La production de matière fraîche, ou sèche, et la production de furocoumarines ont été suivies dans 2 systèmes de culture : en flacon de 250 mL et en bioréacteur de 2,5 L. Enfin, deux traitements ont été appliqués sur les suspensions cellulaires afin de connaître leurs effets sur la production intracellulaire et extracellulaire en furocoumarines : l'élicitation biotique et l'immobilisation des cellules dans des billes d'alginate.

Figure C-1 : Teneur en furocoumarines (a) et profil des 4 furocoumarines (b) dans les feuilles de 4 espèces du genre *Ruta*.

Plantes cultivées au champ (La Bouzule). Barres d'erreurs = ±écart-type.



1. ETUDE DE LA PRODUCTION DE FUROCOUMARINES CHEZ LA RUE (*RUTA*)

Le premier objectif de cette partie est de caractériser la production de furocoumarines chez des plantes du genre *Ruta*. La variabilité de la production de furocoumarines a été évaluée chez plusieurs espèces et détaillée pour l'espèce présentant les caractéristiques les plus intéressantes. Le second objectif est d'appréhender la répartition des furocoumarines au sein de la plante. Pour cela, nous avons étudié la production des furocoumarines suivant les organes et les stades phénologiques de la plante.

1.1. VARIABILITE DE LA PRODUCTION DE FUROCOUMARINES CHEZ LA RUE

1.1.1. Variabilité interspécifique de la production de furocoumarines au sein du genre *Ruta*

Nous avons comparé 4 espèces du genre *Ruta* (*Ruta angustifolia*, *Ruta chalepensis*, *Ruta graveolens* et *Ruta montana*) pour leur capacité à produire les 4 furocoumarines étudiées (**Planche 8**, p 57). Des feuilles ont été prélevées sur des plantes au stade végétatif et leur teneur en furocoumarines a été analysée.

Les plantes ont produit de 4 à 17 $mg.g^{-1}$ MS de furocoumarines, selon l'espèce considérée (**Figure C-1a**). Les plus fortes teneurs en furocoumarines ont été détectées chez *Ruta angustifolia* (17 $mg.g^{-1}$ MS) et ces teneurs sont significativement supérieures à celles mesurées chez les 3 autres espèces. L'espèce *Ruta montana* (7 $mg.g^{-1}$ MS) a une teneur intermédiaire, supérieure à celle de *Ruta graveolens* et *Ruta chalepensis* (4 $mg.g^{-1}$ MS chacune).

Ruta angustifolia contient le plus de psoralène et de xanthotoxine. En revanche, les plus fortes teneurs en isopimpinelline ont été mesurées dans les feuilles de *Ruta montana* et les plus fortes teneurs en bergaptène ont été détectées dans les feuilles de *Ruta chalepensis* (**Tableau C-1**).

Espèces	mg.g^{-1} MS de furocoumarines (*écart-types*)			
	Psoralène	Xanthotoxine	Isopimpinelline	Bergaptène
Ruta angustifolia	**7,8** *(0,2)*	**7,2** *(0,5)*	**0,3** *(0,0)*	**1,7** (0,0)
Ruta chalepensis	**1,1** *(0,8)*	**0,1** *(0,0)*	**0,1** *(0,2)*	**2,6** *(1,1)*
Ruta graveolens	**1,3** *(0,7)*	**1,0** *(0,6)*	**0,1** *(0,1)*	**1,6** *(0,5)*
Ruta montana	**1,4** *(1,4)*	**4,1** *(2,2)*	**0,7** *(0,3)*	**1,1** *(0,5)*

Tableau C- 1 : Teneurs en psoralène, xanthotoxine, isopimpinelline et bergaptène mesurées dans les feuilles chez 4 espèces du genre *Ruta*

R. angustifolia (2 plantes), R. chalepensis (6 plantes), R. graveolens (19 plantes), R. montana (3 plantes). Plantes cultivées au champ en 1999 à la ferme expérimentale de la Bouzule (Champenoux, France).

Planche 8 : Quatre espèces du genre *Ruta* : *R. chalepensis*, *R. angustifolia*, *R. graveolens*, *R. montana*.

3 semaines

Ruta chalepensis

Ruta angustifolia

Ruta graveolens

Ruta montana

---

8 semaines

Ruta chalepensis

Ruta graveolens

Ruta montana

---

13 semaines

Ruta chalepensis

Ruta angustifolia

Ruta graveolens

Ruta montana

Le profil[a] des 4 furocoumarines linéaires varie significativement suivant les 4 espèces (**Figure C-1b**). *Ruta angustifolia* produit surtout du psoralène (46%) et de la xanthotoxine (43%), alors que *Ruta chalepensis* contient du bergaptène en large majorité (67%). *Ruta graveolens* partage sa production entre le bergaptène, le psoralène et la xanthotoxine (respectivement 43%, 31%, et 23%). *Ruta montana* produit surtout de la xanthotoxine (53%). Dans tous les cas, l'isopimpinelline est produite en faible proportion. Il faut noter que l'on retrouve aussi un très faible pourcentage de xanthotoxine chez *Ruta chalepensis* (1% des 4 furocoumarines).

Ruta montana et *Ruta angustifolia* sont les espèces produisant le plus de furocoumarines linéaires. Cependant, la germination des graines de chacune de ces 2 espèces a été difficile à obtenir. L'inhibition de la germination peut être due aux fortes teneurs en furocoumarines dans les fruits, puisque les furocoumarines ont déjà montré des propriétés anti-germinatives chez d'autres espèces (Baskin *et al.*, 1967a ; Junttila, 1976 ; Aliotta *et al.*, 1994).

Toutes les espèces étudiées sont des plantes herbacées et pérennes (**Planche 8**). Cependant, *Ruta montana* et *Ruta angustifolia* forment des plantes de petite taille (au plus 15 cm après 6 mois de culture au champ). En revanche, *Ruta graveolens* et *Ruta chalepensis* ont produit dans le même temps beaucoup plus de biomasse avec une hauteur dépassant 50 cm.

Enfin, nous avons observé que *Ruta chalepensis*, *R. angustifolia* et *R. montana* sont très sensibles au froid puisque la plupart des plantes n'ont pas survécu après l'hiver. Par conséquent, *Ruta graveolens* semble être l'espèce la mieux adaptée aux conditions climatiques semi-continentales sous lesquelles nous avons testé les cultures (Nancy, France).

Comparées aux autres genres de la famille des Rutacées, les plantes du genre *Ruta* ont des teneurs élevées en furocoumarines et en particulier en bergatène. Elles semblent donc être de bons candidats pour remplacer ou compléter la source actuelle de furocoumarines c'est-à-dire la culture de bergamotier (*Citrus bergamia*). La concentration en bergaptène dans l'huile essentielle de bergamote est environ 3 mg par gramme d'huile essentielle (Bourgaud *et al.*, 1989). Dans cette même famille, les furocoumarines linéaires ont été détectées dans les genres *Citrus*, *Thasmnosma*, *Xanthoxylum* et *Evodia* (Pathak *et al.*, 1962 ; Saqib *et al.*, 1990 ; Zobel et Brown, 1991b). Zobel et Brown (1991b) ont quantifié le psoralène, la xanthotoxine et le bergaptène dans les fruits d'*Evodia danielli*, en teneurs respectives de 0,0 - 0,4 et 0,5 $mg.g^{-1}$ MS. Ces concentrations sont 2 à 100 fois plus faibles que celles détectées dans les feuilles des plantes du genre *Ruta*.

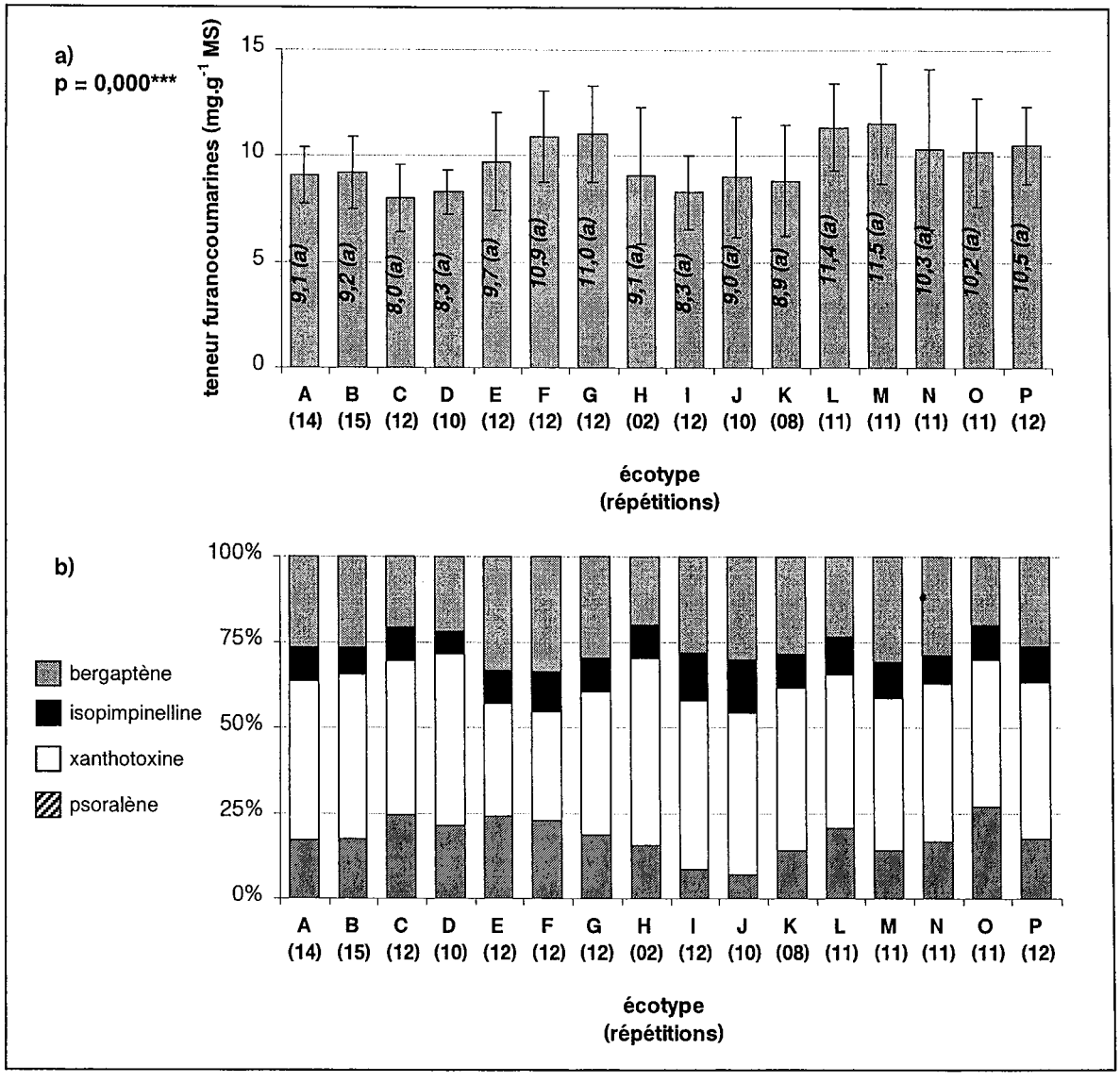
Comparées aux 3 autres principales familles productrices de furocoumarines linéaires (Moracées, Légumineuses et Apiacées), les plantes du genre *Ruta* contiennent beaucoup de molécules. Dans la famille des Moracées, l'isopimpinelline n'a pas été détectée (Swain et Downum, 1991) et la xanthotoxine a été détectée seulement dans les feuilles de figuier (*Ficus carica* L.) (Pathak *et al.*, 1962). Les plus fortes concentrations en psoralène et bergaptène ont été trouvées chez cette espèce (respectivement 4 et 6 $mg.g^{-1}$ MS). Ces concentrations sont du même ordre de grandeur que celles mesurées dans le genre *Ruta*.

Dans la famille des Légumineuses, le genre *Psoralea* ne produit que du psoralène avec des concentrations variant

[a] *le profil des 4 furocoumarines représente la proportion des 4 furocoumarines linéaires : psoralène, xanthotoxine, isopimpinelline et bergaptène*

Figure C-2 : Teneur en furocoumarines (a) et profil des 4 furocoumarines (b) dans les feuilles de 16 écotypes de l'espèce *Ruta graveolens*.

Plantes cultivées en conditions contrôlées. Barres d'erreurs = ±écart-type.



de 0,1 à 1 mg.g^{-1} MS, (Bourgaud *et al.*, 1994a-b). Ces concentrations sont plus faibles que chez la Rue.

La famille la plus étudiée pour la production de furocoumarines a été celle des Apiacées (19 genres étudiés) (Pathak *et al.*, 1962 ; Ceska *et al.*, 1987 ; Masuda *et al.*, 1998). Les 4 furocoumarines sont présentes dans la plupart des espèces (**Annexe 1** et **Figure A-12**, p22). Les plus fortes concentrations en furocoumarines ont été détectées chez *Heracleum mantegazzianum* (environ 4 mg.g^{-1} MS pour **chaque** furocoumarine) (Pira *et al.*, 1989). Ces concentrations sont du même ordre de grandeur que les concentrations obtenues chez certaines espèces du genre *Ruta*.

Les teneurs en furocoumarines trouvées dans les plantes du genre *Ruta* sont supérieures ou comparables aux concentrations maximales trouvées dans les autres familles productrices.

Les espèces du genre *Ruta* sont herbacées et pérennes : ceci représente un avantage en terme de taux de croissance, surtout comparé à des arbres comme le bergamotier ou le figuier.

L'espèce *Ruta chalepensis* présente un profil particulier des 4 furocoumarines : elle ne possède que 1% de xanthotoxine.

Ruta graveolens peut être considérée comme la meilleure espèce comparée aux autres espèces de *Ruta* du fait qu'elle est résistante au froid hivernal dans des conditions climatiques semi-continentales. De plus, elle a montré une production importante de biomasse, associée à une bonne teneur en furocoumarines (4 mg.g^{-1} MS, la première année, dans les feuilles).

1.1.2. Variabilité intraspécifique de la production de furocoumarines par des écotypes de l'espèce *Ruta graveolens*

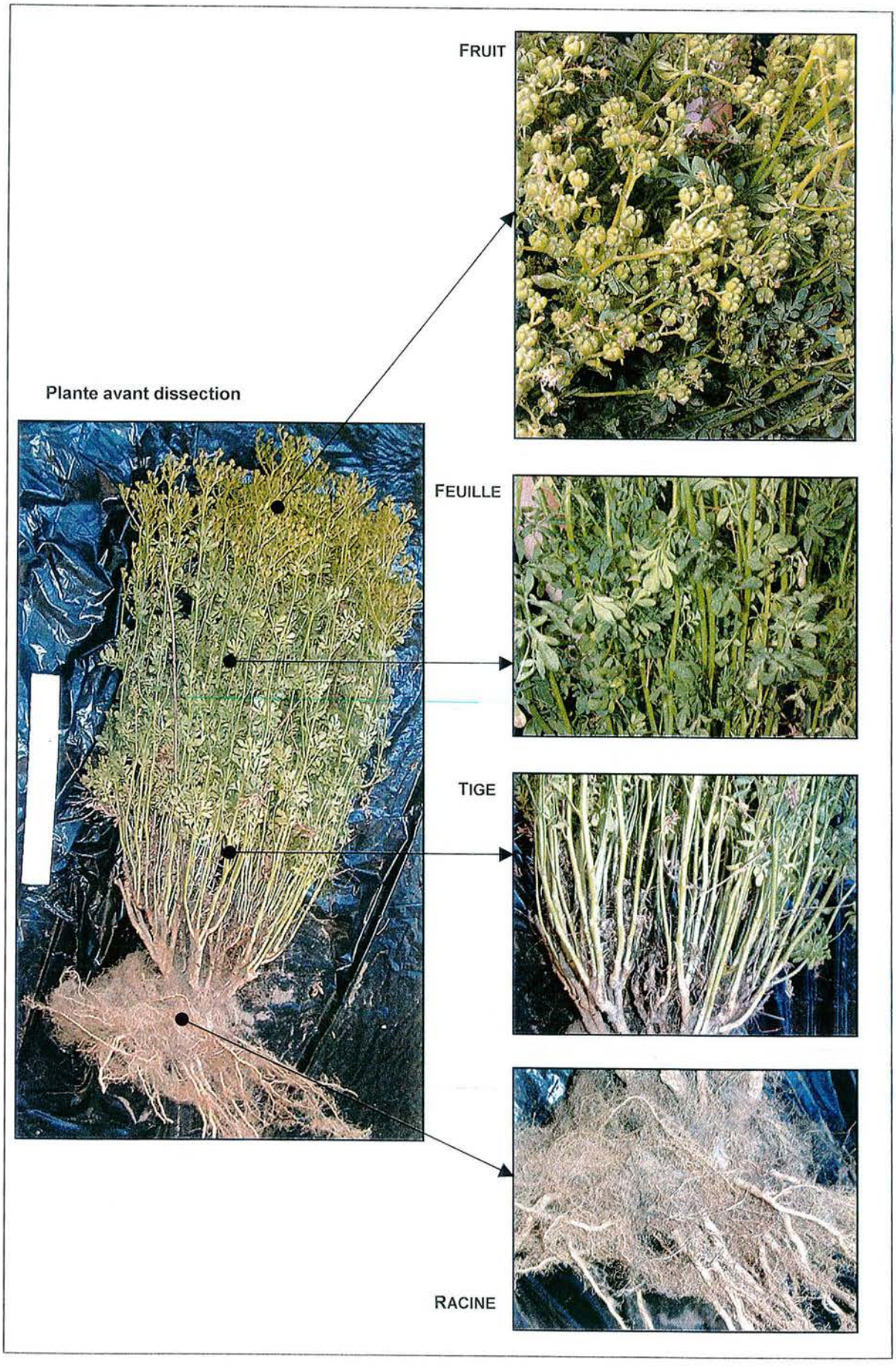
L'espèce *Ruta graveolens* a été choisie parmi 4 espèces du genre *Ruta* pour ses caractéristiques agronomiques (résistance au froid, production de biomasse) et pour sa capacité à produire des furocoumarines. Dans le but de quantifier la variabilité intraspécifique (ou inter-écotype) de l'espèce *Ruta graveolens* et trouver les meilleures origines susceptibles de produire des furocoumarines, nous avons étudié 16 écotypes de *Ruta graveolens*. Chaque écotype est représenté par 8 à 15 plantes (nombre de répétitions indiqué dans le **Tableau B-2**, p 37). Les 175 plantes ont été cultivées, en pots, en conditions contrôlées (phytotron).

Les écotypes ne sont pas différents pour la teneur en furocoumarines **Figure C-2a**. Dans cette expérience, les feuilles *Ruta graveolens* ont une teneur moyenne de 10 mg.g^{-1} MS de furocoumarines (valeurs extrêmes comprises entre 2,8 et 17,5 mg.g^{-1} MS). Les teneurs moyennes des écotypes sont comprises entre 8,0 mg.g^{-1} MS (écotype C) et 11,5 mg.g^{-1} MS (écotype M) **(Figure C-2a).**

Afin d'étudier plus précisément la variabilité inter-écotype de la teneur en furocoumarines, nous avons réalisé l'analyse suivante, qui se base sur un calcul qui considère les plantes étudiées comme une Population. Soit **V**, la variance totale, calculée sur toutes les plantes de tous les écotypes. Elle s'exprime comme la somme de la variance intra-écotype **W** (= within-variance) et la variance inter-écotype **B** (= between-variance) :

Planche 9 : Découpage de *Ruta graveolens* cultivée au champ : compartiments FRUIT, FEUILLE, TIGE, RACINE.

Plantes récoltées en Sologne (essai MULTIFACTORIEL) en juillet 2000



$$V = W + B$$

avec $W = (1/n) \times \Sigma(n_k \times V_k)$ et $B = (1/n) \times \Sigma(n_k \times (M_k - M)^2)$

où n = Nombre total de plantes

$k \in$ [Ecotype A, Ecotype B, ..., Ecotype P]

n_k = Nombre de plantes dans l'écotype k

V_k = Variance calculée sur les teneurs des plantes de l'écotype k

M_k = Moyenne calculée sur les teneurs des plantes de l'écotype k

M = Moyenne générale

Dans le cas de l'espèce *Ruta graveolens*, la variance intra-écotype représente 78% de la variance totale alors que la variance inter-écotype représente seulement 22% de la variance totale. La variabilité est donc plus élevée au sein des écotypes, qu'entre les écotypes.

Dans les feuilles de *Ruta graveolens*, les pourcentages de psoralène, xanthotoxine, isopimpinelline et bergaptène étaient respectivement de 18%, 43%, 11% et 27% (**Figure C-2b**). Le profil des 4 furocoumarines est semblable suivant les écotypes. Même si aucun écotype ne ressort de l'analyse des teneurs des 4 furocoumarines, nous pouvons distinguer statistiquement 4 écotypes pour chacune des furocoumarines : l'écotype F pour le bergaptène (4 $mg.g^{-1}$ MS), l'écotype O pour le psoralène (3 $mg.g^{-1}$ MS), l'écotype M pour la xanthotoxine (5 $mg.g^{-1}$ MS) et l'écotype J pour l'isopimpinelline (1 $mg.g^{-1}$ MS).

Nous avons remarqué que les concentrations dans les feuilles de *Ruta graveolens* dans cette expérience sont 2,5 fois plus élevées que dans l'expérience où étaient testées les différentes espèces du genre *Ruta*. Cette différence peut être expliquée par le fait que les plantes n'ont pas été cultivées dans les mêmes conditions (en phytotron dans cette expérience et au champ dans la précédente).

La variabilité est plus élevée au sein d'un écotype qu'entre les écotypes. Ceci signifie qu'un écotype ne contient pas des plantes homogènes. Cette hétérogénéité pourrait permettre une amélioration génétique de l'espèce *Ruta graveolens* par sélection massale ou sélection généalogique. Ce point sera développé dans le chapitre Discussion (chapitre **D**, p 102).

Après avoir quantifié la variabilité de la teneur en furocoumarines dans le genre *Ruta*, nous nous sommes focalisés sur la plante pour mieux comprendre la répartition des furocoumarines.

1.2. PRODUCTION DE FUROCOUMARINES DANS LES ORGANES DE LA PLANTE

L'étude de l'espèce *Ruta graveolens* s'est poursuivie par la localisation des furocoumarines au sein de la plante. Dans un premier temps, nous avons découpé la plante en compartiments horizontaux (fruits, feuilles, tiges, racines comme le montre la **Planche 9**) et nous avons évalué la biomasse et les furocoumarines stockées dans chacun des compartiments. Dans un deuxième temps, nous présentons les résultats de dosages plus fins des furocoumarines dans 3 organes: fruits, feuilles et tiges.

Figure C-3 : Production de matière sèche (a), teneur en furocoumarines (b) et quantité totale de furocoumarines (c) stockées dans la plante (*Ruta graveolens*).

Plantes cultivées au champ (Soings-en-Sologne). r = 16 répétitions par traitement.

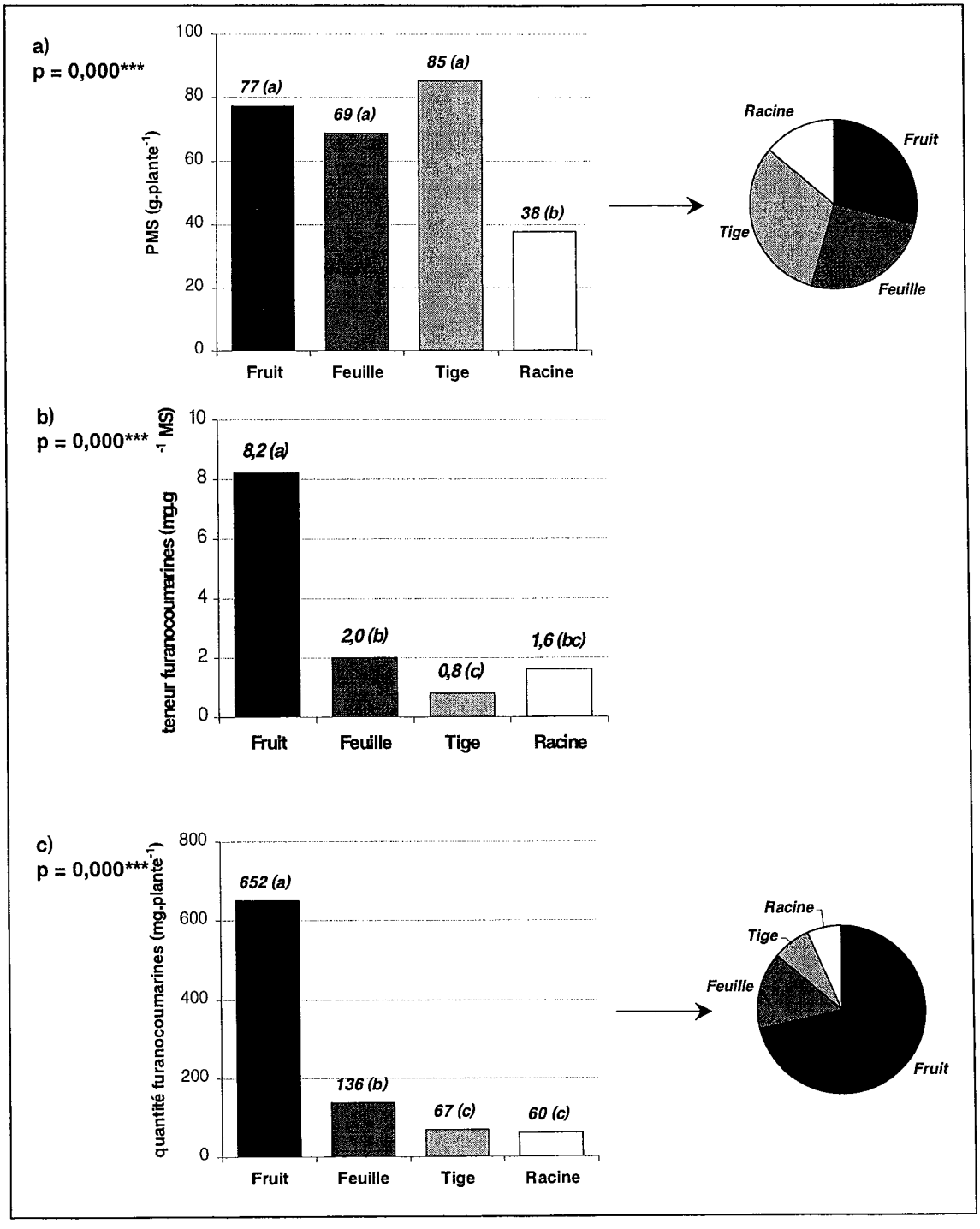


Figure C-4 : profil des 4 furocoumarines linéaires dans les 4 compartiments d'une plante (*Ruta graveolens*).

Plantes cultivées au champ (Soings-en-Sologne). r = 16 répétitions par traitement.

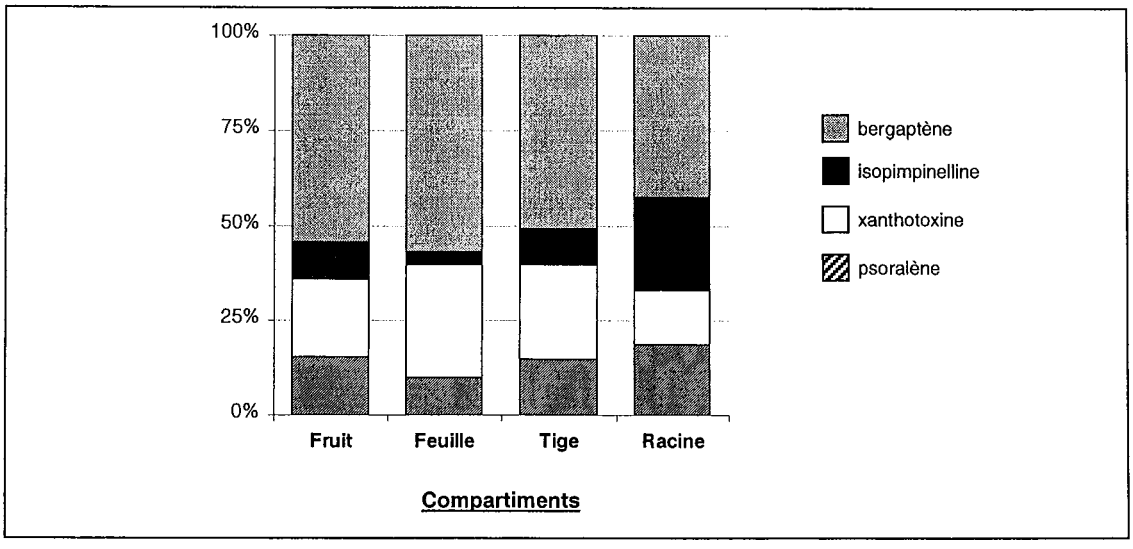
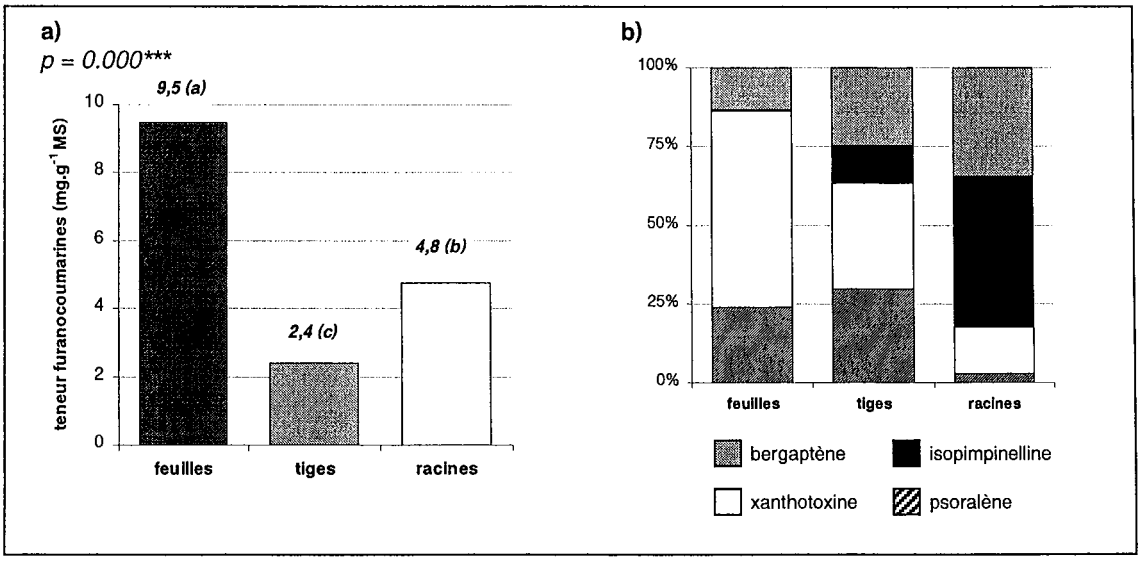


Figure C-5 : Teneurs en furocoumarines (a) dans les feuilles, tiges et racines de plantes (*Ruta graveolens*) cultivées en serre et profil des 4 furocoumarines linéaires (b) dans les 3 tissus.

r = 8 répétitions par traitement.



1.2.1. Production de furocoumarines dans les différents compartiments de la plante

La production de biomasse et la répartition des furocoumarines ont été étudiées dans 4 compartiments horizontaux, correspondant à 4 organes de la plante (les fruits, les feuilles, les tiges, les racines), comme nous l'avons décrit dans la **Figure B-4**, p 40 et comme le montre la **Planche 9**. Nous avons étudié ces 4 compartiments sur 16 plantes[a] (= 16 répétitions), récoltées au mois de juillet, pendant la fructification. A ce stade phénologique, tous les compartiments sont présents.

a. Production de matière sèche

Les matières sèches des fruits, feuilles et tiges sont chacune 2 fois plus élevées que celle des racines (**Figure C-3a**). Cependant, au cours du prélèvement des plantes cultivées au champ, une certaine quantité de racines est restée dans le sol et n'a donc pas été récoltée. Ceci induit un biais, que nous ne pouvons quantifier *a priori*.

b. Teneurs en furocoumarines

Le compartiment FRUIT (8 $mg.g^{-1}$ MS) présente des teneurs significativement plus élevées que les 3 autres compartiments : en moyenne 5 fois plus que les compartiments FEUILLE et RACINE, et 10 fois plus que le compartiment TIGE (**Figure C-3b**). Le compartiment FEUILLE (2 $mg.g^{-1}$ MS) a une teneur significativement plus élevée que le compartiment TIGE (0,8 $mg.g^{-1}$ MS).

Le profil des 4 furocoumarines des différents compartiments est présenté dans la **Figure C-4**. Pour les 4 compartiments, nous pouvons noter que le bergaptène est la furocoumarine la plus représentée : plus de 50 % des furocoumarines dans les compartiments FRUIT, FEUILLE, TIGE et plus de 40% dans le compartiment RACINE. Dans les 3 compartiments, FRUIT, FEUILLE et TIGE, la xanthotoxine représente plus de 25% des furocoumarines. Ainsi, dans ces 3 compartiments, on peut dire que les 2 furocoumarines mono-substituées représentent plus de 75% des 4 furocoumarines étudiées.

Le compartiment RACINE a un profil de furocoumarines tout-à-fait différent des 3 autres compartiments : l'isopimpinelline, furocoumarine bi-substituée, représente 25% des furocoumarines, alors que dans les 3 autres compartiments, elle ne représente que 5 à 10% des furocoumarines.

Nous avons également effectué l'analyse de la teneur en furocoumarines sur des plantes cultivées en serre (ces plantes étaient au stade végétatif). Les analyses des furocoumarines dans ces plantes ont confirmé certaines observations obtenues sur les plantes cultivées au champ. Les résultats sont présentés dans la **Figure C-5**. Comme précédemment, la teneur des feuilles en furocoumarines et significativement plus élevée que celle des tiges et des racines (**Figure C-5a**). De plus, la répartition des 4 furocoumarines dans chaque tissu a montré très nettement que les racines ont une forte proportion d'isopimpinelline. En revanche quelques différences peuvent être notées entre les données obtenues dans le cas des plantes cultivées en serre et celles prélevées au champ : d'une part, le bergaptène n'est plus majoritaire ; d'autre part, les teneurs en furocoumarines sont plus élevées pour les plantes

[a] *plantes âgées d'une année et cultivése à la densité de 15 000 pl./ha*

cultivées en serre que pour celle prélevées au champ.

c. Quantité de furocoumarines stockée dans les différents compartiments

La quantité de matière sèche produite par la plante et la teneur en furocoumarines des 4 compartiments nous ont permis de calculer la quantité totale de furocoumarines produite par chacun des compartiments (**Figure C-3c**). Le compartiment FRUIT contient environ 10 fois plus de furocoumarines que les compartiments RACINE et TIGE. Le compartiment FEUILLE a stocké plus de furocoumarines que les compartiments RACINE et TIGE.

d. Discussion, conclusions

Ces résultats montrent que les racines de *Ruta graveolens*, organe souterrain, produisent l'isopimpinelline en plus grande proportion, comparé aux autres organes qui sont exposés à la lumière. Cette furocoumarine linéaire bi-substituée n'est pas photobiologiquement active selon Ivie et Beier (1996). Il a déjà été montré que sa concentration augmente chez *Pastinaca sativa* avec la réduction de la lumière (Zangerl et Berenbaum, 1987). Même en absence de lumière, l'isopimpinelline peut être responsable de mutations et de mort cellulaire, sur la base d'effets physiologiques *a priori* indépendants du mécanisme de photoaddition à l'ADN (Murray *et al.*, 1982). L'augmentation de la proportion d'isopimpinelline dans les racines, par rapport aux autres organes, permettrait de conserver l'efficacité toxicologique de la défense chimique de la plante, même dans un environnement privé de lumière.

La seconde observation que nous avons pu faire est que le compartiment FRUIT a une teneur élevée en furocoumarines. Ces molécules étant connues pour être impliquées dans la défense des plantes contre les herbivores et les pathogènes (Murray *et al.*, 1982 ; chapitre **A**, paragraphe **2.1**, p 19), nous pouvons confronter cette répartition des furocoumarines à la théorie de défense optimale (McKey, 1979 ; chapitre **A**, p 20) qui donne des prédictions en ce qui concerne les défenses chimiques chez les plantes. Selon cette théorie, comme les défenses ont un coût, les zones les plus défendues sont d'une part celles dont la perte induirait une diminution sérieuse de la valeur reproductive (ou fitness), et d'autre part celles qui ont une forte probabilité d'être attaquées (McKey, 1979). Or les parties reproductrices d'une plante, et plus particulièrement les graines et les fruits, sont des cibles privilégiées pour les herbivores puisqu'elles sont riches en ressources (Zangerl et Nitao, 1998). Nos résultats coïncident avec ces hypothèses. En effet, chez *Ruta graveolens*, les furocoumarines sont allouées au compartiment reproducteur, étant donné que l'on a détecté en moyenne 8 $mg.g^{-1}$ MS de furocoumarines dans le compartiment FRUIT. Les feuilles, tiges et racines sont moins défendues (en ne tenant compte que des furocoumarines), puisqu'elles contiennent moins de 2 $mg.g^{-1}$ MS de furocoumarines.

Les racines de *Ruta graveolens*, organe souterrain, ont une plus grande proportion d'isopimpinelline, comparé aux autres organes qui sont exposés à la lumière. Cette augmentation permettrait de conserver l'efficacité toxicologique de la défense chimique de la plante, même dans un environnement privé de lumière.

Le compartiment FRUIT a une teneur élevée en furocoumarines : 8 $mg.g^{-1}$ MS.

Figure C-6 : Concentrations en furocoumarines (a) et profil des 4 furocoumarines (b) dans le compartiment FRUIT de plantes cultivées au champ (*Ruta graveolens*).

r = 2 répétitions par traitement.

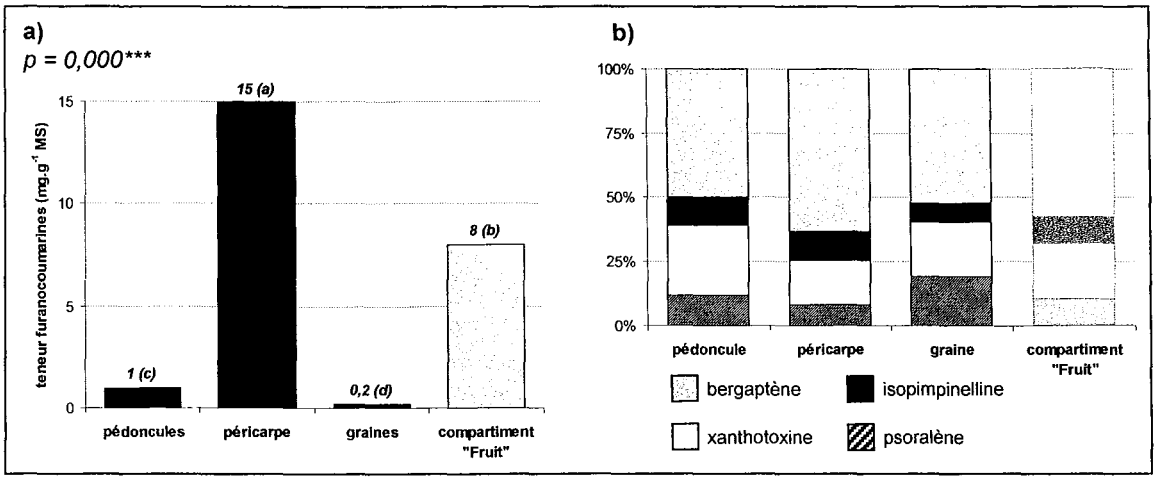
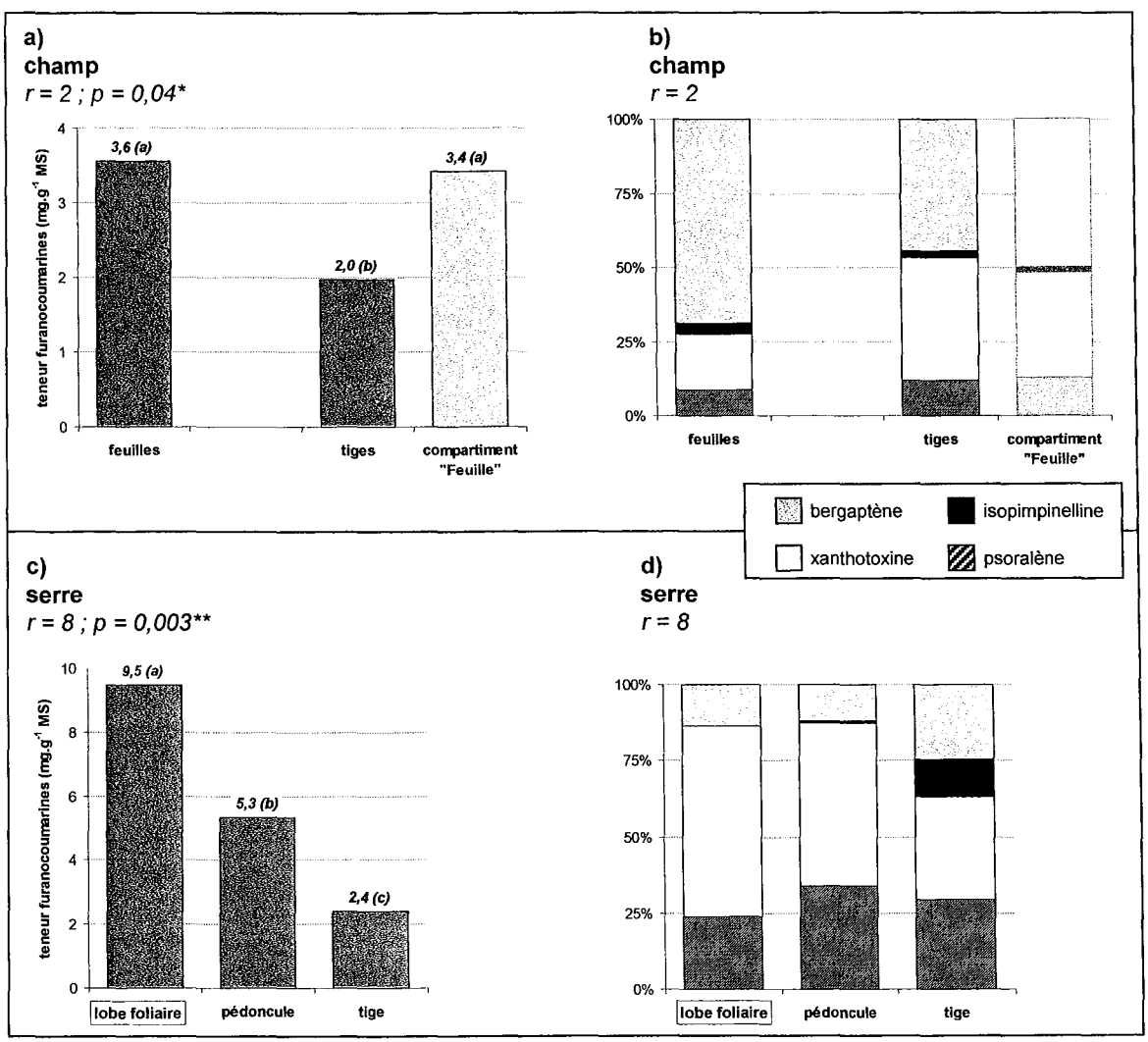


Figure C-7 : Concentrations en furocoumarines (a et c) et profil des 4 furocoumarines (b et d) dans le compartiment FEUILLE de plantes (*Ruta graveolens*), cultivées au champ (a et b) ou en serre (c et d).

r = nombre de répétitions par traitement.



1.2.2. Dosage des furocoumarines dans différents organes de la plante

Les compartiments FRUIT, FEUILLE et TIGE ont été étudiés plus finement afin de localiser au mieux les furocoumarines. Nous avons récolté les plantes[a] au stade fructification.

a. Fruits

Le compartiment FRUIT a été analysé en tenant compte du découpage schématisé dans l'encadré ***Fruit*** de la **Figure B-4**, p 40 : nous avons analysé la teneur en furocoumarines des pédoncules, des péricarpes et des graines. Ils contiennent respectivement 1 - 15 et 0,2 $mg.g^{-1}$ MS de furocoumarines (**Figure C-6a**, page suivante). Statistiquement, le test de Newmann-Keuls permet de distinguer 4 groupes dans l'ordre suivant : (a)-péricarpes ; (b)-pédoncules ; (c)-graines (p =0.000***).

La répartition entre les 4 furocoumarines (psoralène, xanthotoxine, isopimpinelline et bergaptène) est quasiment identique pour les 3 tissus (**Figure C-6b**). Le profil est le même pour la xanthotoxine, l'isopimpinelline et le bergaptène. Seules les graines ont un pourcentage en psoralène significativement plus élevé que les autres tissus.

Les péricarpes ont donc une teneur en furocoumarines 10 fois plus élevée que les pédoncules et 100 fois plus que les graines. La majorité des métabolites secondaires étudiés ici est donc allouée aux péricarpes, tissus maternels protégeant physiquement les graines jusqu'à la déhiscence des fruits. Les furocoumarines ayant une activité antifongique et antibactérienne, elles pourraient conférer aux péricarpes un rôle de protecteur chimique contre les agressions de pathogènes sur les embryons.

La situation de ces furocoumarines peut renforcer l'hypothèse d'effets allélopathiques des furocoumarines : par leur présence et leur activité anti-germinative, elles pourraient empêcher le développement de plantes concurrentes proches des fruits tombés au sol.

b. Feuilles

Feuilles et tiges

Le compartiment FEUILLE tel que nous l'avons défini (encadré ***Feuille*** de la **Figure B-4**, p 40) est en réalité composé de feuilles[b] et de tiges. Dans ce compartiment, la teneur en furocoumarines est de 3,6 $mg.g^{-1}$ MS dans les feuilles et 2 $mg.g^{-1}$ MS dans les tiges, pour des plantes cultivées au champ (**Figure C-7a**). Les feuilles, ayant une plus forte teneur en furocoumarines, semblent donc être un lieu de stockage privilégié dans ce compartiment.

Les feuilles ont un fort pourcentage en bergaptène. En revanche, les tiges ont un plus fort pourcentage en xanthotoxine (**Figure C-7b**).

Lobes foliaires, pétioles et tiges

Nous avons aussi réalisé une dissection encore plus fine, sur 8 plantes cultivées en serre. Nous avons comparé les

[a] *plantes âgées d'une année, récoltées sur la parcelle de 1 hectare (Soings-en-Sologne)*
[b] *feuille = plages intercostales+nervures+pétiole*

teneurs en furocoumarines dans les lobes foliaires[a], les pétioles et les tiges.

Les observations sont les mêmes que pour les plantes récoltées au champ : les feuilles contiennent plus de furocoumarines que les tiges (**Figure C-7c**). Ce qui ressort de ces analyses est que les pétioles ont une concentration intermédiaire entre les lobes foliaires et les tiges.

Contrairement aux plantes cultivées au champ (**Figure C-7a**), le profil des 4 furocoumarines est différent suivant le tissu considéré (**Figure C-7d** et **Tableau C-2**) : le pourcentage de xanthotoxine est significativement plus élevé dans les lobes (groupe statistique A) puis dans les pétioles (B) puis dans les tiges (C). De plus, le pourcentage d'isopimpinelline est significativement plus élevé dans les tiges que dans les 2 autres tissus. Les pourcentages de psoralène et bergaptène ne sont pas significativement différents suivant les 3 tissus (**Tableau C-2**).

	lobes	**pétioles**	**tiges**	***Probabilité ANOVA***
Furocoumarines	9,5 $mg.g^{-1}$ MS ***A***	5,3 $mg.g^{-1}$ MS ***B***	2,4 $mg.g^{-1}$ MS ***C***	*p = 0,000***
%psoralène	24%	34%	30%	*NS*
%xanthotoxine	62% ***A***	53% ***B***	34% ***C***	*p = 0,000***
%isopimpinelline	0% ***B***	0% ***B***	12% ***A***	*p = 0,007***
%bergaptène	14%	12%	25%	*NS*

Tableau C- 2 : Teneurs en furocoumarines et profil des 4 furocoumarines dans 3 tissus du compartiment FEUILLE de plantes *Ruta graveolens* récoltées en serre : lobes (plages intercostales + nervures), pétioles et tiges portant les feuilles

Pour les plantes cultivées au champ, les tiges qui portent les feuilles sont des tiges d'axe secondaire alors que pour les plantes cultivées en serre, c'est la tige principale qui porte les feuilles. Or, dans le cas des plantes cultivées en serre, le profil des 4 furocoumarines est différent suivant les 3 tissus du compartiment FEUILLE. Il se pourrait que dans le cas des plantes cultivées en serre, les furocoumarines stockées dans les 3 tissus (lobes, pétioles et tiges) ne soient pas issues des mêmes lieux de synthèse : la tige principale pourrait par exemple être sous l'influence des racines puisque nous y avons détecté plus d'isopimpinelline. Cette observation nous laisse penser qu'il pourrait se produire une translocation des furocoumarines dans la plante.

Dans le cas des plantes prélevées au champ, nous n'avons pas observé de différence dans le profil des 4 furocoumarines, en fonction des différents tissus. Les furocoumarines stockées pourraient alors provenir des mêmes lieux de synthèse.

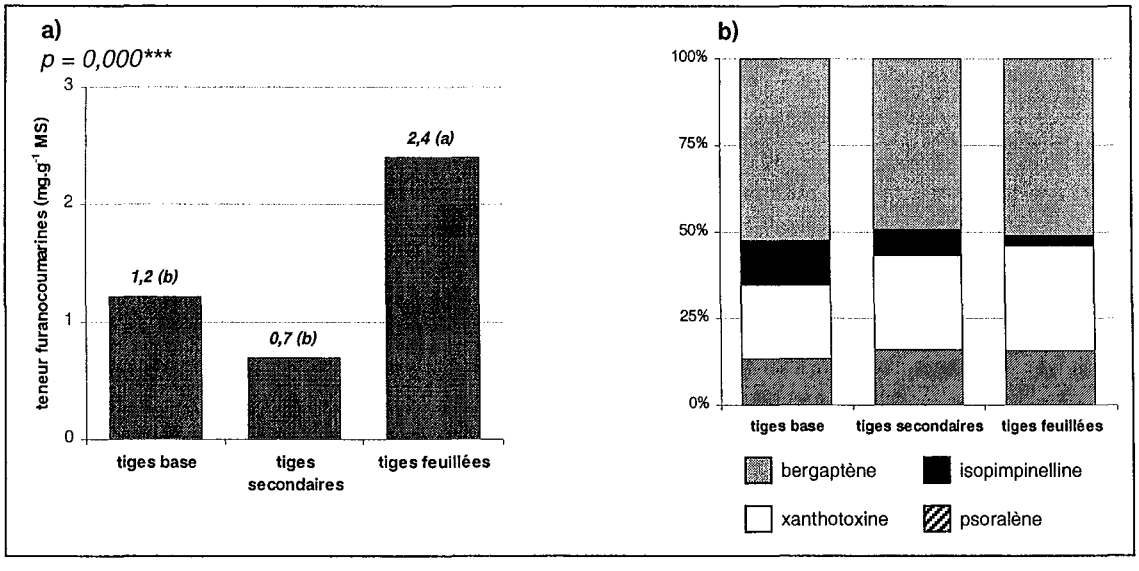
Plages intercostales, nervures et pétiole

Enfin, nous avons effectué une dissection encore plus minutieuse au niveau des feuilles, en séparant, comme le montre la **Figure B-4**, p 40, les plages intercostales, les nervures et le pétiole. Cette manipulation a été réalisée sur une plante cultivée en serre. Les résultats ont montré que la teneur en furocoumarines était plus élevée dans les

[a] *lobes foliaires = plages intercostales+nervures*

Figure C-8 : Concentrations en furocoumarines (a) et profil des 4 furocoumarines (b) de tiges de plantes cultivées au champ (*Ruta graveolens*).

r = 16 répétitions par traitement.



nervures (7 $mg.g^{-1}$ MS) que dans le pétiole (6 $mg.g^{-1}$ MS) ou les plages intercostales (5 $mg.g^{-1}$ MS). Des résultats obtenus dans notre laboratoire ont aussi montré que les furocoumarines étaient présentes en plus grande quantité dans les nervures de Psoralées (Clergeot, 1994).

Conclusions

La teneur en furocoumarines est maximale dans les nervures, puis dans les plages intercostales des feuilles. Elle est inférieure dans les tissus porteurs comme les pétioles ou les tiges.

La teneur en furocoumarines dans les nervures est élevée : les nervures pourraient donc être un lieu de stockage et/ou de synthèse de ces furocoumarines. Afin d'étayer cette dernière hypothèse, nous pouvons noter que la bibliographie fait état d'activités méthyl-transférases et PAL dans les nervures (Subramaniam *et al.*, 1993 ; Ye et Varner, 1995 ; Jaeck *et al.*, 1996 ; Osakabe *et al.*, 1996 ; Martz *et al.*, 1998). Ces types d'enzymes, comme la bergaptol méthyl-transférase, la xanthotoxol méthyl-transférase ou la PAL, catalysent des réactions de la voie de biosynthèse des furocoumarines (Schuler, 1996).

c. Tiges

Plusieurs types de tiges peuvent être identifiés par leur morphologie pour des plantes récoltées au champ : les tiges feuillées, les tiges de la base et les tiges d'axe secondaire (**Figure B-4**, p 40). Nous avons analysé le contenu en furocoumarines dans ces 3 types de tiges.

Les tiges feuillées ont une teneur en furocoumarines significativement plus élevée que les tiges d'axe secondaire et les tiges de la base (**Figure C-8**).

Les tiges feuillées sont chlorophylliennes et peu lignifiées alors que les tiges de la base ont des tissus très lignifiées et peu de pigments chlorophylliens. Les précurseurs de la lignine et les furocoumarines sont concurrents dans les voies des phénylpropanoïdes (voir **Figure A-3**, p 11). Il se pourrait que la lignification des tissus dirige le métabolisme vers la formation des précurseurs de la lignine, inhibant ainsi la formation des voies concurrentes comme celle des furocoumarines. Nous observons effectivement que les tiges de la base, très lignifiées, contiennent moins de furocoumarines que les tiges feuillées. De plus, les tiges feuillées sont proches des feuilles, organes riches en furocoumarines, et peuvent donc subir leur influence.

Le profil des 4 furocoumarines montre que le pourcentage d'isopimpinelline augmente depuis les tiges hautes vers les tiges de la base (**Figure C-8b**). Or nous avons observé que les racines ont le plus fort pourcentage d'isopimpinelline de tous les compartiments. La proximité des racines influencerait donc le profil des 4 furocoumarines dans les tiges de la base.

Les péricarpes des fruits ont une teneur en furocoumarines 10 fois plus élevée que les pédoncules et 100 fois plus que les graines.

Dans une feuille, la teneur en furocoumarines est maximale dans les nervures, puis dans les plages intercostales des feuilles. Les teneurs sont les plus faibles dans les tissus porteurs comme les pétioles ou les tiges.

Les tiges feuillées ont une teneur plus forte que les tiges de la base et les tiges d'axe secondaire. Le pourcentage

Figure C-9 : Production de matière sèche (a), teneur en furocoumarines (b) et quantité de furocoumarines produite par plante chez *Ruta graveolens* récoltée à 3 stades phénologiques.

Stade I (16 répétitions) = récolte en avril, fin du stade végétatif ; Stade II (16 répétitions) = récolte en juillet, stade fructification ; Stade III (6 répétitions) = récolte en octobre, après la chute des fruits.

Plantes cultivées au champ (Soings-en-Sologne).

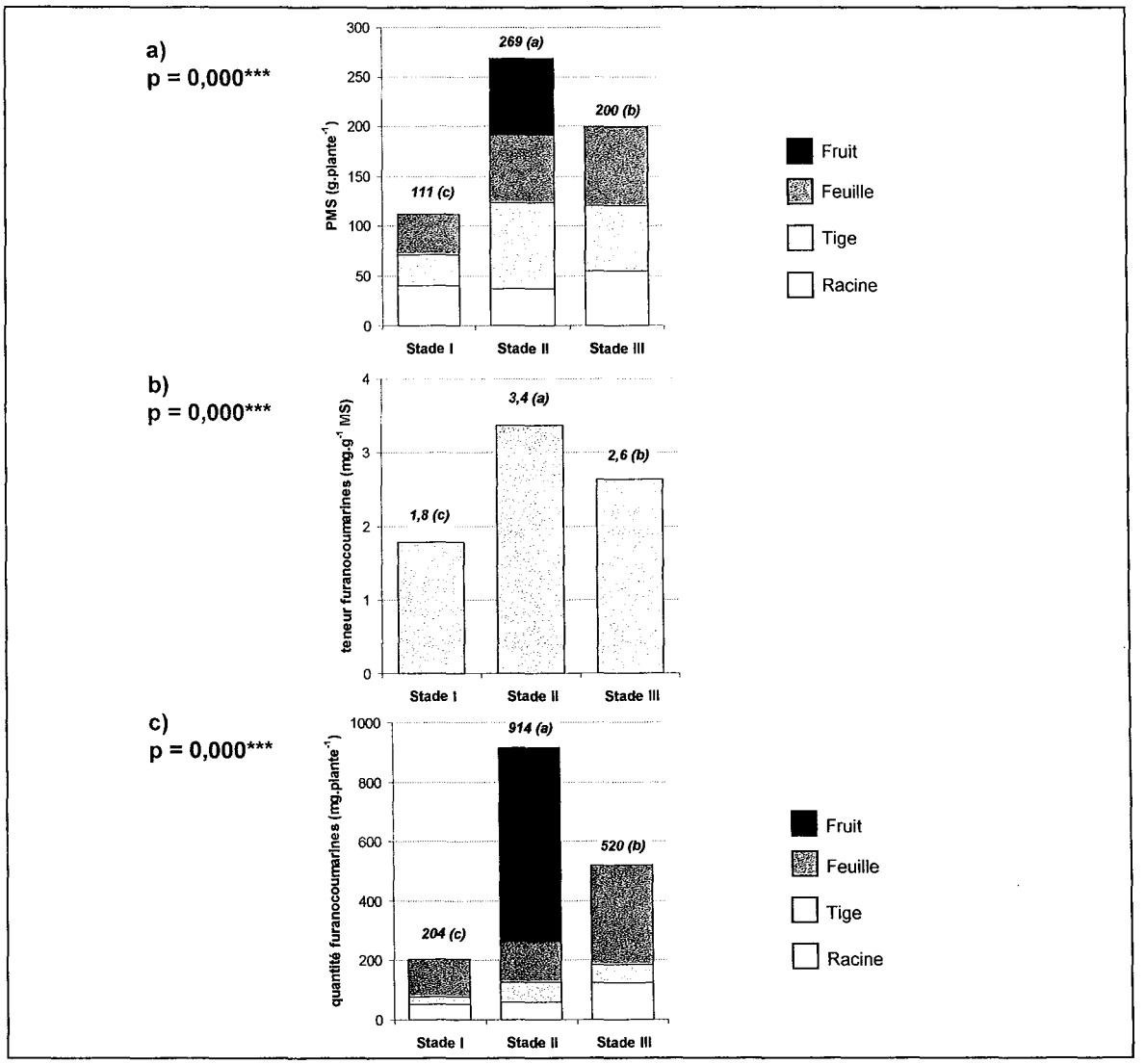
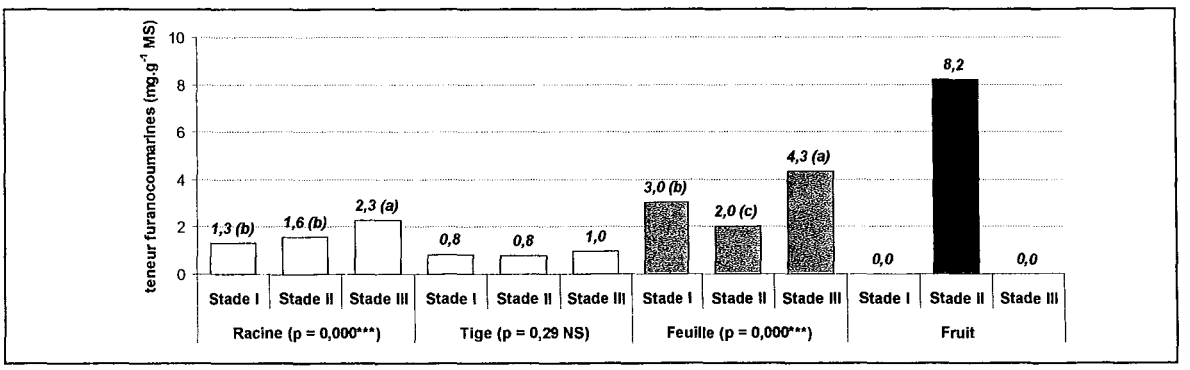


Figure C-10 : Suivi de la teneur en furocoumarines dans les différents compartiments au cours de 3 stades phénologiques.

***Stade I** (16 répétitions) = récolte en avril, fin du stade végétatif ; **Stade II** (16 répétitions) = récolte en juillet, stade fructification ; **Stade III** (6 répétitions) = récolte en octobre, après la chute des fruits.*

Plantes cultivées au champ (Soings-en-Sologne).



d'isopimpinelline augmente dans les tiges en se rapprochant des racines.

Après avoir localisé les furocoumarines dans la plante, nous avons étudié l'effet du stade phénologique sur cette répartition et sur la production.

1.3. VARIATION DE LA PRODUCTION DE FUROCOUMARINES EN FONCTION DU STADE PHENOLOGIQUE DE LA PLANTE

La production de furocoumarines peut être influencée par le stade phénologique de la plante, simplement par le fait que tous les organes ne sont pas présents aux différents stades de développement de la Rue. Le stade de développement est alors un facteur déterminant pour choisir la date de récolte de la Rue, dans l'optique de son exploitation pour la production de furocoumarines.

Dans ce contexte, des plantes ont été récoltées à 3 stades phénologiques afin d'évaluer la production de furocoumarines. Un premier groupe de plantes a été prélevé en avril 1998, à la fin du stade végétatif (stade I, 16 répétitions). Un deuxième groupe a été prélevé au mois de juillet 1998, au stade fructification (stade II, 16 répétitions). Un troisième groupe de plantes a été prélevé en octobre 1998 après la chute des fruits, en entrée d'hiver (stade III, 6 répétitions). Les poids de matière sèche, les teneurs et les quantités totales de furocoumarines par plante ont été déterminés à ces 3 stades (**Figure C-9**).

a. Production de matière sèche

La **Figure C-9a** montre la production de matière sèche suivant les stades phénologiques, avec la contribution des 4 compartiments décrits précédemment. Les plantes récoltées au stade fructification ont une production de matière sèche significativement plus élevée que les plantes récoltées aux 2 autres stades.

Chacun des compartiments n'a pas le même comportement suivant le stade phénologique : par exemple la production de biomasse par les racines et les feuilles augmente au cours du développement, alors que le compartiment TIGE a plus de matière sèche au stade fructification.

b. Teneurs en furocoumarines

Grâce aux poids de matière sèche et aux teneurs, déterminés dans les différents compartiments, nous avons pu évaluer la teneur moyenne dans la plante, pondérée par les 4 compartiments. Cette teneur a été calculée pour chacune des plantes récoltées (**Figure C-9b**). Les plantes récoltées au stade fructification ont une teneur 1,3 à 1,6 fois supérieure à celles des plantes récoltées aux 2 autres stades. La teneur moyenne très élevée pour les plantes récoltées au stade fructification est principalement due à la présence des fruits qui ont une très forte teneur en furocoumarines.

La teneur des plantes récoltées après la chute des fruits est supérieure à celle des plantes récoltées au stade végétatif. Ceci s'explique par une augmentation de la teneur des feuilles et des racines des plantes au cours du développement (**Figure C-10**). En revanche, la teneur dans les tiges ne varie pas de façon significative en fonction des stades phénologiques étudiés.

La teneur en furocoumarines dans les feuilles baisse au stade fructification (**Figure C-10**). Cette baisse pourrait être corrélée à la présence des fruits qui pourraient être un organe puits.

c. Quantité totale de furocoumarines stockées dans les plantes suivant les stades phénologiques

La **Figure C-9c**, représente la quantité totale de furocoumarines stockées dans la plante. Les plantes au stade fructification stockent presque 5 fois plus de furocoumarines que les plantes récoltées au stade végétatif et presque 2 fois plus de furocoumarines que les plantes récoltées après la chute des fruits. La **Figure C-9c** montre aussi la contribution des 4 compartiments dans lesquels sont stockées les furocoumarines. On observe que l'allocation des furocoumarines est assez différente de celle de la biomasse : les plantes récoltées au stade fructification ont stocké plus de 70% des furocoumarines dans les fruits alors que la biomasse des fruits ne représente que 28% de la biomasse totale. Au contraire, les furocoumarines des plantes récoltées en avril et en octobre sont principalement localisées dans les feuilles (plus de 60%).

Le stade phénologique de la plante modifie fortement la biomasse et la production de métabolites secondaires. Quelle que soit la variable étudiée (matière sèche, teneur, quantité de métabolite par plante), les plantes récoltées au stade fructification avaient des valeurs moyennes significativement plus élevées que les plantes prélevées au stade végétatif ou après la chute des feuilles. Les plus faibles valeurs ont été observées pour les plantes récoltées au stade végétatif, au printemps.

En ne tenant pas compte des fruits, la biomasse du reste de la plante (feuilles, tiges, racines), ainsi que la quantité totale de furocoumarines, augmentent en fonction des stades phénologiques successivement étudiés.

1.4. DISCUSSION, CONCLUSIONS

La production de furocoumarines a été caractérisée chez 4 espèces du genre *Ruta*, puis chez 16 écotypes de l'espèce *Ruta graveolens* et enfin au sein de plantes de l'espèce *Ruta graveolens*. Dans un premier temps, nous avons observé que les plantes du genre *Ruta* ont produit entre 4 et 17 $mg.g^{-1}$ MS de furocoumarines, selon l'espèce considérée. Ces teneurs sont supérieures ou comparables aux concentrations maximales trouvées dans les autres familles productrices de furocoumarines. Deux espèces, *Ruta chalepensis* et *Ruta graveolens*, montrent une production de matière sèche suffisante pour être de bons candidats à la bio-production de furocoumarines au champ. L'espèce *Ruta chalepensis* présente un profil particulier des 4 furocoumarines : elle ne possède que 1% de xanthotoxine. Cependant cette espèce est très sensible au froid hivernal et n'est donc pas adaptée au climat semi-continental dans lequel nous l'avons testé. *Ruta graveolens* est donc considéré comme le meilleur candidat pour les raisons suivantes : elle a un port herbacé et pérenne, une production importante de biomasse, une résistance au froid hivernal et une bonne teneur en furocoumarines (4 $mg.g^{-1}$ MS dans les feuilles).

Dans un deuxième temps, l'étude de la production de furocoumarines parmi des écotypes de *Ruta graveolens* a montré que cette espèce présente une variabilité génotypique pour la production de furocoumarines. Cette variabilité est plus élevée au sein d'un écotype qu'entre les écotypes. L'hétérogénéité de l'espèce *Ruta graveolens* ouvre la possibilité d'améliorer par sélection la Rue pour la production de furocoumarines, sous réserve que l'héritabilité des

niveaux de production en furocoumarines puisse être démontrée.

Enfin, nous avons pu mettre en évidence des résultats précis sur le stockage des furocoumarines chez la Rue. La première observation est que le compartiment FRUIT contient beaucoup plus de furocoumarines que les 3 autres compartiments définis, FEUILLE, TIGE et RACINE. Selon la théorie de défense optimale (McKey, 1979), les parties les plus défendues chimiquement sont celles qui sont susceptibles d'être le plus attaquées et celles dont la perte serait la plus préjudiciable à la survie de l'individu. On sait que l'attaque des fruits est très préjudiciable puisqu'elle met en danger les embryons qui sont en formation. Les fruits de la Rue sont aussi des cibles de choix pour les prédateurs puisqu'ils concentrent les nutriments utiles au développement futur des embryons. Les furocoumarines étant des molécules de défense des végétaux, ces résultats sont cohérents avec la théorie de la défense optimale.

La conséquence de cette répartition chez *Ruta graveolens* est que 70 % des furocoumarines synthétisées par la plante sont stockées dans les fruits, alors que la matière sèche du compartiment FRUIT ne représente que 25% de la matière sèche de la plante. La seule récolte des fruits et des feuilles conduirait à collecter 80% des furocoumarines produites par la plante au stade fructification. Deuxième conséquence de cette répartition : la présence de fruits va influencer fortement le choix du stade phénologique pour obtenir une quantité maximale en furocoumarines. Les plantes au stade fructification ont des moyennes significativement supérieures aux plantes des 2 stades végétatifs.

Des dissections plus fines ont montré que les furocoumarines se situaient surtout dans les enveloppes des fruits. Ce résultat suggère que les enveloppes sont une protection mécanique mais aussi chimique pour les embryons : les furocoumarines contenues dans les enveloppes non seulement protègent les embryons d'éventuelles attaques d'herbivores ou de microorganismes (Berenbaum et Zangerl, 1986) mais aussi inhibent la germination de plantes éventuellement concurrentes (Baskin *et al.*, 1967a). Dans le compartiment FEUILLE, nous avons pu mettre en évidence une forte concentration en furocoumarines dans les nervures, puis dans les plages intercostales, par rapport aux tissus porteurs (pétioles foliaires et tiges). Ces zones des feuilles sont des lieux privilégiés de stockage des furocoumarines et peut-être des lieux de synthèse de ces métabolites. L'analyse des racines nous a révélé que ce compartiment contient un fort pourcentage d'isopimpinelline. Cette furocoumarine bi-substituée a des propriétés toxiques indépendantes de la lumière (Ivie et Beier, 1996) et permettrait donc de conserver l'efficacité de la défense de la plante, dans un environnement obscur comme celui du sol.

Nous avons observé que les plantes cultivées en serre ou en phytotrons ont des teneurs 2 à 3 fois supérieures à celles des plantes prélevées au champ. Plus précisément, les teneurs absolues et relatives en bergaptène diminuent dans les plantes cultivées en conditions contrôlées alors que les teneurs et pourcentages en psoralène et en xanthotoxine augmentent. Chez *Ruta chalepensis*, il a déjà été observé que les teneurs des plantes cultivées en serre sont supérieures à celles des plantes cultivées au champ, mais ce fait n'a pas été expliqué par l'auteur (Zobel, 1991). Nous pouvons néanmoins noter que les plantes en pot sont de taille extrêmement réduite par rapport aux plantes de pleine terre. La dilution des métabolites secondaires dans des plantes plus petites pourrait être plus faible. De plus, les biomasses des plantes cultivées au champ et en conditions contrôlées n'ont pas été séchées avec le même procédé. Nous avons en effet montré que la lyophilisation, utilisée pour sécher les échantillons des cultures contrôlées, préserve mieux les furocoumarines (chapitre **B**, p 47).

Après avoir mieux caractériser la production de furocoumarines dans notre plante modèle, nous avons poursuivi

l'étude en déterminant les effets de la conduite culturale sur la production afin de déterminer quels facteurs pourraient améliorer le rendement.

2. ETUDE DE LA PRODUCTION DE FUROCOUMARINES AU CHAMP : EFFETS DE FACTEURS AGRONOMIQUES

Un des objectifs de nos investigations est de connaître les potentialités de la culture de Rue officinale pour la bio-production de furocoumarines. Les résultats présentés dans ce chapitre ont pour but d'évaluer l'effet de certaines pratiques culturales telles que la fertilisation azotée, la densité de peuplement, l'effet de coupes successives des plantes ou le choix du stade de récolte, afin de connaître la réponse sur le rendement en furocoumarines. Pour cela, nous avons mis en place un champ de Rue officinale de 1 hectare (Soings-en-Sologne), qui a été suivi pendant 3 années, et une parcelle située sur un autre site géographique (La Bouzule).

Deux modalités de densité ont été testées : **15 000** et **30 000** plantes par hectare. Trois modalités de coupe ont été pratiquées sur une période de 4 ans : AUCUNE COUPE, 1 COUPE PAR AN et 1 COUPE PAR AN SAUF L'ANNEE DE PLANTATION (1997). Ces différents traitements ont été suivis :

- sur tous les compartiments de la plante : FRUIT, FEUILLE, TIGE, RACINE,
- sur 3 stades de développement de la plante : stade végétatif, stade fructification, stade suivant la chute des fruits,
- sur 3 années : 1998, 1999, 2000, au stade fructification.

Les modalités de densité, de coupe et de date de récolte sont décrites en détail dans la **Figure B-3**, p 40 (coupes et prélèvements), dans la **Figure B-4**, p 40 (découpage des plantes prélevées) et dans le **Tableau B-5**, p 40 (récapitulatif chronologique des modalités et du nombre de répétitions par modalité). Cet essai sera appelé essai MULTIFACTORIEL dans la suite du mémoire.

2.1. VALIDATION DU PLAN D'ESSAI (ESSAI MULTIFACTORIEL)

Comme le montre la **Figure B-3** (p 40) qui schématise les interventions culturales au champ, l'essai a été mis en place sans modalité bloc, dans le but de faciliter les travaux au champ. Cet essai a été implanté en mai 1997, avant le début de la thèse. Sur une parcelle de 1 hectare, de dimensions 25m x 400m, le risque d'observer une hétérogénéité est important. Ainsi, lorsque nous avons pris possession de la parcelle, au début du doctorat, nous avons commencé par estimer son homogénéité.

Pour cela, nous avons prélevé 64 plantes sur la parcelle soit 16 plantes par densité (15 000 et 30 000 pl./ha) et par date (avril et juillet 1998). Ces 16 plantes ont été prélevées par groupe de 4 plantes à 4 points de prélèvements (**Figure B-3**, p 40).

Le facteur POINT DE PRELEVEMENT a été traité statistiquement afin de vérifier s'il pouvait avoir un effet sur les 8 variables suivantes : le poids de matière sèche (PMS) et la teneur en furocoumarines (TEN) des 4 compartiments (FRUIT, FEUILLE, TIGE, RACINE). Parmi toutes les analyses de variance effectuées (28), seulement 5 ANOVA montrent un effet significatif du point de prélèvement : sur deux des variables pour la densité 15 000 pl./ha[a] et sur 3 des variables pour la densité 30 000 pl./ha[b]. Compte tenu de ces résultats, nous avons considéré que la parcelle était

[a] *TEN racines en avril 98 et TEN fruits en juillet 98*
[b] *TEN tiges et racines en avril 98 et PMS tiges en juillet 98*

Figure C-11 : Hauteurs des compartiments (avril, juillet et octobre 1998).

Plantes prélevées au champ (Soings-en-Sologne) en avril (stade végétatif), juillet (stade fructification) et octobre 1998 (stade suivant la chute des fruits), aux densités de 15 000 et 30 000 pl./ha.

r = 104 répétitions par traitement.

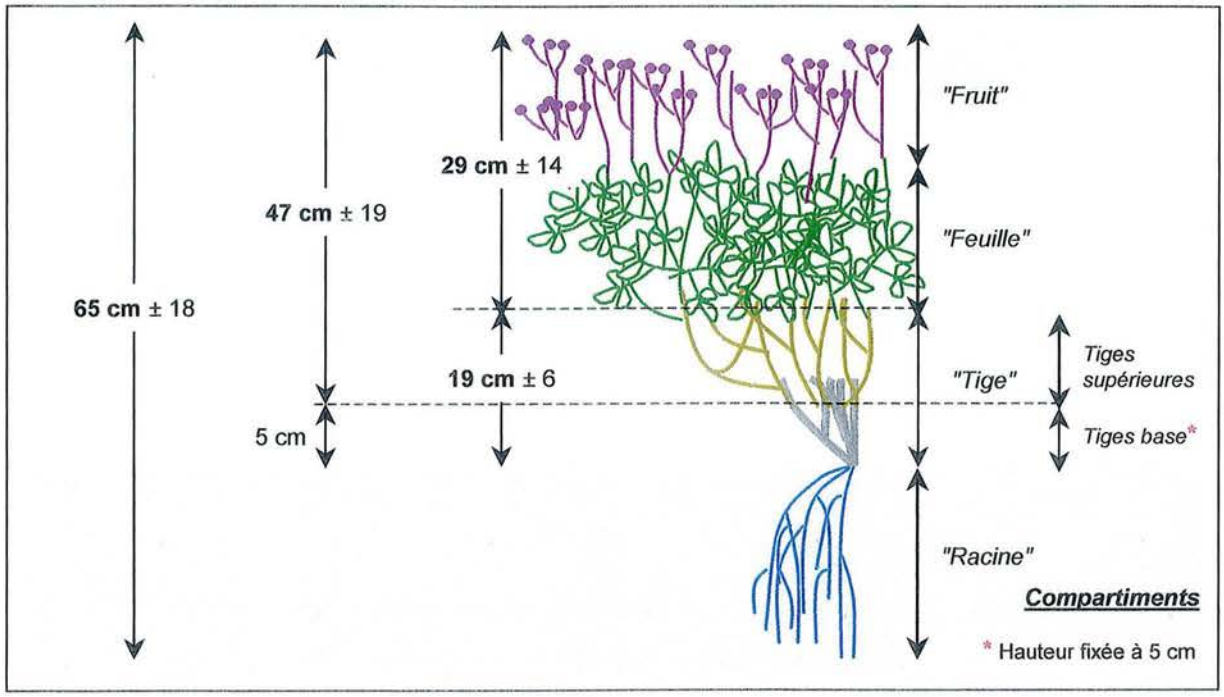
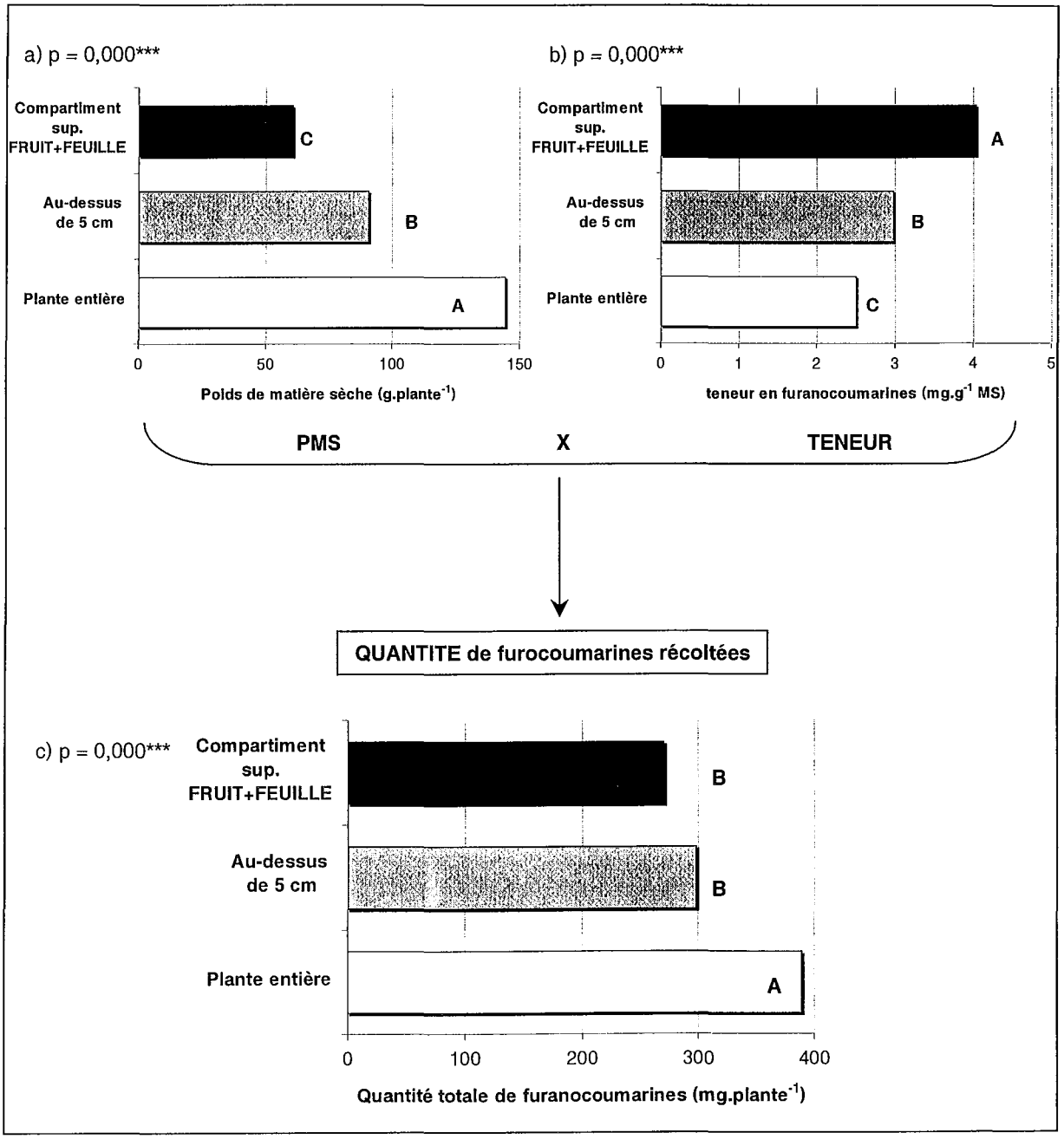


Figure C-12 : Effet de la hauteur de prélèvement sur le poids de matière sèche (a), la teneur (b) et la quantité de furocoumarines (c).

Plantes prélevées au champ (Soings-en-Sologne) en avril (stade végétatif), juillet (stade fructification) et octobre 1998 (stade suivant la chute des fruits), aux densités de 15 000 et 30 000 pl./ha.

r = 104 répétitions par traitement.



homogène.

Comme le nombre de modalités et de facteurs augmentaient les années suivantes, nous avons voulu réduire le nombre de plantes prélevées pour la suite des études. A partir des données obtenues ci-dessus, nous avons déterminé le nombre de répétitions nécessaires pour garder une bonne résolution du système. Selon l'abaque figurant dans l'**Annexe 8**, le nombre de répétitions à adopter, pour un risque de première espèce de 5%, est :

$$N = (2 \times CV / P)^2$$

où N = taille de l'échantillon

CV = coefficient de variation (%)

P = précision désirée (% de la moyenne)

Le coefficient de variation (CV) des 28 variables mesurées est en moyenne de 30% (% écart-type/moyenne). Avec 16 répétitions, nous pouvons mettre en évidence une différence de 15% entre les moyennes. Au niveau de la production au champ, une différence de 25% nous est apparue suffisante : ainsi, un traitement sera considéré comme meilleur s'il induit une augmentation de 25% de la production de furocoumarines. En revanche, s'il induit une augmentation inférieure à 25% de la moyenne, le traitement sera considéré comme équivalent au témoin.

La précision de 25%, avec un coefficient de variation de 30% de la variable étudiée, est atteinte avec 6 répétitions (au risque de 5%). Nous avons ainsi adopté 6 répétitions par traitement aux récoltes suivantes.

2.2. CHOIX DE LA HAUTEUR DE PRELEVEMENT

Dans le cas d'une exploitation de la Rue pour la production de furocoumarines, les plantes seraient récoltées sans les racines. De plus, la hauteur de coupe devrait être fixée. Il s'agit ici de savoir si le niveau de prélèvement modifie fortement la quantité de furocoumarines récoltées, en d'autres termes de savoir quelle partie de la plante doit être récoltée pour obtenir un maximum de furocoumarines.

Nous avons fait l'analyse sur la période avril 1998-octobre 1998, sur 104 plantes récoltées. Les plantes ont été prélevées avec les racines : tous les compartiments (FRUIT, FEUILLE, TIGE et RACINE) ont ainsi été analysés.

Comme le montre la **Figure C-11** décrivant le découpage des plantes prélevées au champ, nous avons traité le compartiment TIGE en 2 sous-compartiments : les tiges supérieures et les tiges de la base. La séparation entre ces 2 sous-compartiments a été faite à 5 cm du sol. Cette hauteur de 5 cm simule des récoltes réalisées au champ avec la barre de coupe (matériel agricole).

Sur la période considérée, la morphologie des plantes se présente de la manière suivante : les plantes prélevées en avril, juillet et octobre 1998, mesurent en moyenne 65 cm (**Figure C-11**). La récolte de la partie FRUIT+FEUILLE entraînerait une coupe à 19 cm du sol (**Figure C-11**).

La production de matière sèche, la teneur et la quantité totale de furocoumarines sont significativement modifiées par la hauteur de prélèvement (**Figure C-12**):

- la partie AU-DESSUS DE 5 CM représente 63% de la matière sèche totale de la plante et le compartiment

FRUIT+FEUILLE 42%,

- la teneur du compartiment FRUIT+FEUILLE est plus élevée que celle de la partie AU-DESSUS DE 5 CM et de la plante complète (**Figure C-12**),

- la partie AU-DESSUS DE 5 CM contient 77% de la quantité totale des furocoumarines de la plante et le compartiment FRUIT+FEUILLE 70%. Il est important de souligner que la quantité de furocoumarines stockée dans le compartiment FRUIT+FEUILLE n'est pas significativement différente de celle stockée dans la partie AU-DESSUS DE 5 CM.

Le prélèvement du compartiment FRUIT+FEUILLE des plantes conduit à récolter 70% de la quantité totale de furocoumarines synthétisées dans la plante, en se limitant à 42% de la matière sèche. Ce compartiment a une forte teneur en furocoumarines.

Les plantes prélevées pour étudier les effets des facteurs agronomiques ont été récoltées dans leur intégralité, c'est-à-dire avec les racines. Cependant, nous ne présenterons le plus souvent que les résultats du compartiment FRUIT+FEUILLE.

2.3. CHOIX DE LA DATE DE RECOLTE

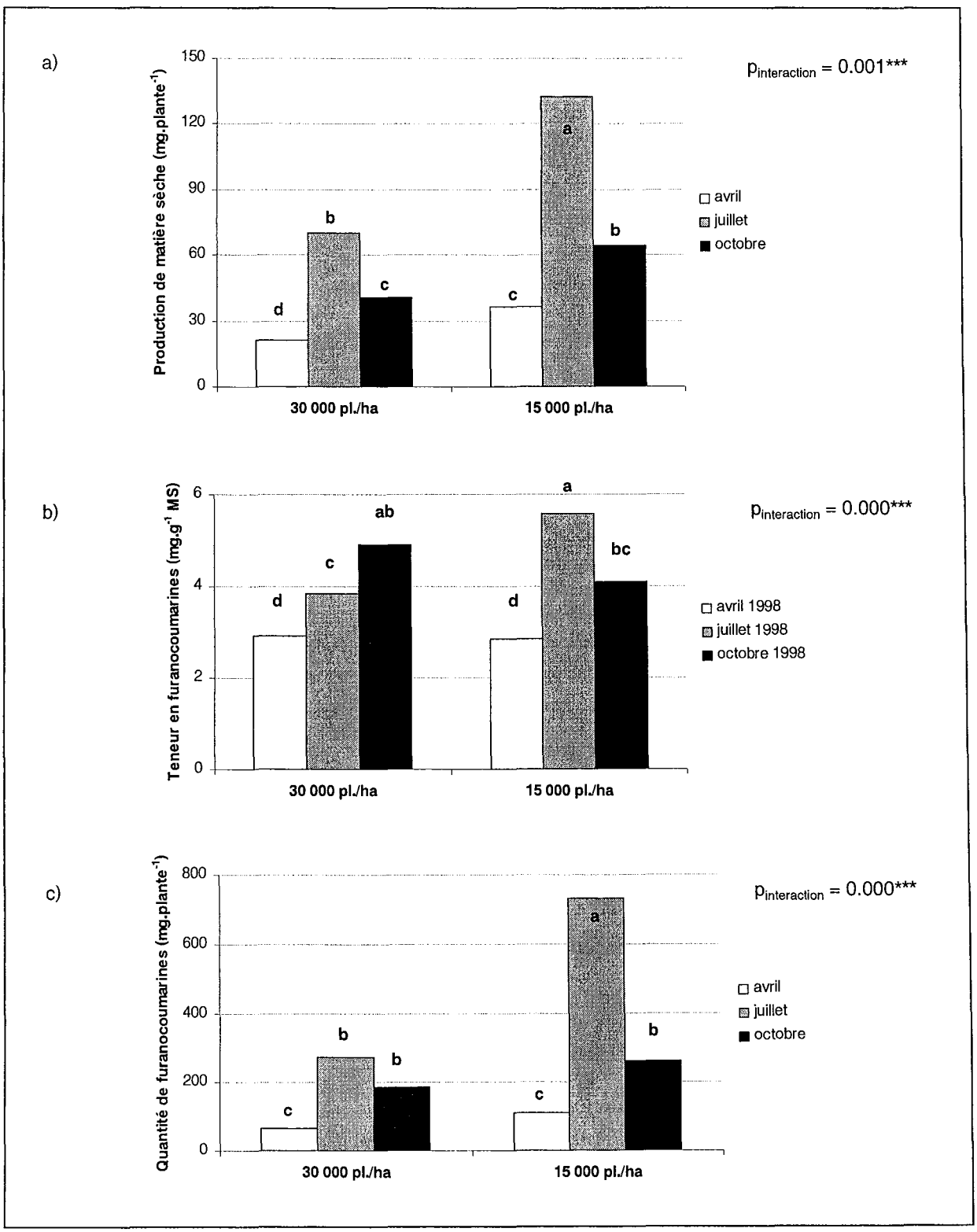
Le choix de la date de récolte est déterminé par le stade phénologique auquel on veut récolter les plantes. Nous avons déjà montré l'effet du stade phénologique sur la production de furocoumarines, dans la partie précédente (paragraphe **C.1.3**, p 65), mais seulement pour des plantes non coupées et cultivées à la densité 15 000 pl./ha. Les prélèvements ont en réalité été effectués sur les deux densités étudiées (15 000 et 30 000 pl./ha) et sur deux modalités de coupe (plantes coupées et non coupées). Dans le paragraphe **C.1.3**, les effets avaient été analysés sur les 4 compartiments des plantes. Ici, nous présentons seulement les résultats obtenus sur le compartiment "d'intérêt agronomique" c'est-à-dire le compartiment FRUIT+FEUILLE.

Pour toutes modalités de coupes et densités traitées ensembles, les plantes récoltées en juillet produisent significativement plus de matière sèche que les plantes récoltées aux deux autres dates (**Tableau C-3** et **Figure C-13a**, page suivante). Ceci confirme les résultats obtenus dans le paragraphe **C.1.3** *(Variation de la production de furocoumarines en fonction du stade phénologique de la plante)*. En juillet, le poids de matière sèche du compartiment FRUIT+FEUILLE est 4,3 fois plus élevé qu'en avril et 1,6 fois plus qu'en octobre (**Tableau C-3**, page suivante).

Figure C-13 : Interaction des facteurs DENSITE et DATE DE RECOLTE sur la production de matière sèche (a), la teneur (b) et la quantité totale (c) de furocoumarines dans le compartiment FRUIT+FEUILLE.

Plantes prélevées au champ (La Noue/La Gitinière, Soings-en-Sologne) en avril (stade végétatif), juillet (stade fructification) et octobre 1998 (stade suivant la chute des fruits), aux densités de 15 000 et 30 000 pl./ha. Plantes coupées et non coupées.

r = 20 répétitions en avril et juillet et 12 en octobre, pour chaque densité.



	Date de récolte (stade)			probabilité	Interactions significatives
	Avril 98	Juillet 98	Octobre 98		
Production de matière sèche g.plante^{-1}	**C** 20	**A** 85	**B** 52	*p= 0,000****	*Densité x Date****
Teneur en furocoumarines mg.g^{-1} MS	**B** 2,4	**A** 4,9	**A** 4,5	*p= 0,000****	*Densité x Date *** *Coupe x Date ****
Quantité de furocoumarines mg.plante^{-1}	**C** 59	**A** 440	**B** 220	*p= 0,000****	*Densité x Date ****
N	*40*	*40*	*24*		

Tableau C- 3 : Effet de la date de récolte sur la production de matière sèche, la teneur et la quantité de furocoumarines par la Rue dans le compartiment FRUIT+FEUILLE

Valeurs sur des plantes coupées et non coupées et cultivées à 2 densités (15 et 30 000 pl./ha)

N = nombre de plantes sur lesquelles sont calculées les moyennes des variables étudiées

Plantes récoltées en 1998 au champ (exploitation agricole La Noue/La Gitinière, Soings-en-Sologne).

Pour toutes les modalités coupes et densités traitées ensembles, la teneur en furocoumarines du compartiment FRUIT+FEUILLE est significativement plus élevée en juillet et octobre 1998 : environ 2 fois plus qu'en avril (**Tableau C-3**). Ce résultat est différent de celui obtenu dans le paragraphe **C.1.3**. La teneur est plus élevée en juillet pour les plantes cultivées à la densité 15 000 pl./ha (**Figure C-13b**). En revanche, elle est supérieure en octobre pour les plantes de la densité 30 000 pl./ha (**Figure C-13b**).

La quantité totale de furocoumarines dans le compartiment FRUIT+FEUILLE est significativement plus élevée en juillet (**Tableau C-3**) : 7 fois plus qu'en avril et 2 fois plus qu'en octobre. Même si la différence n'est pas significative pour la densité 30 000 pl./ha (**Figure 13c**), la production tend à être plus élevée en juillet.

Les variables caractérisant la production de furocoumarines dans la plante sont plus élevées au stade fructification qu'aux deux stades végétatifs étudiés pour toutes les modalités densités et coupes testées ensembles. Dans notre essai, le stade fructification correspond à une récolte en juillet. Les prélèvements suivants ont donc été effectués à ce stade.

2.4. EFFET DE COUPES SUR LA REPOUSSE D'UNE PLANTE

2.4.1. Effet d'une coupe à 5 cm

Nous avons voulu connaître l'effet d'une coupe (mimant la récolte des plantes), à 5 cm du sol, sur des Rues cultivées au champ afin de mimer l'effet d'une récolte des plantes. Deux types de plantes ont été récoltés en juillet 1998 :

- des plantes témoins, n'ayant pas subi de coupe depuis leur plantation en avril 1997,
- des plantes ayant subi une coupe à 5 cm en octobre 1997, soit 6 mois après la plantation.

Quelle que soit la densité, le facteur coupe diminue le poids de matière sèche de la plante entière et des compartiments FRUIT, FEUILLE et TIGE (**Figure C-14 *PMS***, page suivante). Les plantes ayant subi une coupe ont un poids de matière sèche supérieur de 60% à celui des plantes récoltées à la même date (juillet 1998) mais qui

Figure C-14 : Effet d'une coupe à 5 cm sur le poids de matière sèche et la quantité de furocoumarines de plantes récoltées au stade fructification (juillet 1998).

Plantes cultivées au champ (Soings-en-Sologne), aux densités de 15 000 et 30 000 pl./ha.

Pas de coupe : plantes cultivées depuis avril 1997, récoltées en juillet 1998 ; r = 32 répétitions.

Coupe : plantes cultivées depuis avril 1997, coupées en octobre 1997 et récoltées en juillet 1998 ; r = 8 répétitions.

*Analyse de variance facteur-coupe : effet hautement significatif (p < 0.001***) pour tous les compartiments où figurent les groupes homogènes (lettres). - = non significatif.*

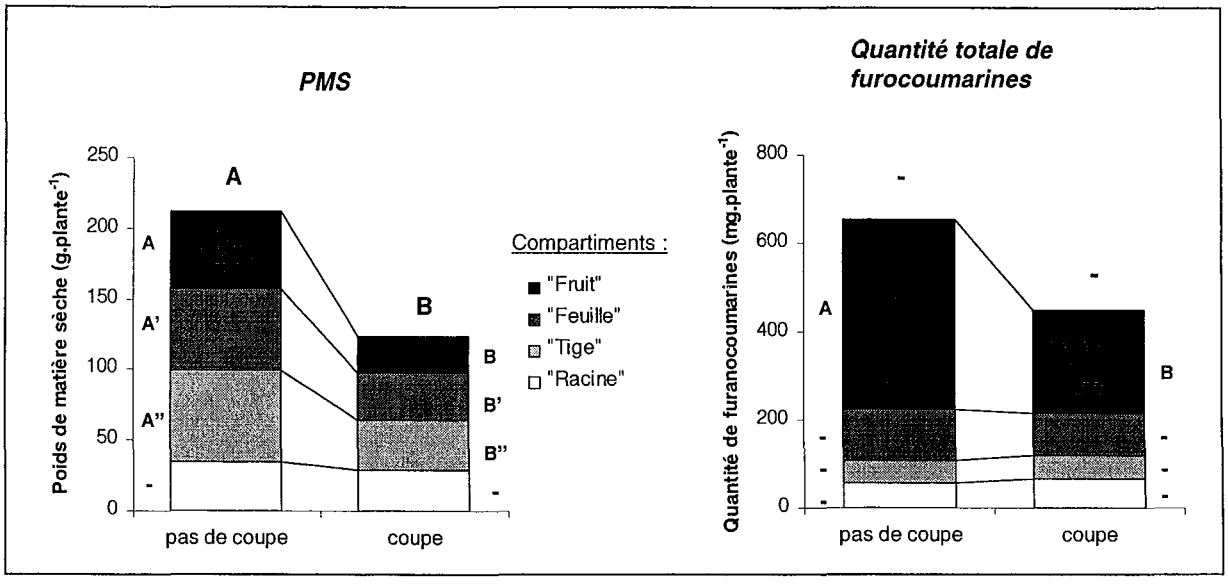


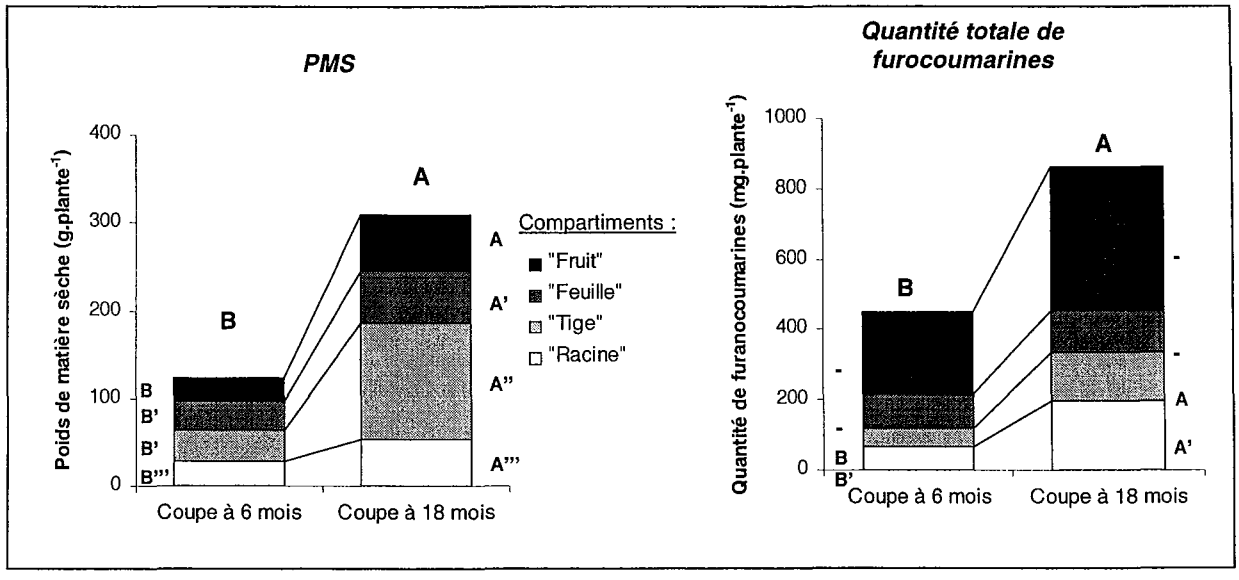
Figure C-15 : Effet de l'âge de la plante lors de la première coupe sur le poids de matière sèche et la quantité de furocoumarines de plantes récoltées au stade fructification (juillet).

Plantes cultivées au champ (Soings-en-Sologne) depuis avril 1997, aux densités de 15 000 et 30 000 pl./ha.

Coupe à 6 mois : plantes coupées en octobre 1997 et récoltées en juillet 1998 ; r = 8 répétitions.

Coupe à 18 mois : plantes coupées en octobre 1998 et récoltées en juillet 1999 ; r = 12 répétitions.

*Analyse de variance facteur-âge : effet hautement significatif (p < 0.001***) pour tous les compartiments où figurent les groupes homogènes.*



n'avaient pas subi de coupe 9 mois plus tôt.

En revanche, la teneur en furocoumarines est augmentée par le traitement coupe. Les compartiments FEUILLE, TIGE et RACINE des plantes ayant subi une coupe ont des teneurs 1,3 à 1,8 fois plus élevées que celles des plantes témoins (**Tableau C-4**).

	Témoin	Coupe	TEN $_{coup}$ / TEN $_{Témoin}$	*Effet*
FRUIT	-	-	**x 1,1**	*NS*
mg.g^{-1} MS	7,3	8,3		
FEUILLE	B	A	**x 1,3**	*p = 0,027**
mg.g^{-1} MS	2,1	2,8		
TIGE	B	A	**x 1,8**	*p = 0,000****
mg.g^{-1} MS	0,8	1,5		
RACINE	B	A	**x 1,4**	*p = 0,022***
mg.g^{-1} MS	1,6	2,3		
N	*32*	*8*		

Tableau C- 4 : Effet d'une coupe à 5 cm sur la teneur en furocoumarines dans les 4 compartiments de la plante : Fruit, Feuille, Tige, Racine

Plantes cultivées à 15 000 et 30 000 pl./ha, plantation en avril 1997

N = nombre de plantes sur lesquelles sont calculées les moyennes de la variable étudiée

Plantes récoltées en 1998 au champ (exploitation agricole La Noue/La Gitinière, Soings-en-Sologne).

Il n'y a pas d'effet significatif de la coupe sur la quantité totale de furocoumarines dans la plante (**Figure C-14 *Quantité de furocoumarines***). En revanche, la quantité de furocoumarines produites dans le compartiment FRUIT, compartiment le plus riche, est significativement plus élevée chez les plantes coupées.

Par conséquent, en terme de matière sèche, les plantes coupées n'ont pas rattrapé les plantes témoins après la repousse. En revanche, la coupe a favorisé la synthèse des furocoumarines (augmentation de la teneur). Il n'y a pas d'effet significatif de la coupe sur la quantité totale de furocoumarines dans la plante

2.4.2. Effet de l'âge de la plante lors de la première coupe

Nous avons voulu savoir si l'âge des plantes à la première coupe avait un effet sur la repousse des plantes et sur la production de furocoumarines. Une coupe à 5 cm a été pratiquée soit 6 mois après la plantation (octobre 1997) soit 18 mois après la plantation (octobre 1998). Dans les 2 cas, le prélèvement des plantes a été effectué 9 mois après la coupe, c'est-à-dire au stade fructification.

La production de matière sèche est significativement plus élevée chez les plantes ayant subi la coupe à un âge plus avancé (**Figure C-15, PMS**). En revanche, la teneur en furocoumarines dans les compartiments FRUIT, FEUILLE et TIGE est significativement plus élevée pour les plantes qui ont subi la coupe à un stade plus jeune (**Tableau C-5**, page suivante).

Globalement, les plantes coupées à l'âge de 18 mois stockent significativement plus de furocoumarines que les plantes coupées à 6 mois (**Figure C-15, *quantité totale***).

	Coupe $_{6\ mois}$	Coupe $_{18\ mois}$	TEN $_{6\ mois}$ / TEN $_{18\ mois}$	*Effet*
FRUIT mg.g^{-1} MS	A 8,3	B 6,0	**x 1,4**	*p = 0,000***
FEUILLE mg.g^{-1} MS	A 2,8	B 2,0	**x 1,4**	*p = 0,001***
TIGE mg.g^{-1} MS	A 1,5	B 1,0	**x 1,4**	*p = 0,000***
RACINE mg.g^{-1} MS	B 2,3	A 3,7	**x 0,6**	*p = 0,000***
N	*12*	*8*		

Tableau C- 5 : Effet de l'âge de la plante lors de la première coupe, sur la teneur en furocoumarines dans les 4 compartiments de la plante : Fruit, Feuille, Tige, Racine

Plantes cultivées à 15 000 et 30 000 pl./ha, plantation en avril 1997, coupe réalisée 9 mois avant le prélèvement (coupe $_{6\ mois}$ en octobre 1997 et coupe $_{18\ mois}$ en octobre 1998)

N = nombre de plantes sur lesquelles sont calculées les moyennes de la variable étudiée

Plantes prélevées en juillet 1998 (traitement 6 mois) et juillet 1999 (traitement 18 mois), au champ (Soings-en-Sologne).

L'âge de la plante au moment de la coupe influence la repousse. Les plante ayant subi une coupe à un âge plus avancé produisent 2,5 fois plus de matière sèche. La teneur en furocoumarines est plus élevée pour les plantes ayant subi la première coupe plus tôt : le stress de la coupe est donc plus important pour ces plantes. Globalement, les plantes coupées à un âge plus avancé contiennent plus de furocoumarines.

2.4.3. Conclusion

Nous venons de montrer que la repousse d'une plante ne suffit pas à compenser la matière sèche qui a été coupée l'année précédente. Cette repousse peut être améliorée si la coupe n'est pas pratiquée la première année de plantation, mais l'année suivante. En revanche, la teneur en furocoumarines augmente après une coupe, et d'autant plus si la coupe a été pratiquée tôt dans la vie de la plante : une coupe semble être un facteur de stress qui favorise la production de phytoalexines telles que les furocoumarines.

Dans le paragraphe suivant, nous avons aussi suivi l'effet coupe sur la production de furocoumarines mais, cette fois-ci, les coupes sont répétées pendant 3 années consécutives et pour les 2 densités étudiées.

2.5. EFFET COMBINE DE 2 FACTEURS (DENSITE ET COUPES REPETEES) SUIVI SUR 3 ANNEES DE CULTURES

Nous avons vu que les plantes ayant subi une coupe ne rattrapent pas les plantes témoins au niveau de la production de matière sèche après 9 mois de repousse (**Figure C-14**). Cependant, les plantes ayant subi la coupe à la deuxième année de culture présentent une repousse plus importante que celles l'ayant subi l'année de la plantation (**Figure C-15**). Trois interrogations se posent à la vue de ces résultats :

- Les plantes ayant subi la coupe durant la deuxième année de culture ont-elles rattrapé les plantes témoins ?
- Comment réagissent les plantes à des coupes répétées chaque année ?

• Lorsque les coupes se répètent, est-il préférable de commencer les récoltes à partir de la deuxième année de culture ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons récolté des plantes pendant 3 ans. Ces plantes avaient subi 3 traitements coupe : AUCUNE COUPE, 1 COUPE PAR AN, 1 COUPE PAR AN SAUF L'ANNEE DE PLANTATION (1997) pour chacune des 2 densités étudiées. Les variables PMS[a], teneur, quantité, rendement et productivité annuelle, ont été suivies et analysées dans tous les compartiments de la plante. Cependant, tous les résultats ne seront pas présentés ici par soucis de concision. Nos résultats se concentreront sur le compartiment FRUIT+FEUILLE, qui contient le plus de molécules, comme nous l'avons vu précédemment.

Les plantes ont été récoltées au stade fructification, puisque nous avons montré que ce stade induit la plus forte production de furocoumarines.

2.5.1. Variables caractérisant la production à l'échelle de la plante (PMS, teneur, quantité par plante et décomposition de la production)

a. Poids de matière sèche

La production de matière sèche a été mesurée pendant 3 ans sur des plantes ayant été coupées et des plantes témoins. Globalement, le facteur coupe n'a pas d'effet significatif sur la production de matière sèche (**Tableau C-6**, page suivante). En d'autres termes, la quantité de matière sèche produite lors de la période de repousse des plantes a permis de compenser la matière coupée, pour revenir au niveau des plantes non coupées. Cette observation est contraire à l'effet négatif de la coupe que nous avions mis en évidence dans le paragraphe précédent (*Effet de coupes sur la repousse d'une plante*). L'âge de la plante lors de la première coupe n'a pas eu d'effet non plus sur la repousse (pas de différence significative entre les modalités 1 COUPE PAR AN et 1 COUPE PAR AN SAUF L'ANNEE DE PLANTATION).

Les facteurs densité et année de récolte ont un effet significatif sur le poids de matière sèche produit dans le compartiment FRUIT+FEUILLE (**Tableau C-6**). Globalement, les plantes cultivées à la densité la plus faible ont un poids de matière sèche significativement plus élevé que pour la densité la plus forte. La production de matière sèche du compartiment FRUIT+FEUILLE augmente après 2 ans de culture : en 1999 et 2000, elle est 2 fois supérieure à 1998 (**Tableau C-6**).

La variation de la densité de peuplement agit principalement sur le niveau de compétition entre les plantes. Cette compétition a lieu à différents niveaux : compétition pour l'espace, la lumière, les nutriments et l'eau. Les plantes cultivées à la densité la plus forte sont 2 fois plus nombreuses que celles de la plus faible densité. Les compétitions entre plantes y sont donc plus fortes et se reflètent sur la production de biomasse (1,7 fois plus faible).

[a] *PMS = poids de matière sèche*

Facteurs	Densité		Coupe			Année de récolte			Interactions
Modalités	d15	d30	*aucune coupe*	*1 coupe par an*	*1 coupe par an sauf 1997*	1998	1999	2000	significatives
FRUIT+FEUILLE	*p= 0,000****		*p= NS*			*p= 0,000****			1x2x3**
	A	B	-	-	-	B	A	A	1x2**, 1x3***
g.plante^{-1}	150	88	120	110	120	94	130	130	2x3***
N	*69*	*66*	*56*	*26*	*53*	*72*	*36*	*27*	

Tableau C- 6 : Effets des facteurs densité, coupe et année de récolte sur la production de matière sèche par la Rue, dans le compartiment supérieur FRUIT+FEUILLE

d15 = 15000pl./ha, d30 = 30000pl./ha ; 1997 = année de plantation

N = nombre de plantes sur lesquelles sont calculées les moyennes de la variable étudiée

Plantes cultivées au champ (Soings-en-Sologne).

b. Teneur en furocoumarines

Les facteurs coupe et densité n'ont pas d'effet significatif sur la teneur en furocoumarines (**Tableau C-7**). Dans un paragraphe précédent (**Tableau C-4**), nous avions observé un effet "éliciteur" de la coupe sur la teneur en furocoumarines en 1998. Cet effet ne s'est donc pas confirmé pour les années suivantes (1999 et 2000, **Tableau C-7**).

En revanche, il y a un effet de l'année de récolte sur la teneur en furocoumarines (**Tableau C-7**). Pour toutes les modalités densités et coupes traitées ensembles, la teneur dans le compartiment FRUIT+FEUILLE atteint un maximum de 6,8 mg.g^{-1} MS en 2000 (**Tableau C-7**).

Facteurs	Densité		Coupe			Année de récolte			Interactions
Modalités	d15	d30	*aucune coupe*	*1 coupe par an*	*1 coupe par an sauf 1997*	1998	1999	2000	significatives
FRUIT+FEUILLE	*p= NS*		*p= NS*			*p= 0,000****			
	-	-	-	-	-	B	C	A	1x3***
mg.g^{-1} MS	5,4	5,0	5,0	5,6	5,0	4,8	4,1	6,8	
N	*69*	*66*	*56*	*26*	*53*	*72*	*36*	*27*	

Tableau C- 7 : Effets des facteurs densité, coupe et année de récolte sur la teneur en furocoumarines dans le compartiment supérieur FRUIT+FEUILLE chez la Rue officinale

d15 = 15000pl./ha, d30 = 30000pl./ha ; 1997 = année de plantation

N = nombre de plantes sur lesquelles sont calculées les moyennes de la variable étudiée

Plantes cultivées au champ (Soings-en-Sologne).

c. Quantité de furocoumarines par plante

La densité modifie significativement la quantité de furocoumarines par plante (**Tableau C-8**, page suivante). Les plantes cultivées à la densité 15 000 pl./ha contiennent significativement plus de furocoumarines que celles cultivées à la densité 30 000 pl./ha (**Tableau C-8**).

La production de furocoumarines augmente pendant les 3 années de cultures (de 470 à 870 mg par plante). Elle est significativement plus forte en 2000 (**Tableau C-8**, page suivante).

Facteurs	Densité		Coupe			Année de récolte			Interactions significatives
Modalités	d15	d30	*aucune coupe*	*1 coupe par an*	*1 coupe par an sauf 1997*	1998	1999	2000	
FRUIT+FEUILLE	*p= 0,000****			*p= NS*		*p= 0,000****			1x3*** 2X3**
	A	B	-	-	-	B	B	A	
mg.plante^{-1}	820	450	650	630	640	470	570	870	
N	*69*	*66*	*56*	*26*	*53*	*72*	*36*	*27*	

Tableau C- 8 : Effets des facteurs densité, coupe et année de récolte sur la quantité de furocoumarines stockées dans le compartiment supérieur FRUIT+FEUILLE chez la Rue

d15 = 15000pl./ha, d30 = 30000pl./ha ; 1997 = année de plantation

N = nombre de plantes sur lesquelles sont calculées les moyennes de la variable étudiée

Plantes cultivées au champ (Soings-en-Sologne).

d. Décomposition de la production

Jusqu'à présent, la quantité totale de furocoumarines dans la plante a été décomposée en 2 termes : la teneur et le poids de matière sèche. Afin de mieux expliquer les effets des facteurs densité et coupe sur la production de furocoumarines et la morphologie de la plante, nous avons pratiqué une décomposition plus fine de la production.

Pour le compartiment FRUIT, la quantité de furocoumarines produites peut être décomposée à l'aide des variables suivantes :

$$\text{Quantité furocoumarines}_{\text{dans le compartiment FRUIT}}$$

$$= [\text{nb de fruits/tige}] \times [\text{nb de tiges/plantes}] \times [\text{PMS/fruit}] \times [\text{teneur furocoumarines}_{\text{dans le compartiment Fruit}}]$$

Ainsi, pour la récolte 2000, nous avons étudié l'effet des facteurs densité et coupe sur le nombre de fruits par plante, le nombre de tiges par plante, le poids moyen d'un fruit (capsule + pédoncule + graines).

Globalement, les plantes de la densité la plus faible produisent significativement plus de furocoumarines (3 fois plus que la densité 30 000 pl./ha). La décomposition de la production montre que la densité n'a pas d'effet sur le poids unitaire des fruits et la teneur en furocoumarines. En revanche, la densité influence significativement le nombre de fruits par plante et le nombre de fruits par tige (**Tableau C-9**, page suivante). En effet, la densité la plus faible (15 000 pl./ha) produit environ 3 fois plus de fruits par plante et 2 fois plus de fruits par tige que la plus forte densité.

Les analyses statistiques n'ont pas montré d'effet significatif du facteur coupe sur la quantité de furocoumarines dans le compartiment FRUIT. Nous avons cependant observé que le facteur coupe a un effet sur le nombre de fruits par tige (**Tableau C-9**): les plantes coupées possèdent 60% de fruits en plus par tige par rapport aux plantes non coupées. En revanche, ces fruits ont un poids individuel et une concentration en furocoumarines semblable à ceux des plantes non coupées (**Tableau C-9**).

Facteurs	Densité		Coupe	
Modalités	15 000 pl./ha	30 000 pl./ha	*AUCUNE COUPE*	*1 COUPE /AN SAUF 1997*
nb fruits/plante	*p= 0,001****		*p= **NS***	
unités.plante^{-1}	1560 (**A**)	570 (**B**)	1040	1080
nb tiges/plante	*p= **NS***		*p= **NS***	
unités.plante^{-1}	83	56	80	59
nb fruits/tige (calculé)	*p= 0,003***		*p= 0,031**	
unités.tige^{-1}	21 (**A**)	10 (**B**)	12 (**B**)	19 (**A**)
PMS/fruit	*p = **NS***		*p = **NS***	
mg.fruit^{-1}	65	60	60	65
Teneur furocoumarines	*p = **NS***		*p = **NS***	
mg.g^{-1} MS	10,9	10,0	10,1	10,7
Quantité furocoumarines	*p = 0,029**		*p = **NS***	
mg dans le compartiment FRUIT	970 (**A**)	310 (**B**)	660	450
N	*6*	*6*	*6*	*6*

Tableau C- 9 : Décomposition du rendement en furocoumarines dans le compartiment FRUIT : effet des facteurs densité et coupe sur les plantes récoltées en 2000

d15 = 15000pl./ha, d30 = 30000pl./ha ; 1997= année de plantation

N = nombre de plantes sur lesquelles sont calculées les moyennes de la variable étudiée

Plantes cultivées en 2000, au champ (Soings-en-Sologne).

Le facteur coupe n'influence pas significativement les variables qui caractérisent la production de furocoumarines à l'échelle de la plante. Ainsi, la récolte des plantes ne pénalise pas la production de furocoumarines. La coupe a pour seul effet de ramifier les plantes puisque le nombre de tiges par plante est significativement plus grand pour les plantes coupées.

La densité la plus faible produit plus de matière sèche et plus de furocoumarines que la densité la plus forte. En revanche, l'effet de la densité ne se rapporte pas à la teneur. En 2000, la décomposition fine de la quantité de furocoumarines produite dans le compartiment FRUIT montre que l'effet de la densité ne se reflète pas non plus sur le poids unitaire des fruits. Ce facteur influence significativement le nombre de fruits par plante et par tige .

Les variables qui caractérisent la production de furocoumarines dans la plante augmentent au cours des 3 années considérées. Par conséquent, même si les récoltes se poursuivent plusieurs années, la production de furocoumarines ne diminue pas.

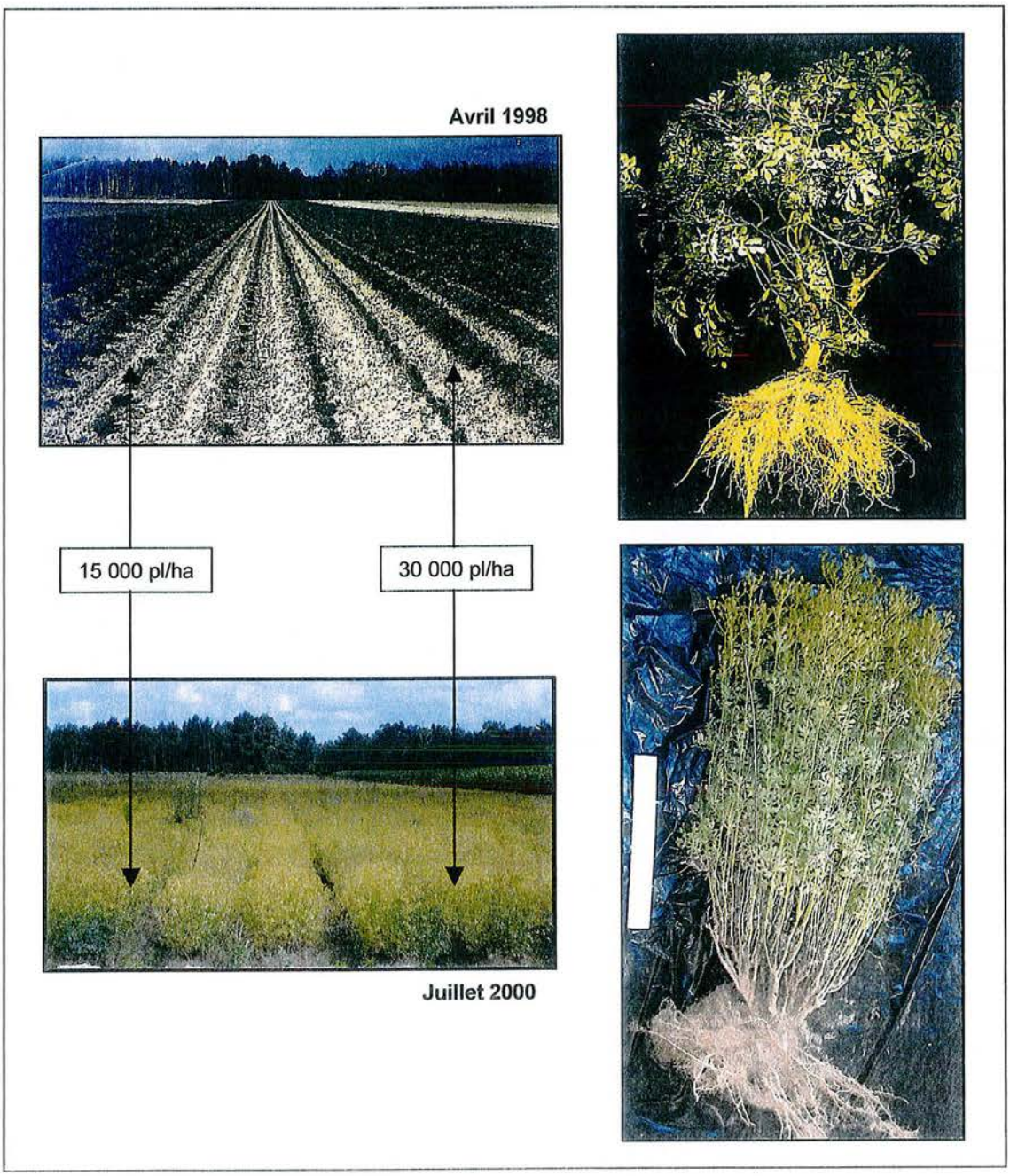
2.5.2. Variables caractérisant la production à l'échelle du peuplement (rendement par hectare et productivité annuelle)

Nous avons ajouté une nouvelle dimension pour mieux appréhender la production en furocoumarines : le rendement par hectare et la productivité annuelle. Ces variables représentent une vision économique et globale de la production en furocoumarines rapportée à une unité de surface donnée ou à une unité de temps.

a. Rendement par hectare

Contrairement à la quantité par plante, le rendement en furocoumarines par unité de surface n'est pas modifié par la densité (**Tableau C-10**, page suivante). Le facteur coupe n'a pas d'effet significatif sur le rendement. Les coupes

Planche 10 : ***Essai MULTIFACTORIEL (Sologne 1997-2000) : vues du champ en avril 1998 et juillet 2000.***



répétées des plantes ne pénalisent donc pas les quantités récoltées par rapport aux plantes témoins.

Le rendement surfacique augmente de 1998 à 2000 (**Tableau C-10**). La **Planche 10** présente l'essai MULTIFACTORIEL en 1998 et 2000.

Facteurs	**Densité**		**Coupe**			**Année de récolte**			Interactions
Modalités	d15	d30	*aucune coupe*	*1 coupe par an*	*1 coupe par an sauf 1997*	1998	1999	2000	significatives
FRUIT+FEUILLE	*p= NS*		*p= NS*			*p= 0,000****			1x2*
	-	-	-	-	-	**C**	**B**	**A**	1x3***
g.ha^{-1}	12300	13600	12500	13100	13300	9000	13000	16700	2X3***
N	*69*	*66*	*56*	*26*	*53*	*72*	*36*	*27*	

Tableau C- 10 : Effets des facteurs densité, coupe et année de récolte sur le rendement surfacique en furocoumarines par la Rue, dans le compartiment supérieur FRUIT+FEUILLE

d15 = 15000pl./ha, d30 = 30000pl./ha ; 1997 = année de plantation

N = nombre de plantes sur lesquelles sont calculées les moyennes de la variable étudiée

Plantes cultivées au champ (Soings-en-Sologne).

b. Productivité annuelle en furocoumarines

Pour mieux appréhender la production de furocoumarines dans le temps, nous avons calculé en 2000 la PRODUCTIVITE ANNUELLE MOYENNE sur les 3 années de campagne. Il s'agit du rapport de toutes quantités récoltées lors des coupes[a] (cumulées depuis la plantation) sur la durée totale de culture[b]. Ainsi, cette variable renseigne sur la productivité annuelle moyenne attendue après 3 ans de culture.

Le facteur densité n'influence pas la productivité moyenne par hectare par an (**données non présentées**). En revanche, le facteur coupe modifie significativement la productivité moyenne : la modalité 1 COUPE PAR AN permet de récolter en moyenne **15,7 kg.ha^{-1}.an^{-1} de furocoumarines**. La modalité 1 COUPE PAR AN SAUF L'ANNEE DE PLANTATION a une productivité 1,3 fois plus faible. Les plantes coupées ont globalement une productivité significativement supérieure aux plantes qui n'ont jamais été coupées (2,6 fois plus).

La densité n'a pas d'effet sur le rendement surfacique en furocoumarines et sur la productivité annuelle moyenne calculée sur 3 années. A ce stade de l'étude, nous ne sommes donc pas en mesure de choisir une densité sur ces 2 critères.

Le facteur coupe n'a pas d'effet sur le rendement surfacique. Par conséquent, la récolte annuelle des plantes ne réduit pas la production de furocoumarines dans la plante. Bien au contraire, les plantes coupées ont une productivité annuelle significativement plus élevée que les plantes qui n'ont jamais subi de coupe. De plus, les plantes coupées la première année ont une productivité annuelle supérieure aux plantes qui n'ont pas été coupées l'année de plantation. Ainsi, la récolte des plantes peut être effectuée dès la première année.

[a] *seulement la quantité récoltée en 2000, pour la modalité AUCUNE COUPE ; la somme des récoltes 1998+1999+2000 pour les modalités 1 COUPE PAR AN et 1 COUPE PAR AN SAUF L'ANNEE DE PLANTATION.*

[b] *la durée de culture est de 39 mois pour les modalités AUCUNE COUPE et 1 COUPE PAR AN SAUF L'ANNEE DE PLANTATION (de la plantation jusqu'à juillet 2000), et est de 30 mois pour la modalité 1 COUPE PAR AN (de la première coupe à juillet 2000, car on ne connaît pas la quantité récoltée lors de la première coupe en octobre 1997)*

De manière générale, le rendement surfacique augmente lorsque les plantes vieillissent et la productivité annuelle est la plus forte pour les années 1999 et 2000.

2.5.3. Conclusions

Les facteurs considérés (coupe, densité, année de récolte) n'influencent pas de la même manière les variables caractérisant la production à l'échelle de la plante ou bien celles caractérisant la production à l'échelle du peuplement.

Nous avons montré que la densité la plus faible (15 000 pl./ha) produit plus de furocoumarines par plante. En revanche, cet effet de la densité est annulé pour la variable rendement par hectare. Par conséquent, il n'y a pas de différence significative entre les rendements surfaciques des 2 densités testées. Il n'y en a pas non plus pour la production annuelle moyenne calculée sur les 3 années de campagne. Sur ces critères, il n'est donc pas possible de se prononcer sur la meilleure densité. Nous pouvons néanmoins souligner que la plus faible densité permet d'implanter moins d'individus au départ de la culture et de diminuer ainsi les charges d'exploitation.

Une variable telle que la teneur en furocoumarines dans les tissus est importante à considérer pour l'industriel puisque l'extraction de furocoumarines dans des tissus plus concentrés permet de traiter moins de biomasse et ainsi de baisser les coûts d'extraction et de purification. Cependant, cette variable ne dépend pas de la densité. Par conséquent, la teneur ne permet pas non plus de discriminer les 2 densités étudiées. Dans un tel cas, il conviendrait d'essayer l'effet de densités plus extrêmes afin d'atteindre un rendement maximal par hectare ou encore afin d'obtenir des tissus plus concentrés.

La Rue répond très bien a une exploitation de ses parties aériennes pour la production de furocoumarines. D'une part, le rendement surfacique augmente au fur et à mesure des récoltes. D'autre part, la récolte des parties aériennes dès la première année améliore même la productivité annuelle. Ainsi, le système de culture Rue officinale-furocoumarines est opérationel dès la première année, et devient de plus en plus efficace récolte après récolte. En effectuant une récolte par an dès la première année, nous avons obtenu une productivité supérieure à 15 kg de furocoumarines par hectare et par an, pour les 4 années de culture.

Dans le paragraphe suivant, nous présentons les résultats obtenus sur l'effet de la fertilisation azotée sur la culture de Rue.

2.6. EFFET DU FACTEUR FERTILISATION AZOTEE

L'essai AZOTE a été mis en place en mai 1999, sur une parcelle de la ferme expérimentale de l'ENSAIA, La Bouzule (Champenoux). Quatre traitements ont été testés : 0, 50, 100 et 150 U[a] d'azote. Un plan expérimental en 4 blocs a été implanté. Nous avons déterminé les poids de matière sèche dans toute la plante par l'analyse des compartiments FRUIT, FEUILLE, TIGE, RACINE et la production de furocoumarines a été analysée dans le compartiment FRUIT et FEUILLE.

[a] *U = unité d'azote = kg d'azote par hectare*

Figure C-16 : Effet de la fertilisation azotée sur la production de matière sèche dans la plante entière.

Plantes prélevées au champ (Champenoux) en août 2000 (stade fructification) et cultivées à la densité 40 000 pl./ha. Barres d'erreurs = ±écart-type.

*r = 9 répétitions par traitement. Effet bloc, effet fertilisation et interaction bloc*fertilisation : non significatif.*

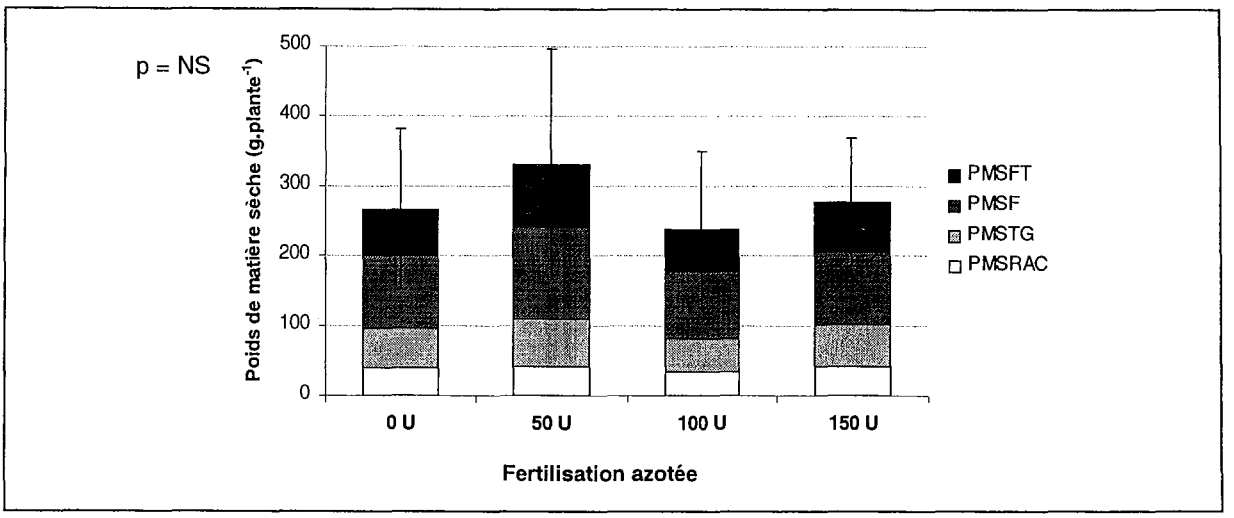
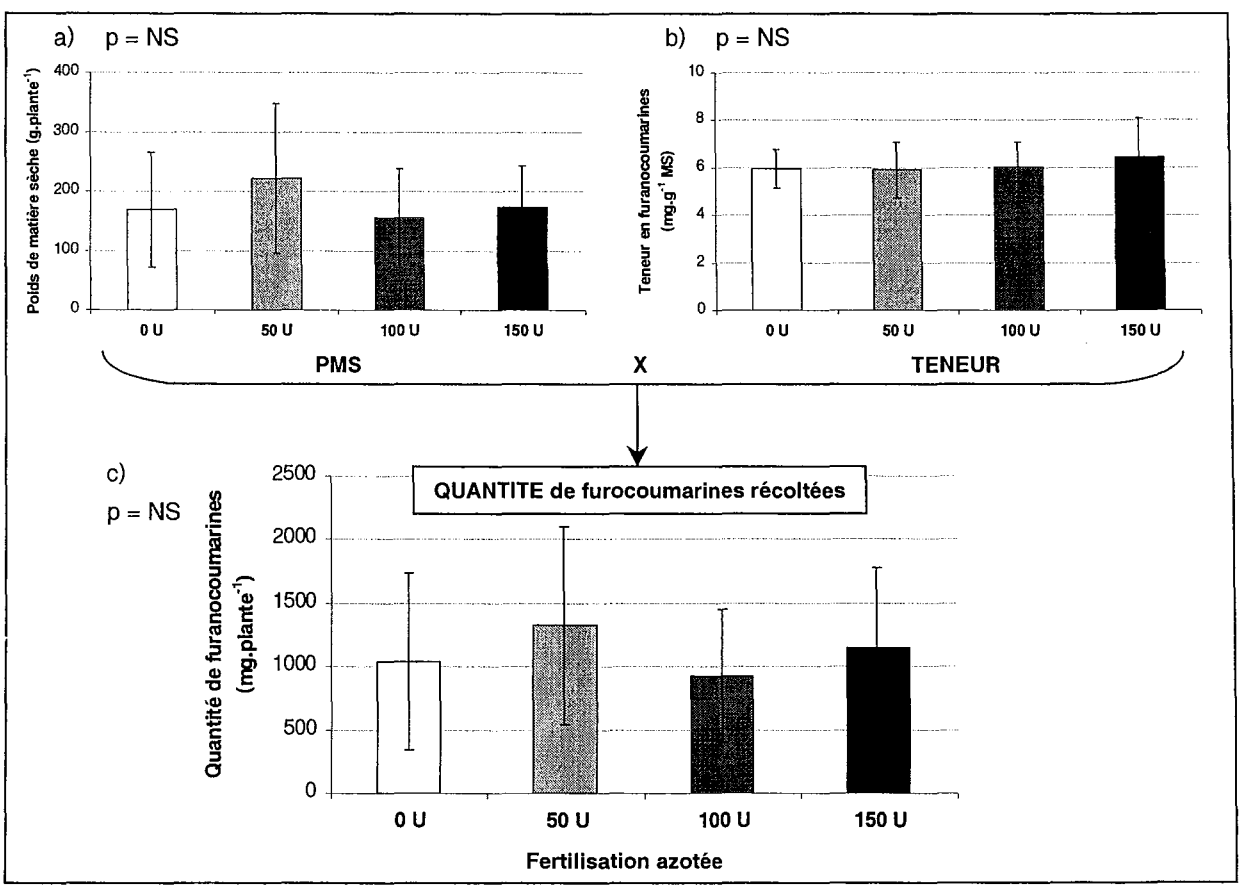


Figure C-17 : Effet de la fertilisation azotée sur la production de matière sèche (a), la teneur (b) et la quantité de furocoumarines produites dans le compartiment FRUIT+FEUILLE.

Plantes prélevées au champ (Champenoux) en août 2000 (stade fructification) et cultivées à la densité 40 000 pl./ha. Barres d'erreurs = ±écart-type.

r = 9 répétitions par traitement. Effet bloc, effet fertilisation et interaction bloc x fertilisation non significatifs.



Le facteur fertilisation, ainsi que le facteur bloc et leur interaction, n'ont pas d'effet significatif sur le poids de matière sèche total, la teneur ou la quantité de furocoumarines (non significatif au risque de 5%).

Nous pouvons cependant parler de tendances pour la production de matière sèche. La modalité 50 U d'azote produit 331 g de matière sèche par plante, soit 28 % plus que les 3 autres modalités (**Figure C-16**). Dans le compartiment FRUIT+FEUILLE, la modalité 50 U produit 222 g, soit 34 % plus que les 3 autres doses (**Figure C-17a**). En revanche, aucune tendance ne se dégage pour la variable teneur : elle est de 6,4 $mg.g^{-1}$ MS en moyenne dans le compartiment FRUIT+FEUILLE (**Figure C-17b**).

Nous pouvons observer des tendances pour la variable quantité de furocoumarines dans le compartiment FRUIT+FEUILLE. La modalité 50 U produit 1,3 g de furocoumarines par plante, soit 28 % de plus que les autres modalités (**Figure C-17c**).

Le poids de matière sèche et la quantité de furocoumarines par plante présentent une forte variabilité (le coefficient de variation est supérieur à 50%). Cette forte variabilité ne permet donc pas de conclure à un effet significatif du facteur azote (les puissances calculées sont d'environ 10%). Avec de tels coefficient de variation, notre plan expérimental (9 répétitions) permet de montrer une différence de 80% entre les traitements, alors que la plus grande différence observée était de 43% pour les deux variables. Il aurait fallu un essai comprenant plus de 30 répétitions par traitement pour montrer une différence entre les deux traitements les plus éloignés.

En revanche, la variabilité affectant la teneur en furocoumarines n'est que de 19%. La puissance calculée est plus élevée (67%). En fait, la plus grande différence entre 2 traitements est seulement de 9%. Nous pouvons considérer que les teneurs des 4 traitements sont égales. L'azote n'a donc pas d'effet sur la concentration en furocoumarines dans les tissus.

Les doses testées (0, 50, 100, 150 U) ont été appliquées sur la parcelle en 1999 et 2000 (**Tableau B-4**, p 39). A la plantation, l'azote minéral a été analysé dans le sol : celui-ci contenait 70 U d'azote en mai 1999 (**Annexe 3**). Il est donc important de souligner que le traitement 0 U ne teste pas l'absence d'azote. Comme la dose 0 U n'induit pas de différence significative de la quantité de furocoumarines, alors la dose minimale testée, c'est-à-dire le reliquat présent dans le sol, n'est pas limitante pour la production.

La dose maximale que nous avons testée, soit 150 U plus le reliquat, n'est ni toxique ni bénéfique pour la production de furocoumarines dans la plante.

Les plantes de cet essai ont été cultivées à la densité 40 000 pl./ha. Globalement, le rendement calculé de la récolte des compartiments FRUIT+FEUILLE est de **44 kg de furocoumarines par hectare** ce qui conduit à une productivité de **32 kg de furocoumarines par hectare par an** (de la plantation en mai 1999 jusqu'à la récolte en août 2000).

Dans nos conditions, l'effet de l'apport d'azote n'a pas pu être mis en évidence et ceci pour 2 raisons : d'une part, nous avons observé une très grande variabilité des poids de matière sèche et des quantités de furocoumarines. D'autre part, le reliquat d'azote dans le sol était important et n'a pas permis d'avoir un témoin sans azote (ou avec de faibles quantités).

Après une année de culture, on obtient un rendement de 44 kg de furocoumarines par hectare.

Planche 11 : Sites de culture de *Ruta graveolens* : essai MULTIFACTORIEL et essai AZOTE.

Essai AZOTE mai 2000 (Lorraine)

Essai MULTIFACTORIEL juillet 2000 (Sologne)

2.7. EFFET DU TERROIR

Nous avons comparé les résultats obtenus dans les essais AZOTE et MULTIFACTORIEL (**Planche 11**). Ces deux essais étant sur des parcelles situées dans 2 zones géographiques éloignées et constituées de 2 sols différents, nous avons pu évaluer l'effet du terroir sur la production de furocoumarines.

L'essai AZOTE a été récolté une année après la plantation et les plantes n'avaient pas été coupées l'année de plantation. Les 2 essais ont donc été comparés pour cette modalité. Le site de culture a eu un effet significatif sur toutes les variables considérées (**Tableau C-11**).

Les plantes prélevées sur l'essai AZOTE produisent significativement plus de matière sèche et de furocoumarines que celles prélevées sur l'essai MULTIFACTORIEL. Les plantes prélevées sur l'essai AZOTE contiennent 3,7 fois plus de furocoumarines par plante que celles prélevées sur l'essai MULTIFACTORIEL. Ceci conduit à un rendement **de 44 kg.ha^{-1} de furocoumarines** pour l'essai AZOTE (implanté à 40 000 pl./ha), soit 4,8 fois plus que pour la densité la plus forte (30 000 pl./ha) de l'essai MULTIFACTORIEL (**Tableau C-11**).

Variables mesurées dans le compartiment FRUIT+FEUILLE		**Essai AZOTE** (La Bouzule, Lorraine)	**Essai MULTIFACTORIEL** (La Noue/La Gitinière, Sologne, Centre)	*Effet*
Poids de matière sèche par plante	*g.plante^{-1}*	180 (**A**)	77 (**B**)	*p = 0,000****
Teneur en furocoumarines	*mg.g^{-1} MS*	6,1 (**A**)	3,9 (**B**)	*p = 0,000****
Quantité de furocoumarines par plante	*mg.plante^{-1}*	1109 (**A**)	302 (**B**)	*p = 0,000****
Rendement en furocoumarines	*kg.ha^{-1}*	44 (**A**)	9 (**B**)	*p = 0,000****

Tableau C- 11 : Effets du site de culture sur la production de matière sèche et la production de furocoumarines par la Rue, dans le compartiment supérieur FRUIT+FEUILLE
Essai AZOTE : 40 000 pl./ha, 36 plantes récoltées en 2000, année suivant la plantation
Essai MULTIFACTORIEL : 30 000 pl./ha, 16 plantes récoltées en 1998, année suivant la plantation

La seule différence de densité de peuplement[a] ne permet pas d'expliquer une telle différence de rendement entre les deux essais (presque 5 fois plus pour l'essai AZOTE). L'essai AZOTE est situé en région Lorraine, sur un sol limono-argileux (**Annexe 3**) et l'essai MULTIFACTORIEL est situé en région Centre, sur un sol sableux (**Annexe 2**). Il est possible que la différence de rendement entre les deux essais soit due aux changements pédo-climatiques induits par le changement de terroir.

Le sol de l'essai MULTIFACTORIEL est un sol sableux, donc très filtrant. Malgré l'apport de fertilisants, certains nutriments peuvent être lessivés facilement dans ce type de sol : les éléments minéraux lessivés ne sont alors plus disponibles pour la plante. Dans l'analyse du sol de l'essai MULTIFACTORIEL, nous pouvons remarquer que certains éléments minéraux sont mesurés à de faibles concentrations (**Annexe 2**). Tout d'abord, la concentration en magnésium est 23 fois plus faible dans le sol de l'essai MULTIFACTORIEL que dans le sol de l'essai AZOTE. L'état carencé en magnésium peut expliquer en partie les faibles rendements obtenus dans l'essai MULTIFACTORIEL. En

[a] *40 000 pl./ha pour l'essai AZOTE et 30 000 pl./ha pour l'essai MULTIFACTORIEL*

effet, l'élément minéral magnésium est un atome central de la chlorophylle : en cas de carence, la photosynthèse risque d'être altérée (Marschner, 1986). Le magnésium intervient aussi dans la synthèse des protéines, comme élément de liaison des sous-unités ribosomiques, et dans le fonctionnement de beaucoup d'enzymes, comme co-facteur (Marschner, 1986). Il intervient encore dans la synthèse de l'ATP (Marschner, 1986). Ainsi, une carence en magnésium a une incidence sur le métabolisme général de la plante.

Ensuite, nous pouvons noter que le potassium est en concentration plus faible (4 fois) dans le sol de l'essai MULTIFACTORIEL. Cependant, dans un sol sableux, la concentration de 0,1 $g.kg^{-1}$ de sol n'est pas considérée comme une carence.

Enfin, il se pourrait qu'il y ait aussi un déficit azoté puisque nous avons observé les symptômes d'une carence en azote (feuilles d'un vert jaunâtre) sur les plantes récoltées dans l'essai MULTIFACTORIEL, et notamment la dernière année de récolte. L'azote est un constituant de la structure des protéines et des enzymes. Le déficit de cet élément induit une diminution de la biosynthèse des acides aminés et par conséquent des protéines et des enzymes (Marschner, 1986). La chlorose des feuilles peut être aussi le symptôme d'un déficit en fer.

Toutes ces carences minérales influencent directement la croissance des plantes et certainement le métabolisme secondaire et constituent une part de l'explication des faibles rendements de l'essai MULTIFACTORIEL.

Peu d'études ont été réalisées sur les plantes entières pour connaître l'effet des minéraux sur les métabolites secondaires des végétaux (effet de carence ou d'apport). Certains articles présentent par exemple des résultats sur l'effet de carence en magnésium ou azote sur des molécules comme l'acide chlorogénique ou la scopoline (Loche et Chouteau, 1963 ; Armstrong *et al.*, 1971 ; Del Moral, 1972 ; Lehman et Rice, 1972). Ces études ne vont pas dans le même sens que nos résultats mais elles ne portent pas sur le métabolisme des furocoumarines et ne prennent en considération que les teneurs en métabolites et non les quantités totales synthétisées dans la plante.

Le sol limono-argileux de l'essai AZOTE peut présenter un risque d'asphyxie des racines. Il semble que ce phénomène n'ait pas été observé pendant notre expérimentation. Cependant, les plantes récoltées sur l'essai AZOTE étaient extrêmement fragiles à la base, à cause d'une forte humidité semblait-il. Cette humidité est préservée par la forte densité de peuplement de l'essai (c'est-à-dire 40 000 pl./ha) et par le sol limono-argileux, qui a un fort pouvoir de rétention en eau.

Nous avons pu mettre en évidence un effet du terroir grâce à deux sites d'expérimentation au champ présentant des différences pédo-climatiques importantes. Nos résultats permettent de supposer qu'un sol riche conduit à une production élevée en furocoumarines, et ceci grâce à l'amélioration de la production de matière sèche, de la teneur, de la quantité de furocoumarines par plante et finalement du rendement surfacique.

2.8. CONCLUSIONS

Ces essais au champ ont apporté de nombreux résultats sur la possibilité de produire des furocoumarines grâce à des cultures de Rue officinale. Les effets de plusieurs pratiques culturales ont été analysés.

Trois stades de développement de la plante ont été notamment étudiés sur la production de furocoumarines : le

stade végétatif (avril), le stade fructification (juillet) et le stade suivant la chute des fruits (octobre). Le stade fructification a montré la meilleure production pour toutes les variables testées. Notamment, les plantes récoltées au mois de juillet produisent 7 fois plus de furocoumarines que les plantes récoltées en avril (rendement par hectare et quantité par plante) et 2 fois plus que celles récoltées en octobre. Ainsi, nous préconisons le stade fructification pour la récolte de la Rue.

Sur les plantes récoltées au champ pendant les 3 années qui suivent la plantation, nous avons étudié la production de furocoumarines dans tous les compartiments de la plante pour déterminer lequel était le plus intéressant à récolter. La majeure partie des furocoumarines d'une plante est stockée dans les parties aériennes : tiges, feuilles et fruits. Nous avons situé cette partie à 5 cm au-dessus de la surface du sol (coupe rase). Au stade fructification, la quantité de furocoumarines stockée dans cette partie correspond à 66 % de la quantité totale de furocoumarines retrouvée dans la plante. Elle représente aussi la quantité maximale récoltable sans sacrifice des plantes. Le compartiment FRUIT+FEUILLE contient 86% de cette quantité maximale récoltable (différence non significative) pour seulement 41% de la matière sèche totale produite dans la plante. Nous préconisons la récolte du compartiment FRUIT+FEUILLE.

La récolte du compartiment FRUIT+FEUILLE conduirait à pratiquer une coupe à 25 cm de la surface du sol : c'est une fauche moins sévère que la coupe rase que nous avons pratiqué lors de nos essais (à 5 cm du sol). En effet, après une coupe à 5 cm, la plante dépense plus d'énergie à reconstituer la biomasse perdue que lors d'une coupe à 25 cm du sol. Nous pouvons imaginer que ce supplément d'énergie pourrait être alloué aux défenses et donc à la formation de furocoumarines ou qu'il permettrait de prolonger l'exploitation de la plante par l'économie des ressources.

Après avoir choisi le stade de récolte et la partie de la plante à récolter, nous avons montré l'effet de la densité de peuplement et des coupes répétées, pendant les 3 années de culture qui ont suivi la plantation. La densité de peuplement affecte surtout les variables qui déterminent la production de furocoumarines à l'échelle de la plante. Les plantes de la densité 15 000 pl./ha produisent plus de furocoumarines par plante que celles cultivées à la densité 30 000 pl./ha. En revanche, la teneur en furocoumarines et les variables décrivant la production de furocoumarines à l'échelle du peuplement ne sont pas différentes selon les densités appliquées.

Dans l'optique d'une exploitation de la Rue, il était important de connaître la réponse des plantes face à des coupes répétées mimant les récoltes annuelles. La première année suivant la plantation, nous avons montré que les plantes coupées avant le premier hiver avaient une teneur en furocoumarines supérieures aux plantes témoins, indiquant un effet stimulant de la coupe sur le métabolisme secondaire. En revanche, la quantité de furocoumarines par plante n'était pas significativement différente des plantes témoins. Ensuite, nous avons observé que les plantes ayant subi leur première coupe à l'âge de 6 mois produisaient moins de furocoumarines que les plantes ayant subi leur première coupe une année plus tard. Cette observation nous avait conduit à émettre l'hypothèse qu'il pouvait être préjudiciable de récolter les plantes l'année de plantation. Cependant, nous avons montré par la suite que la quantité par plante et le rendement surfacique en furocoumarines ne sont pas modifiés par la modalité de coupe choisie (1 COUPE PAR AN ou 1 COUPE PAR AN SAUF L'ANNEE DE PLANTATION) et ceci sur les 3 années d'exploitation de la parcelle. De plus, la productivité annuelle moyenne (calculée sur toute la campagne) est plus élevée pour la modalité 1 COUPE PAR AN. Ainsi, il n'est pas préjudiciable de récolter la Rue l'année de plantation.

La Rue réagit donc très favorablement à la récolte de ses parties aériennes : la production de furocoumarines n'est

pas inhibée par les coupes successives. De plus, l'étude de la production de furocoumarines pendant les 3 années suivant la plantation a montré que le rendement est plus élevé pour des plantes plus âgées. Ceci permet d'espérer que la production peut encore se maintenir à un niveau élevé après plusieurs années d'exploitation des plantes.

Nous avons observé, dans nos conditions expérimentales, que la fertilisation azotée n'a pas modifié la production de furocoumarines. Le sol de la parcelle dont nous disposions pour l'essai avait un fort reliquat azoté et n'a pas permis de tester l'effet de l'absence d'azote. Les plus fortes doses testées n'ont pas montré d'effets (ni favorables, ni nocifs) sur les composantes du rendement en furocoumarines.

Nous avons comparé les rendements de la parcelle de l'essai AZOTE avec celui de la parcelle de l'essai MULTIFACTORIEL. Ces deux parcelles étant sur des sites géographiques et des sols différents, nous avons mis en évidence un fort effet du terroir. Les Rues cultivées en Lorraine, sur un sol très riche (essai AZOTE) ont un rendement en furocoumarines 5 fois plus élevée à celles cultivées en Sologne, sur un sol sableux (essai MULTIFACTORIEL). Les effets du terroir ont été observés autant sur la production de biomasse que sur la teneur en furocoumarines.

Parallèlement à ces cultures de plantes entières, nous avons mis en place des cultures *in vitro* de cellules de *Ruta graveolens* pour estimer de la même façon la possibilité de produire des furocoumarines à partir de ce type de cultures.

3. PRODUCTION DE FUROCOUMARINES PAR DES SUSPENSIONS CELLULAIRES DE *RUTA GRAVEOLENS*

Les cultures *in vitro* sont un autre moyen de produire des métabolites végétaux à grande échelle. Par ailleurs, les cultures *in vitro* ont apporté une nouvelle dimension à l'étude de la production des métabolites secondaires par des végétaux. L'approche de la production de métabolites n'est plus étudiée au niveau du peuplement ou de la plante, mais au niveau de l'organe ou de la cellule. Ce niveau d'échelle permet accéder plus facilement à des données qui conduiront à une meilleure compréhension des voies métaboliques des molécules étudiées.

Les expérimentations qui suivent ont 2 objectifs : d'une part, l'évaluation et l'amélioration de la production des furocoumarines, d'autre part une meilleure connaissance des voies de biosynthèse. Dans ce deuxième objectif, nous avons cherché des individus ou des conditions dans lesquelles les individus expriment des défauts de production de certaines furocoumarines. Ces phénotypes pourront être utilisés pour l'étude biomoléculaire des gènes régulant les voies de biosynthèse.

Parmi les différentes cultures *in vitro* possibles, nous avons étudié la culture de cellules indifférenciées de Rue en milieu liquide. Après avoir caractérisé la croissance et la production de furocoumarines par les cellules de *Ruta graveolens* (en flacon et en bioréacteur), nous avons testé deux procédés susceptibles de modifier, quantitativement et qualitativement, la production de furocoumarines par les cellules de *Ruta graveolens* : le traitement par un agent éliciteur d'origine biotique et l'immobilisation des cellules indifférenciées dans des billes d'alginate.

3.1. CROISSANCE ET PRODUCTION DE METABOLITES PAR DES SUSPENSIONS CELLULAIRES DE *RUTA GRAVEOLENS*

Nous avons initié des cultures de cellules indifférenciées de Rue dans le but d'étudier la production de furocoumarines. La plupart des essais a été réalisée en flacon de taille réduite (250 ml), mais nous avons également conduit des cultures en plus grand volume (2,5 L) pour caractériser plus précisément la faisabilité de la production de furocoumarines par des suspensions cellulaires de Rue.

3.1.1. Croissance et production de furocoumarines en flacon Erlenmeyer

Nous avons caractérisé la croissance et le niveau de production en furocoumarines de deux souches cellulaires, SC et DEO, cultivées dans le milieu de culture $B_5(30)D_2$ (description p 41). Ces deux souches ont été utilisées pour évaluer l'amélioration possible du rendement en furocoumarines par les suspensions cellulaires de *Ruta graveolens*.

a. Souche SC

La souche SC a été initiée dans des flacons de 250 ml, contenant 100 ml de milieu $B_5(30)D_2$. Les productions de biomasse et de furocoumarines ont été étudiées au cours du temps.

La croissance de la souche sur 24 jours se divise en 2 phases (**Figure C-18**): une phase de croissance exponentielle (entre 0 et 17 jours) et une phase stationnaire (à partir de 17 jours). Pendant la phase exponentielle, la production de matière fraîche a atteint plus de 22 g de cellules fraîches en 17 jours, à partir d'un inoculum de 7 g dans 100 ml de

Figure C-18 : Production de biomasse fraîche et quantité de furocoumarines dans la suspension cellulaire SC cultivée en flacon Erlenmeyer (250 ml).

r = 3 répétitions par traitement. Milieu = 100 ml de $B_5(30)D_2$ dans des flacons de 250 ml. Barres d'erreurs = ±écart-type.

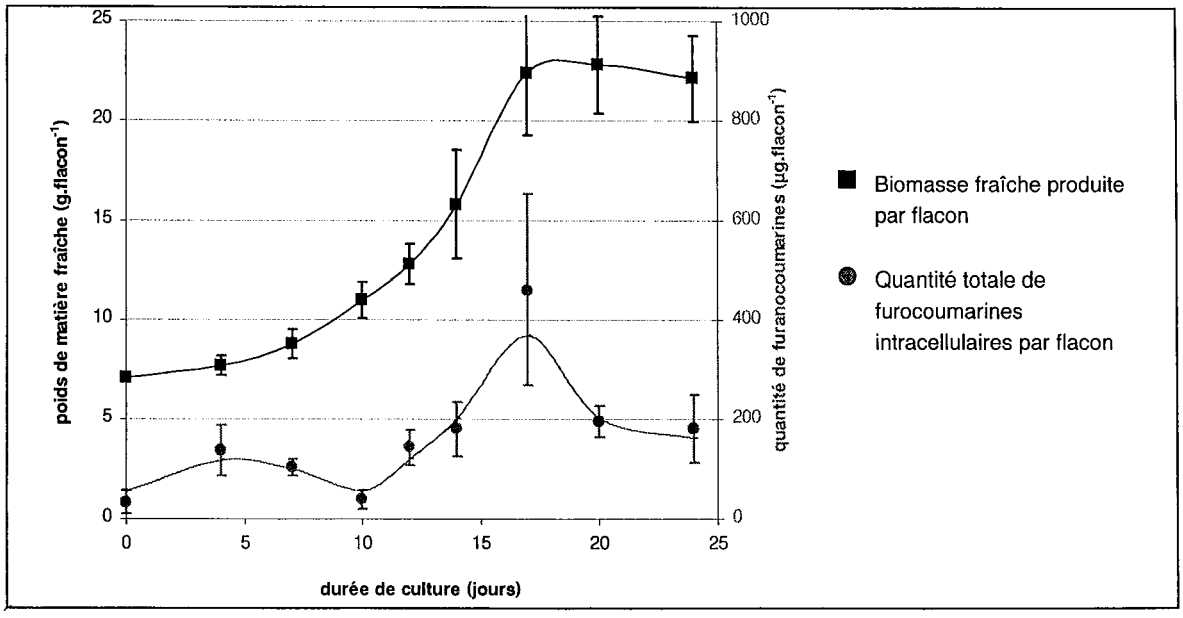
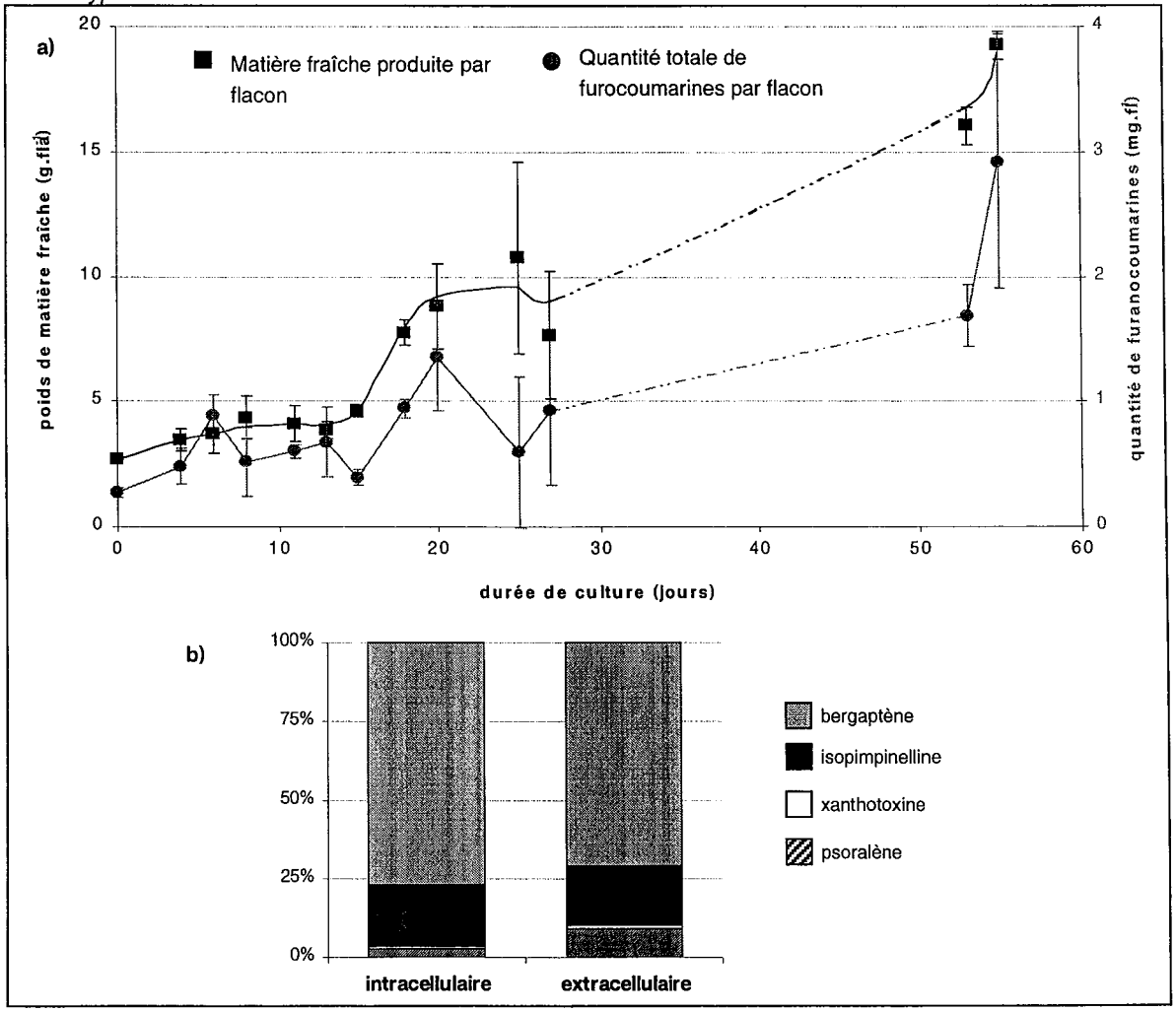


Figure C-19 : Production de biomasse fraîche et quantité de furocoumarines (a), profil intra- et extra-cellulaires des 4 furocoumarines (b) de la suspension cellulaire DEO cultivée en flacon Erlenmeyer (250 ml).

r = 2 répétitions par traitement. Milieu = 75 ml de $B_5(30)D_2$ dans des flacons de 250 ml. Barres d'erreurs = ±écart-type.



milieu. Le taux de croissance spécifique[a] (μ), calculé dans cette phase, est de 0,067 $jour^{-1}$. Celui-ci permet de calculer un temps de doublement[b] (td) de 10,3 jours.

La souche produit des furocoumarines. Les plus fortes concentrations ont été mesurées dans les cellules : en effet, ces concentrations se situent entre 3,5 et 20 $mg.L^{-1}$ (par volume de cellules fraîches)[c] alors que les concentrations dans le milieu se situent entre 0 et 1,4 $mg.L^{-1}$. La quantité maximale de furocoumarines dans les cellules est atteinte à la fin de la phase exponentielle (**Figure C-18**): 0,4 mg de furocoumarines est alors stocké dans la biomasse.

b. Souche DEO

Suite à la perte accidentelle de la souche SC, la souche DEO a été initiée dans des flacons de 250 ml, contenant 75 ml de milieu $B_5(30)D_2$. La production de biomasse et la production de furocoumarines ont été étudiées au cours du temps (**Figure C-19a**).

La croissance des cellules sur 55 jours s'est déroulée en 4 phases : une phase de croissance lente de 0 à 13 jours, une phase de croissance exponentielle de 13 à 18 jours, une phase stationnaire de 18 à 27 jours, enfin une reprise de la croissance qui se situe entre 27 et 53 jours. Le taux de croissance spécifique (μ), calculé dans la phase de croissance exponentielle, est de 0,139 $jour^{-1}$ et le temps de doublement (td) de 5,0 jours. La production totale de furocoumarines par flacon a montré 2 pics d'activité (**Figure C-19a**): à 20 jours et en fin de culture à 55 jours. L'augmentation à 20 jours correspond à la fin de la phase exponentielle de croissance comme dans le cas de la souche SC.

Le profil des 4 furocoumarines a été suivi au cours du temps dans les cellules et dans le milieu. Les profils intra- et extracellulaire moyens sont présentés dans la **Figure C-19b**. Les cellules contiennent une majorité de bergaptène (77%) et des traces de psoralène (3%) et de xanthotoxine (1%). Cette distribution des 4 furocoumarines est un peu différente dans le milieu : en effet, le pourcentage de psoralène est supérieur dans le milieu (9%) par rapport aux cellules (3%).

La teneur intracellulaire en furocoumarines est très variable au cours du temps : elle se situe autour d'une moyenne de 1,4 $mg.g^{-1}$ MS (**données non présentées**) et atteint un maximum de 2,6 $mg.g^{-1}$ MS à 55 jours de culture. La concentration extracellulaire en furocoumarines est aussi très variable : elle a été mesurée autour d'une moyenne de 1,9 $mg.L^{-1}$ et atteint une concentration maximale de 3,5 $mg.L^{-1}$ à 13 jours.

c. Comparaison des souches SC et DEO

Les deux souches sur lesquelles nous avons travaillé n'ont pas les mêmes cinétiques. En effet, sur les 24 premiers jours, la souche SC présente une croissance en deux phases contrairement à la souche DEO qui en présente trois, avec une phase de croissance lente au début. Nous pouvons noter que les inoculi utilisés pour la courbe de croissance de la souche DEO (36 g de cellules fraîches.L^{-1} milieu) étaient 2 fois plus faibles que ceux utilisés pour la croissance de la souche SC (70 g de cellules fraîches.L^{-1} milieu). Ces faibles inoculi expliquent sans doute le retard

---

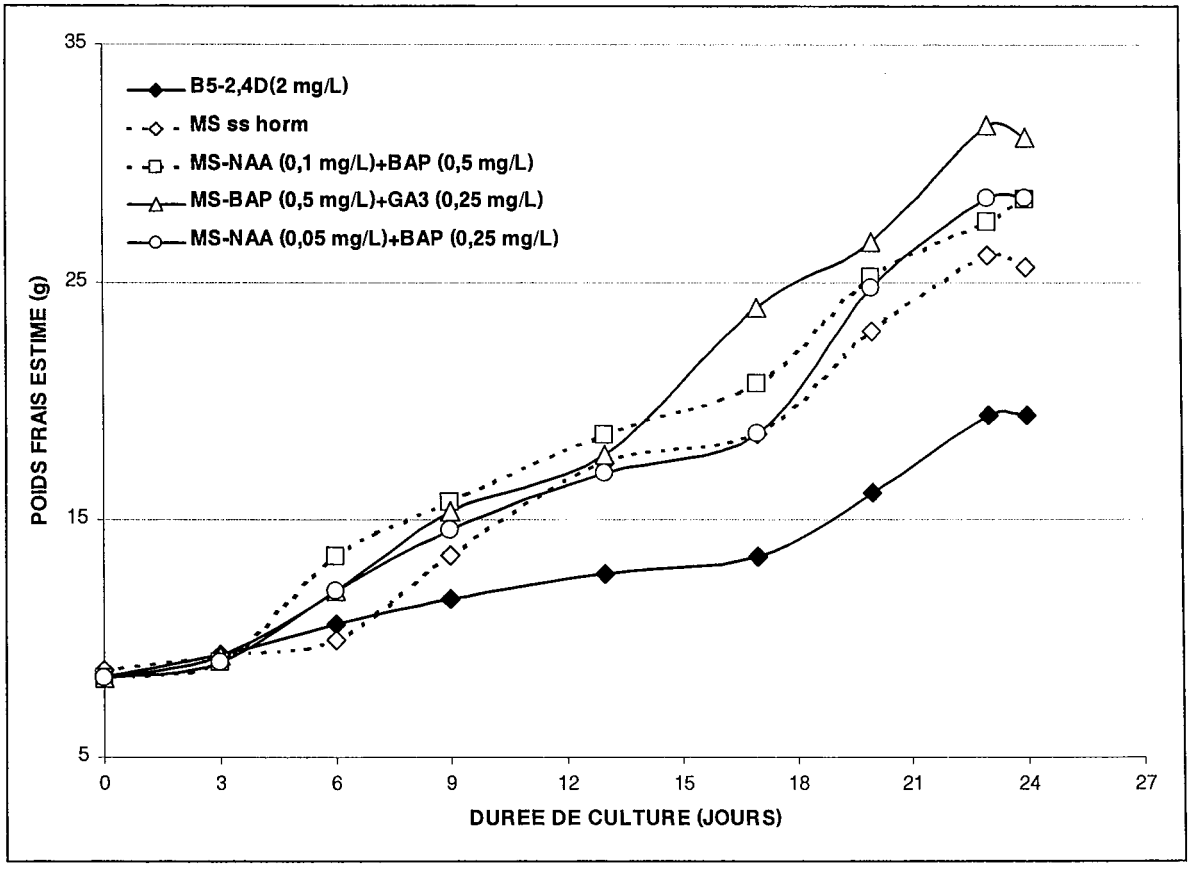
[a] *Taux de croissance spécifique* $\mu = (\ln X - \ln X_0)/(t - t_0)$, *calculé sur la phase exponentielle de la courbe de croissance*

[b] *Temps de doublement* $td = \ln 2 / \mu$

[c] *des concentrations de 3,5 à 20* $mg.L^{-1}$ *(par volume de cellules fraîches) correspondent à des teneurs entre 0,07 et 0,37* $mg.g^{-1}$ *MS*

Figure C-20 : Croissance de la suspension cellulaire DEO cultivée dans plusieurs milieux de culture : la croissance (matière fraîche) a été estimée par la projection du ménisque des cellules décantées dans l'Erlemeyer incliné à 60°.

r = 3 répétitions.



de la phase exponentielle de croissance de la souche DEO (Gontier, 1993).

Malgré ce faible inoculum, le taux de croissance spécifique (μ) de la souche DEO (0,139 $jour^{-1}$) est supérieur à celui de la souche SC (0,067 $jour^{-1}$).

La croissance de la souche DEO a été suivie sur une période plus longue que celle de la souche sc. Les résultats ont montré que la croissance et la production de furocoumarines se poursuivent même après 50 jours de culture et même s'accélèrent. La quantité de furocoumarines produites par flacon continue aussi à augmenter. Après de longues périodes de cultures, comme dans notre cas, certains auteurs parlent de cellules habituées ou anergiées (Jackson et Lyndon, 1990). Les cellules pourraient atteindre un état physiologique différent de celui des cellules dont le milieu est changé plus souvent. Ces cellules habituées ou anergiées pourraient acquérir des capacités particulières, comme la synthèse de phytohormones (Jackson et Lyndon, 1990).

La souche DEO produit plus de furocoumarines : la teneur maximale détectée dans les cellules est de 2,6 mg.g-1 MS alors que les cellules de la souche SC ont une teneur maximale de 0,4 mg.g-1 MS.

d. Amélioration de la croissance

La souche DEO ayant montré une bonne capacité à produire des furocoumarines, il s'agissait ensuite d'améliorer le rendement en furocoumarines. Nous avons d'abord cherché à augmenter la croissance de la souche en testant 5 milieux de culture : 4 milieux de type MS ainsi que le milieu standard de culture des suspensions cellulaires, de type B_5. Afin de suivre l'évolution de la biomasse de la suspension dans ces différents milieux, nous avons utilisé la méthode de mesure indirecte de la croissance décrite dans le chapitre B (p 42).

Les milieux de type MS ont conduit à une meilleure croissance des cellules que le milieu standard de culture de la Rue de type B_5 (**Figure C-20**). Entre 3 et 23 jours, le taux de croissance spécifique (μ) est de 0,057 dans les milieux MS contre 0,037 dans le milieu B5. Le milieu MS est un milieu plus riche que le milieu B_5 (**Annexe 6**): ceci peut favoriser la croissance des cellules.

Le taux spécifique de croissance maximal calculé pour les suspensions cellulaires de *Ruta graveolens* est de 0,14 $jour^{-1}$. Ceci permet de calculer un temps de doublement de 5 jours. Les cellules de *Ruta graveolens* produisent jusqu'à 2,6 $mg.g^{-1}$ MS de furocoumarines. Elles contiennent une majorité de bergaptène (77%). Le psoralène et la xanthotoxine sont présents à l'état de traces (1 à 3 %)

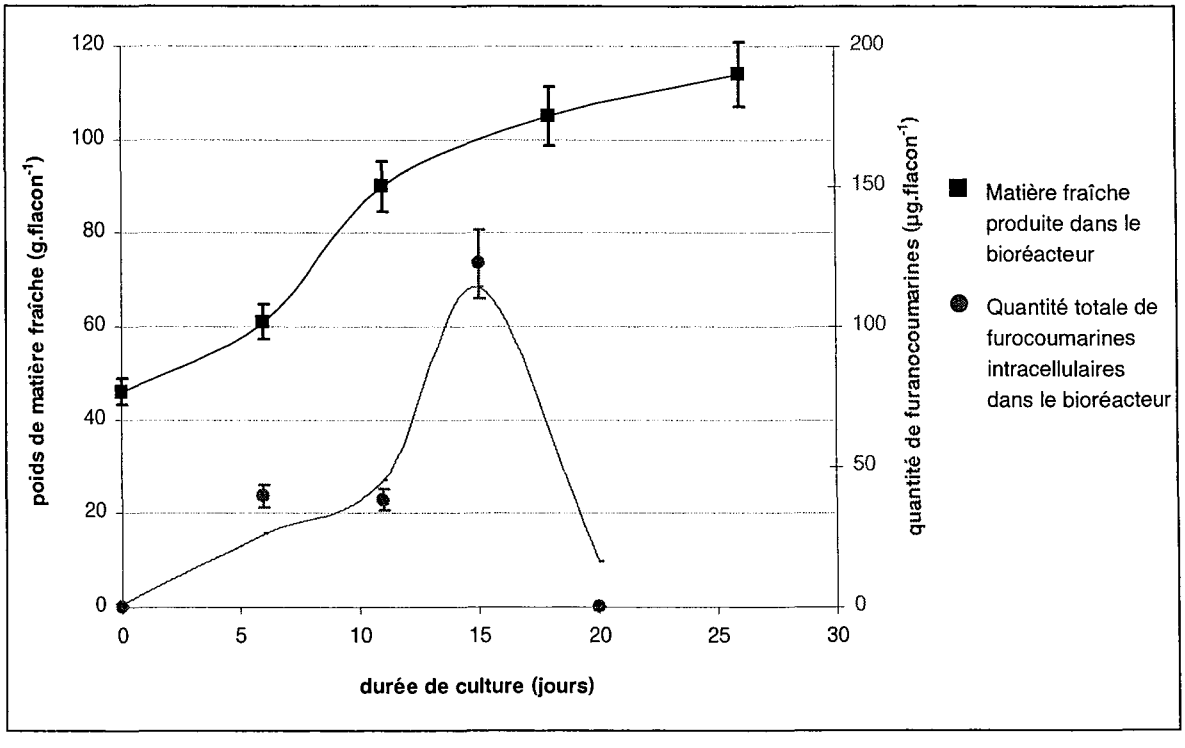
3.1.2. Croissance et production de furocoumarines en bioréacteur

Des essais en bioréacteur de cellules ont été conduits afin d'évaluer les potentialités d'une production à plus grande échelle (2,5 L).

La croissance de la souche SC sur 26 jours se divise en 2 phases (**Figure C-21**, page suivante): une phase de croissance exponentielle de 0 à 11 jours et une phase de croissance non exponentielle de 11 à 26 jours. En fait, la phase stationnaire n'a pas été atteinte dans les 26 jours. Le taux de croissance spécifique (μ), calculé dans la phase exponentielle, est de 0,061 $jour^{-1}$ et le temps de doublement (td) est de 11,4 jours.

Figure C-21 : Croissance et production de furocoumarines par des suspensions cellulaires de Rue en bioréacteur. Production de biomasse fraîche et quantité de furocoumarines produites par la suspension cellulaire SC cultivée en bioréacteur (2,5 L).

r = 3 répétitions par traitement. Milieu = 1,2 L de $B_5(30)D_2$ dans un bioréacteur de 2,5 L. Barres d'erreurs = ±écart-type.



La croissance de la souche sc, dans les conditions de bioréacteur testées ici, est comparable aux cultures en flacon. En effet, le temps de doublement en flacon et en bioréacteur était respectivement de 10,3 et 11,4 jours. Néanmoins, nous avons noté que la phase stationnaire n'était pas atteinte à la fin de la culture en bioréacteur. La croissance n'est donc pas encore limitée. De plus, la taille relative de l'inoculum était plus faible dans la culture en bioréacteur (30 g de cellules fraîches.L^{-1}) par rapport à celle en flacon (70 g de cellules fraîches.L^{-1}). Or la taille de l'inoculum peut influencer la croissance des cellules en milieu liquide (Gontier, 1993). Ceci nous permet de penser que la croissance en bioréacteur des cellules de Rue peut être améliorée en augmentant la taille de l'inoculum.

Les quantités de furocoumarines produites en bioréacteur ont été plus faibles que celles mesurées en flacon (**Figure C-18** et **Figure C-21**). Néanmoins la phase stationnaire n'a pas été atteinte après 4 semaines de culture en bioréacteur. Ainsi, il est probable que la forte augmentation de la quantité de furocoumarines dans les cultures en flacon, correspondant à la fin de la phase exponentielle (plus de 400 µg par flacon), n'a pas pu être atteinte dans le bioréacteur.

Les suspensions cellulaires de *Ruta graveolens* ont un taux de croissance spécifique semblable en bioréacteur et en flacon. Dans nos conditions, la production de furocoumarines est plus faible en bioréacteur.

3.2. ELICITATION DE CELLULES INDIFFERENCIEES DE *RUTA GRAVEOLENS*

Comme nous l'avons décrit dans la bibliographie, les furocoumarines sont des molécules engagées dans la défense chimique des plantes contre les pathogènes. Dans une plante entière, la production de ces molécules phytoalexines peut être induite par la présence des pathogènes en question. Cette induction est aussi appelée élicitation. Cette capacité à éliciter des cellules végétales est utilisée sur les cellules cultivées *in vitro*, afin d'induire une augmentation de la biosynthèse des phytoalexines (Dornunburg et Knorr, 1995 ; Yukimune *et al.*, 1996 ; Muhlbach, 1998 ; Singh, 1999).

Nous avons étudié l'effet de l'élicitation comme moyen d'augmenter la teneur en furocoumarines dans les cellules de *Ruta graveolens*. Pour cela, nous avons utilisé un champignon, *Verticillium dahliae* (souche brm 1, ATCC n°44571), un agent pathogène des végétaux à large spectre d'hôte.

3.2.1. Effet de l'élicitation

Des préparations fongiques ont été ajoutées à des cultures de cellules indifférenciées de Rue dans le but d'évaluer les effets de l'élicitation (**expérience 1**, p 43). A partir des cellules obtenues dans la culture en bioréacteur (souche sc), 6 cultures ont été réalisées en parallèle, en Erlenmeyer de 250 mL : 2 cultures témoins (sans champignon), 2 cultures élicitées avec 10 mg du champignon E_1 (champignon âgé de 6 jours) dans les 100 mL de milieu et 2 cultures avec E_2 (champignon âgé de 30 jours). Les productions de matière sèche et de furocoumarines ont été mesurées après 7 jours et 10 jours pour chacune des 3 modalités.

Dans tous les cas, la croissance des cellules n'a pas été affectée par la présence de l'agent éliciteur (**données non présentées**). En revanche, une forte augmentation des concentrations en furocoumarines dans les cellules et dans

Figure C-22 : Elicitation de cellules indifférenciées de *Ruta graveolens* par le champignon *Verticillium dahliae*.

Milieu = 100 ml de $B_5(30)D_2$ dans des flacons de 250 ml. Souche SC.

Agent éliciteur : Témoin (sans Verticillium dahliae), E1(avec 10 mg de lyophilisat de Verticillium dahliae (Vd) âgé de 6 jours), E2 (avec 10 mg de lyophilisat de VD âgé de 30 jours).

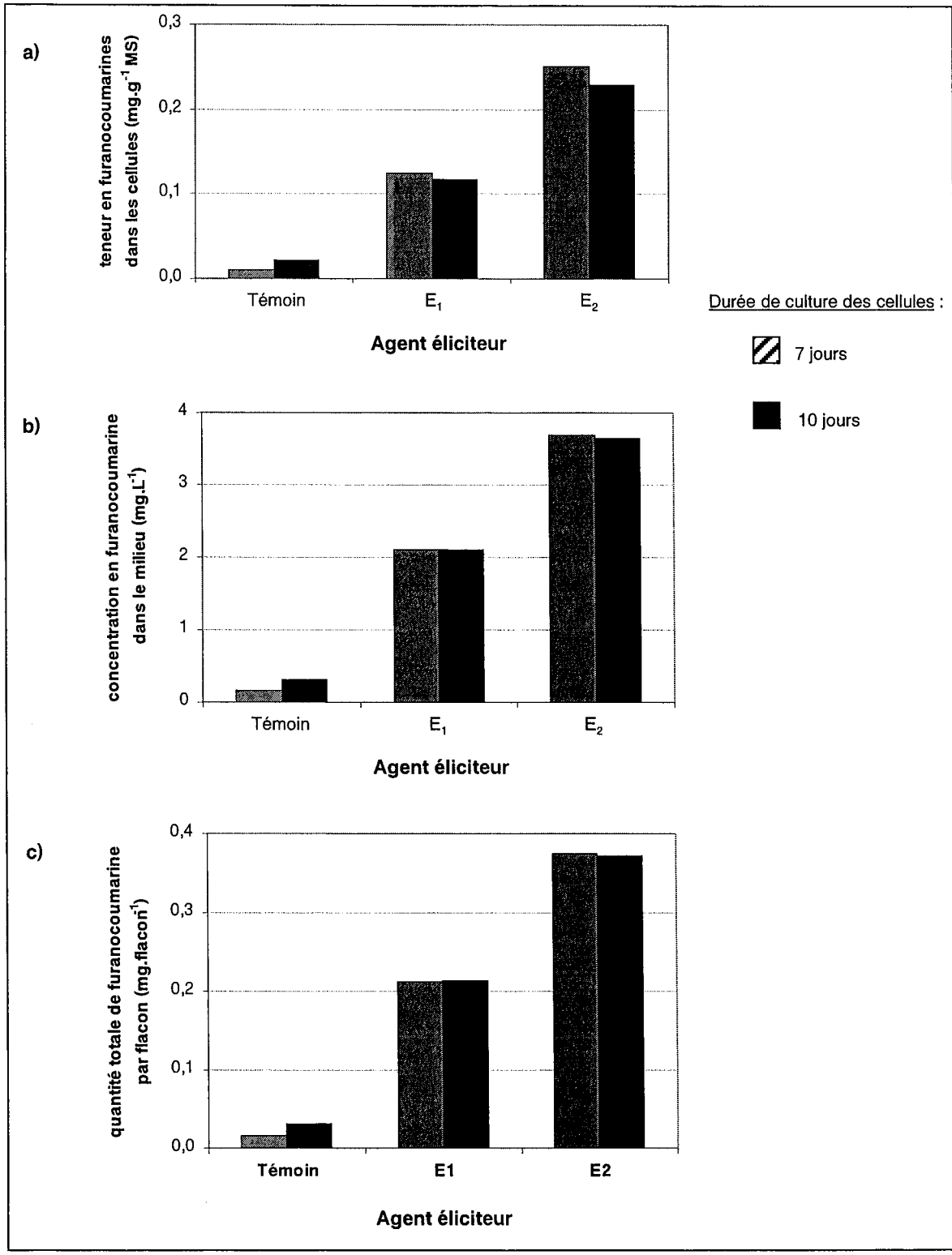


Figure C-23 : Production de matière sèche par le champignon *Verticillium dahliae.*

r = 3 répétitions par traitement. Milieu = 75 ml de $B_5(30)$ dans des flacons de 250 ml. Barres d'erreurs = ±écart-type.

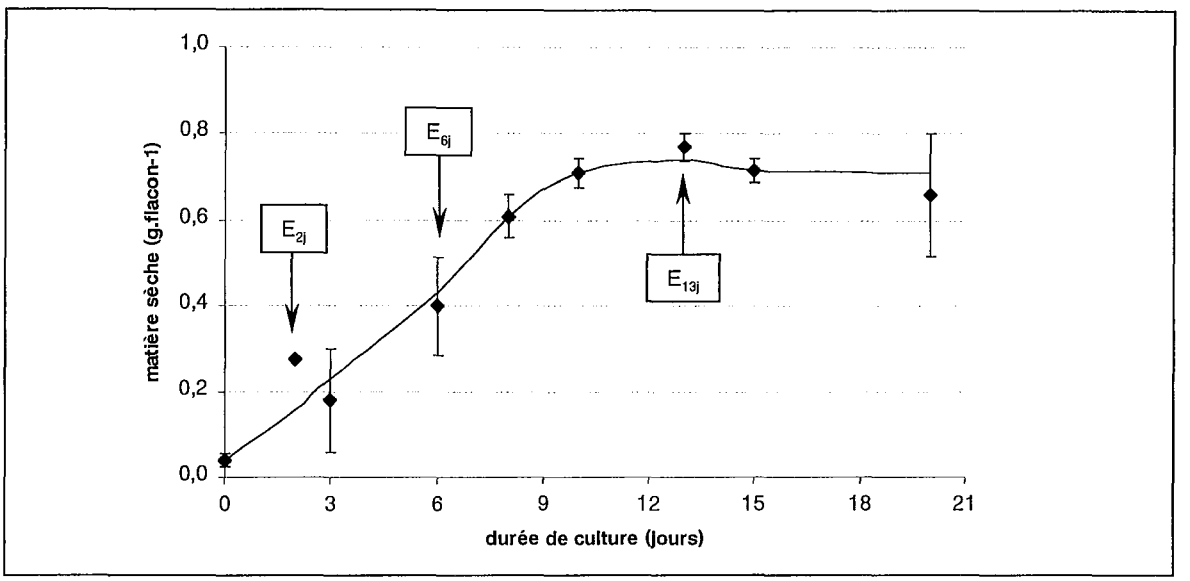


Figure C-24 : Elicitation de cellules indifférenciées de *Ruta graveolens* par le champignon *Verticillium dahliae* : effet de la quantité et de l'âge de l'agent éliciteur sur la croissance (a) et sur la quantité totale de furocoumarines produites par flacon (b).

Milieu = 75 ml de $B_5(30)D_2$ dans des flacons de 250 ml.

r = 4 répétitions par traitement

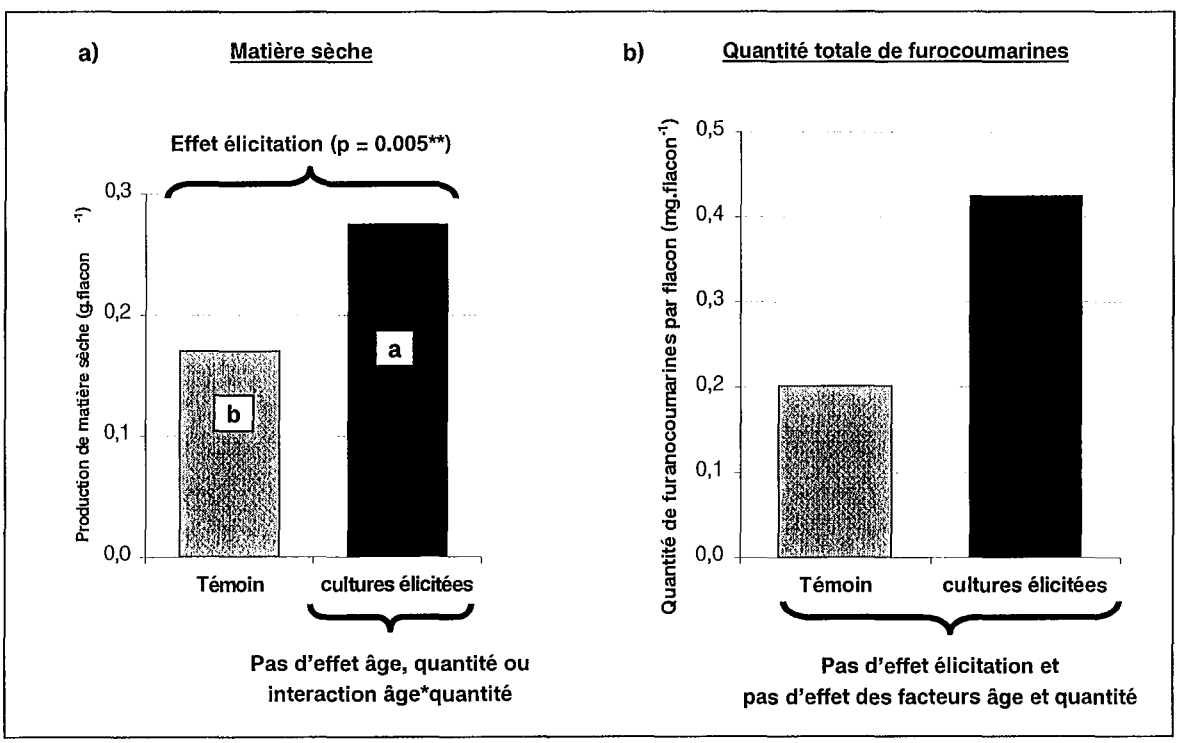
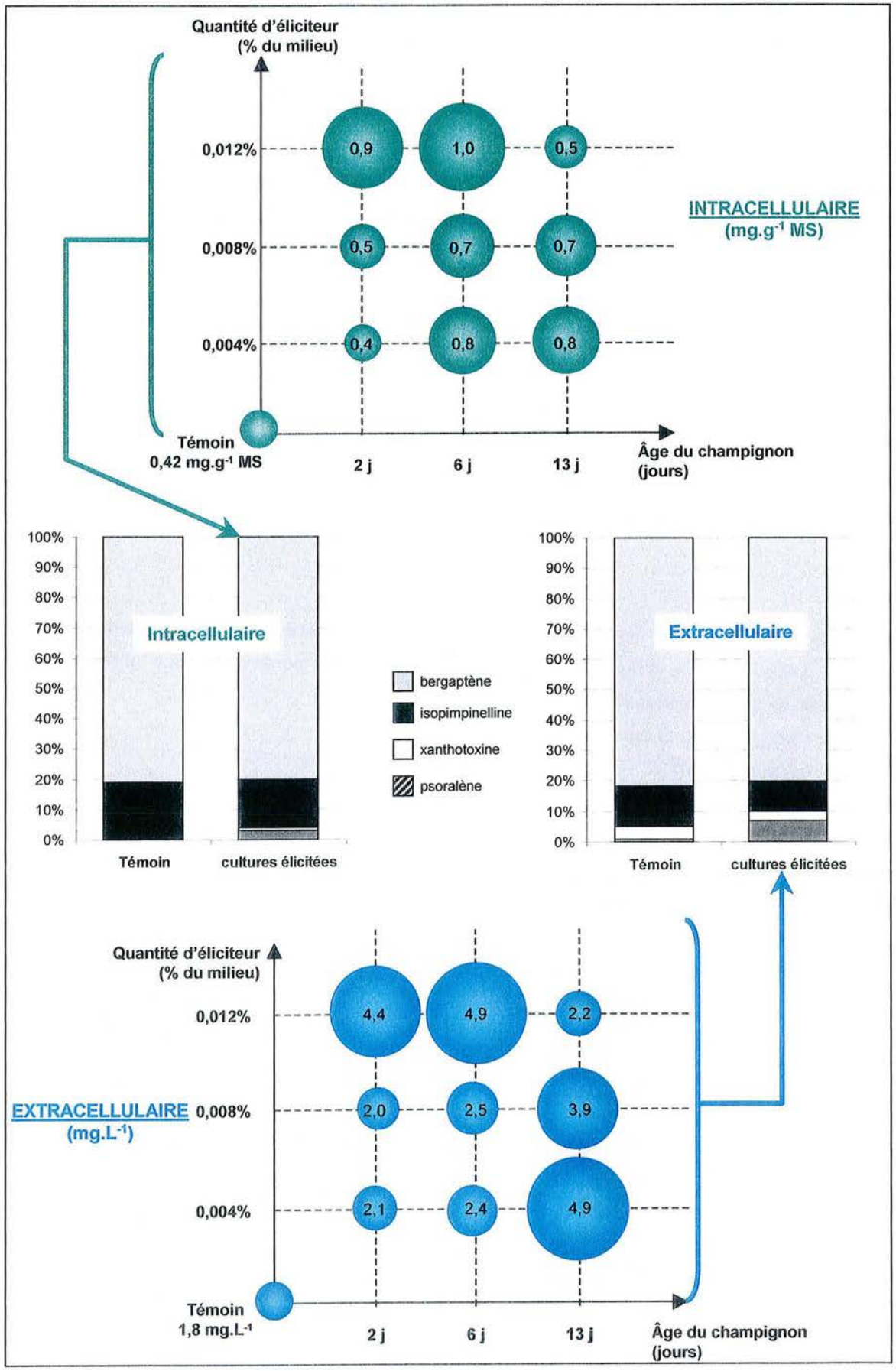


Figure C-25 : Elicitation de cellules indifférenciées de *Ruta graveolens* par le champignon *Verticillium dahliae* : effet de la quantité et de l'âge de l'agent éliciteur sur les concentrations et le profil des 4 furocoumarines dans les cellules et dans le milieu.

r = 4 répétitions par traitement. Milieu = 75 ml de $B_5(30)D_2$ dans des flacons de 250 ml. Récolte après 14 jours de culture.



le milieu de culture a été induite par la présence de l'agent éliciteur (**Figure C-22a et b**, page suivante). L'agent éliciteur E_1 a augmenté de 9 fois la quantité totale de furocoumarines par flacon, par comparaison au témoin (**Figure C-22c**). L'agent éliciteur E_2 a induit une augmentation encore plus forte (16 fois par rapport au témoin).

L'augmentation de la production de furocoumarines par élicitation montre les potentialités des cellules de Rue pour la production de furocoumarines (Milesi *et al.*, 2001). De plus, le relargage des métabolites pouvant être amélioré par l'élicitation, un tel traitement permettrait d'ouvrir des perspectives très intéressantes pour la production de furocoumarines, à partir de cellules de Rue cultivées en bioréacteur. En effet, s'il est possible d'obtenir une forte croissance en bioréacteur, l'élicitation peut être utilisée dans un deuxième temps pour augmenter la synthèse de furocoumarines. Le relargage des furocoumarines permet l'extraction de ces molécules à partir du milieu de culture et donc évite de sacrifier les cellules

Le contenu en furocoumarines dans les cellules a été augmenté par le traitement éliciteur (jusqu'à 15 fois) et le relargage des furocoumarines dans le milieu a été amélioré (jusqu'à 16 fois).

3.2.2. Effet de la quantité et de l'âge du champignon-éliciteur

L'expérience précédente a montré que *Verticillium dahliae* élicite les cellules de Rue de la souche SC. De plus, l'effet de l'élicitation était corrélé à l'âge du champignon. Afin de vérifier cette hypothèse de manière statistique, des nouvelles cultures ont été conduites, avec la souche cellulaire DEO de *Ruta graveolens* (**expérience 2**, p 44).Trois agents éliciteurs d'âge différent ont été testés, E_{2j} (*Verticillium* âgé de 2 jours), E_{6j} (*Verticillium* âgé de 6 jours) et E_{13j} (*Verticillium* âgé de 13 jours). Nous avons choisi ces 3 âges car ils marquent des phases clés de la croissance du champignon (**Figure C-23**) : E_{2j} correspond au début de la croissance, E_{6j} à la phase de croissance exponentielle, E_{13j} à la phase stationnaire. Ces différents stades de croissance pourraient induire des réponses variables des cellules de Rue. Trois quantités d'agents éliciteur ont été aussi testées (0.004%, 0.008%, 0.012%[a]).

Les résultats ont été traités statistiquement avec des témoins adjacents, ne contenant pas d'éliciteur. La croissance des cultures élicitées est significativement supérieure aux cultures témoins (**Figure C-24a**).

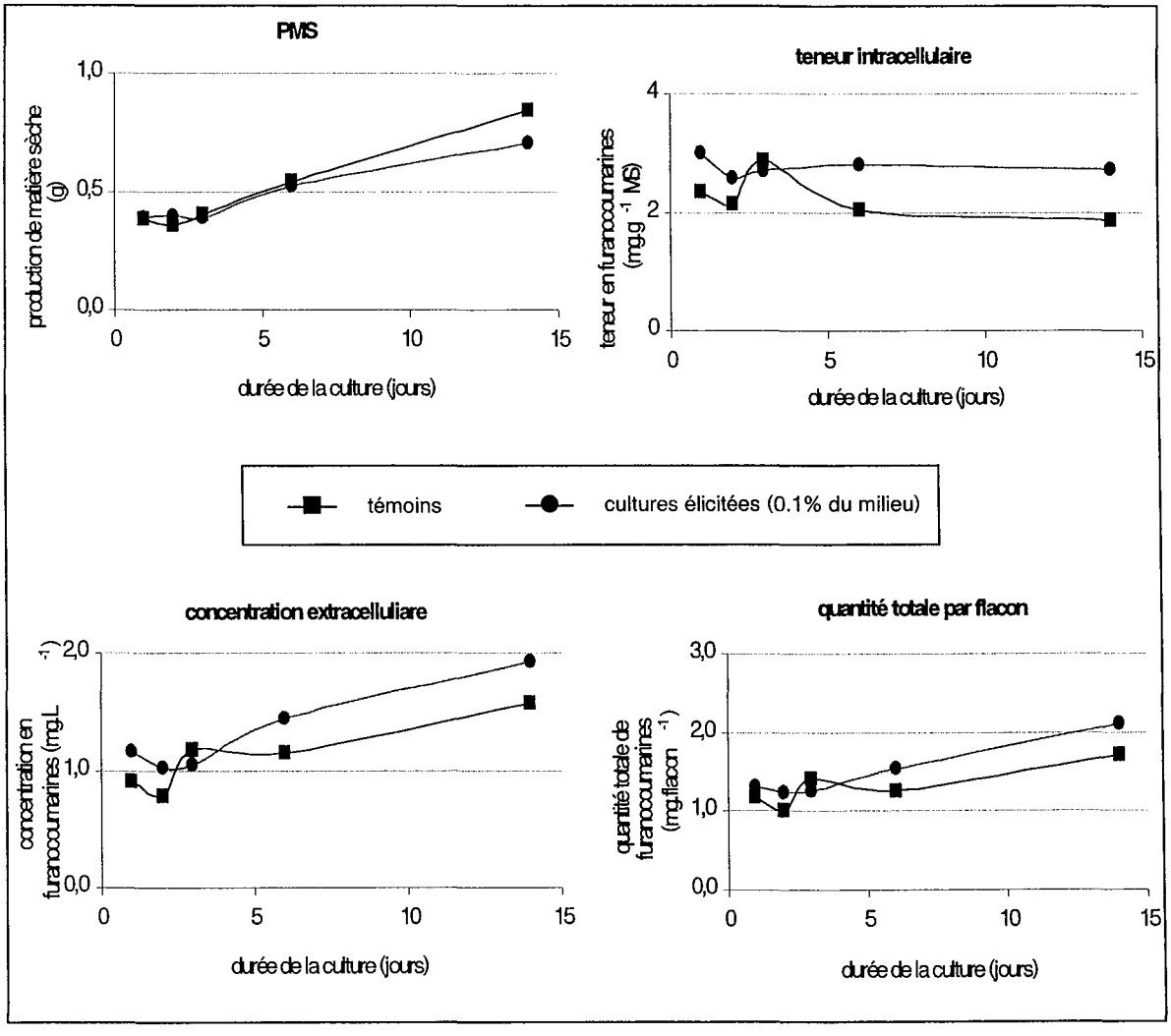
Les concentrations en furocoumarines dans les cellules et les milieux des cultures élicitées (0,69 $mg.g^{-1}$ MS et 3,3 $mg.L^{-1}$) sont supérieures à celles des cultures témoins (0,42 $mg.g^{-1}$ MS et 1,8 $mg.L^{-1}$; **Figure C-25**). Cependant, les résultats statistiques n'ont pas montré d'effet significatif de l'élicitation (élicitées/témoins) et des deux facteurs (quantité et âge du champignon) sur ces deux variables (**Figure C-25**). Il n'y a pas d'effet non plus sur la quantité totale de furocoumarines (**Figure C-24b**). Cependant, il est possible de trouver des traitements ayant une concentration intracellulaire significativement supérieure aux cellules témoins : les traitements avec E_{6j} ($p = 0,025^*$) et les traitements avec 0,012% de champignon ($p = 0,039^*$).

Les profils des 4 furocoumarines (**Figure C-25**) montrent une forte proportion de bergaptène, quelle que soit la culture (témoin ou élicitée) et quel que soit le compartiment (intra ou extracellulaire) : le bergaptène représente plus

[a] *gramme d'agent éliciteur par 100 mL de milieu*

Figure C-26 : Elicitation de cellules indifférenciées de *Ruta graveolens* par le champignon *Verticillium dahliae* : réponse au cours du temps.

r = 3 répétitions par point. Milieu = 75 ml de $B_5(30)D_2$ dans des flacons de 250 ml. Tous les points des courbes sont le résultat de cultures indépendantes



de 80% des 4 furocoumarines. Les cultures témoins ne contiennent que du bergaptène et de l'isopimpinelline, alors que les cultures élicitées contiennent aussi des traces de xanthotoxine (1%) et de psoralène (3%).

Le compartiment extracellulaire des cultures témoins contient des traces de psoralène et de xanthotoxine (2%), alors que les cellules témoins n'en contenaient pas. Nous pouvons donc conclure que les 4 furocoumarines n'ont pas le même comportement par rapport à l'excrétion dans le milieu : l'excrétion du psoralène et de la xanthotoxine est plus élevée que celle de l'isopimpinelline.

Compte tenu de la forte variabilité observée dans cette expérimentation, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet significatif de l'élicitation. La même tendance que l'expérimentation précédente a pu être observée : augmentation de la production de furocoumarines intra et extracellulaire.

3.2.3. Suivi de la réponse à l'élicitation au cours du temps

Afin de connaître l'effet du temps de contact entre les cellules et l'éliciteur sur la production de furocoumarines, nous avons suivi sur 14 jours des cultures témoins et des cultures élicitées (souche DEO) (**expérience 3**, p 44). Les cultures élicitées ont été traitées avec 0,10% d'un mycélium lyophilisé de *Verticillium dahliae* âgé de 14 jours (phase stationnaire de sa croissance). Sur toute la culture, excepté au jour 3, les concentrations intra- et extracellulaire ainsi que la quantité totale de furocoumarines par flacon sont supérieures dans les cultures élicitées (**Figure C-26**). Cependant, cette différence avec les cultures témoins n'était pas significative.

L'effet éliciteur est légèrement plus marqué après 6 jours et 14 jours. Il faudra donc faire agir l'agent éliciteur au-delà de 6 jours afin d'obtenir une augmentation la production en furocoumarines.

3.2.4. Effet de la fraction de la culture du champignon sur la production de furocoumarines

Pour éliciter la production de phytoalexines dans une plante ou dans des suspensions cellulaires végétales, il n'est pas nécessaire que l'agent pathogène soit présent dans son intégralité (Keen *et al.*, 1983). Seuls certains composants des parois cellulaires de l'agent pathogène, ou bien les filtrats des cultures, peuvent suffire à induire la synthèse des composés de défense (Albersheim *et al.*, 1983). La plupart des composants des parois des champignons sont des polysaccharides et/ou des glycoprotéines (Sharp *et al.*, 1984 ; Fernandez-Bolanos et Heredia, 1993). Ce sont ces types de composants qui favoriseraient les réactions conduisant finalement à la biosynthèse des phytoalexines (Gustine *et al.*, 1994).

En général, la partie mycélium de la culture d'un champignon est utilisée pour éliciter des cellules végétales. Nous étudions l'effet éliciteur de *Verticillium* non seulement pour augmenter la synthèse de furocoumarines, mais aussi pour déterminer des réponses plus spécifiques : par exemple, l'extinction ou le déclenchement de la synthèse d'une des 4 furocoumarines. Ainsi, toutes les parties de la culture du champignon ont-elles été testées sur les cultures de Rues (souche DEO) pour détecter d'éventuelles réponses intéressantes. Les fractions qui ont été étudiées (**expérience 3**, p 44) sont le mycélium lyophilisé (EP 0,1%), le milieu de culture filtré (EM 0,1%) et la culture entière

homogénéisée (mycélium + milieu, EC 0,1%). Chacun de ces agents éliciteur a été dosé pour être équivalent à 0,1% de mycélium dans le milieu. Afin de comparer la réponse à celles de l'**expérience 2**, un traitement contenant 0,01% de mycélium lyophilisé dans le milieu (EP 0,01%) a aussi été testé. Les cultures ont été poursuivies 48 h et 14 jours.

A 48 heures et 14 jours : Les concentrations en furocoumarines dans les cultures élicitées sont supérieures aux cultures témoins. Néanmoins, aucun effet significatif des différents éliciteurs n'a été montré sur les productions de matière sèche et de furocoumarines (**Tableau C-12**).

Durée de culture		Equivalence à 0,1% de mycélium lyophilisé EP 0,1%	EM 0,1%	EC 0,1%	Equivalence à 0,01% de mycélium lyoph. EP 0,01%	Pas d'éliciteur Témoin	*p*
48 heures élicitation de courte durée	PMS *(g.flacon^{-1})*	0,40	0,38	0,44	0,41	0,36	*NS*
	Teneur intracell. (mg.g^{-1} MS)	2,6	4,4	2,4	3,1	2,1	*NS*
	Conc. extracell. *(mg.L^{-1})*	1,0	1,7	1,1	1,2	0,8	*NS*
	Quantité/flacon *(mg.flacon^{-1})*	1,2	1,8	1,4	1,5	1,0	*NS*
14 jours élicitation de longue durée	PMS *(g.flacon^{-1})*	0,70	0,78	0,68	0,86	0,84	*NS*
	Teneur intracell. (mg.g^{-1} MS)	2,7	2,2	1,4	2,1	1,9	*NS*
	Conc. extracell. *(mg.L^{-1})*	2,6	4,6	3,4	3,6	2,4	*NS*
	Quantité/flacon *(mg.flacon^{-1})*	2,1	2,0	1,2	2,1	1,7	*NS*

Tableau C- 12 : Elicitation de suspensions cellulaires de *Ruta graveolens* par *Verticillium dahliae* : effet de la fraction de culture du champignon sur la réponse à l'élicitation

Milieu = 75 mL de milieu $B_5(30)D_2$ dans des flacons de 250 mL. EM = filtrat, EC = culture entière, EP = mycélium lyophilisé. r = 3 répétitions par traitement

A 48 heures : Les différentes fractions de la culture de *Verticillium*, utilisé comme éliciteur ne montrent pas de différence significative. Cependant, des tendances ont été observées. L'éliciteur EM 0,1%, c'est-à-dire le FILTRAT de la culture de *Verticillium*, conduit à la plus forte production de furocoumarines (teneur intracellulaire, concentration dans le milieu et quantité totale par flacon) (**Tableau C-12**).

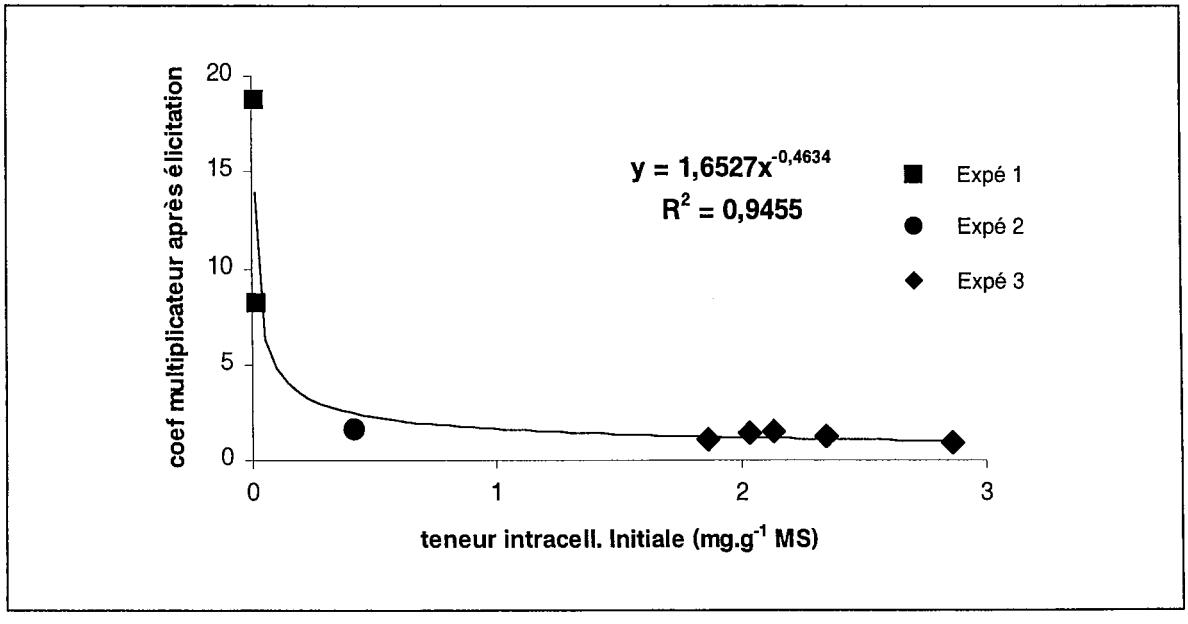
Après 48 heures de culture, les profils des 4 furocoumarines ont montré la formation de psoralène dans les cellules élicitées (quel que soit l'agent éliciteur) alors que le métabolite est absent des cellules témoins. Les profils des 4 furocoumarines sont totalement différents dans le milieu. Nous avons noté l'absence d'isopimpinelline dans tous les milieux élicités alors que ce métabolite est présent dans les milieux des cultures témoins (34%).

A 14 jours : Les suspensions cellulaires de *Ruta* ne répondent pas significativement aux différentes fractions de la culture de *Verticillium*. Il faut néanmoins noter que la fraction FILTRAT de la culture induit la meilleure réponse à l'élicitation pour la production de matière sèche, la concentration en furocoumarines dans le milieu de culture et la quantité totale de furocoumarines par flacon (**Tableau C-12**).

Après 14 jours de culture, les 4 furocoumarines sont présentes dans les cultures élicitées et les cultures témoins. Le bergaptène représente plus de 95% des 4 furocoumarines dans les milieux élicitées et 90% dans les milieux des

Figure C-27 : **Elicitation de cellules indifférenciées de *Ruta graveolens* par le champignon *Verticillium dahliae* : réponse à l'élicitation en fonction de la concentration initiale des cellules.**

Compilation des valeurs moyennes des expériences 1, 2 et 3.



cultures témoins, sachant qu'il n'y a que 70% de bergaptène dans les cellules. Ce métabolite est donc excrété préférentiellement.

Les différentes fractions de la culture fongique n'ont pas induit d'effet significatif sur les profils des 4 furocoumarines dans les cellules. Nous pouvons noter que les milieux élicités par l'agent éliciteur EM (c'est-à-dire le FILTRAT de culture) contiennent plus de 98% de bergaptène, et ce quelle que soit la durée de la culture végétale (48 h et 14 jours).

Le profil des 4 furocoumarines dans les cultures de cellules est très variable au cours du temps. Ceci induit une difficulté supplémentaire pour interpréter les effets de l'élicitation.

Les différentes fractions de la culture de *Verticillium dahliae* n'ont pas d'effet significatif sur la réponse à l'élicitation, même si la fraction FILTRAT DU MILIEU conduit à des concentrations plus élevées en furocoumrines.

L'élicitation a un effet sur l'excrétion de ces métabolites. L'isopimpinelline reste dans les cellules des cultures élicitées et le bergaptène représente toujours plus de 80% des furocoumarines du milieu.

A 48 heures, l'élicitation induit la formation de psoralène, absent des cultures témoins.

3.2.5. Effet de la concentration initiale en furocoumarines sur la réponse à l'élicitation

Nous avons observé une augmentation drastique de la teneur intracellulaire des furocoumarines dans la première expérimentation testant l'effet de l'élicitation sur la souche SC (jusqu'à 20 fois plus de furocoumarines). Les autres expérimentations ont été réalisées avec une autre souche cellulaire de *Ruta graveolens* (DEO). Cette souche a une teneur intracellulaire supérieure à la souche sc dans le milieu standard $B_5(30)D_2$.

D'après les données des 3 expériences, il semble donc qu'il y ait une corrélation entre la teneur intracellulaire des cellules et la réponse à l'élicitation. Cette relation est du type $Y = a\ X^{-b}$ où Y = (teneur après élicitation / teneur témoin) et X = teneur témoin (**Figure C-27**).

Lorsque la teneur de base de la suspension cellulaire est élevée, la réponse à l'élicitation diminue. Ainsi, une suspension cellulaire qui produit peu aura une production améliorée significativement par l'élicitation. Inversement, la production de furocoumarines par une suspension cellulaire ayant une forte teneur sera faiblement améliorée par l'élicitation.

Le niveau de production final pour la souche DEO non élicitable (entre 2 et 3 mg.g-1 MS) est cependant supérieur à celui de la souche SC élicitable (moins de 0,2 mg.g-1 MS). Des travaux montrent que des cellules habituées n'ont pas pu être élicitée contrairement aux cellules témoins "normales" (Eilert *et al.*, 1987). Il se pourrait que les cellules DEO aient acquis une physiologie particulière du type habituée ou anergiée et que leur production déjà très élevée, ne puissent être élicitées.

Dans le cas des suspensions cellulaires de *Ruta graveolens*, la réponse à l'élicitation est d'autant plus forte que les cellules contiennent peu de furocoumarines avant élicitation.

3.2.6. Discussion, conclusions

Les traitements éliciteurs réalisés sur les cellules de *Ruta graveolens* par *Verticillium dahliae* ont montré que l'élicitation modifie la concentration en furocoumarines et le profil des 4 furocoumarines. Celle-ci induit notamment la présence de psoralène dans les cellules alors que ce métabolite est en général absent dans les cellules témoins. D'autres éliciteurs biotiques avaient déjà été testés avec succès sur des suspensions cellulaires de *Ruta graveolens*, notamment par la levure *Rhodotorula rubra* (Eilert, 1989).

L'élicitation par *Verticillium dahliae* a augmenté la synthèse de furocoumarines dans les suspensions cellulaires de *Ruta graveolens*. Cette augmentation est corrélée à la teneur intracellulaire en furocoumarines dans les cellules en suspension. En effet, la réponse à l'élicitation est inversement proportionnelle à la concentration initiale en furocoumarines. Autrement dit, la production en furocoumarines est d'autant plus inductible que les cellules produisent peu de furocoumarines au départ. La littérature montre que la production de furocoumarines par des cellules indifférenciées est inductible par élicitation alors qu'elle ne l'est pas dans des tissus différenciés (comme les tiges feuillées) (Eilert, 1989). Le degré de différenciation semble être corrélé au caractère inductible de la production de furocoumarines. Dans le cas de la Rue, nous avons montré que les tissus différenciés comme les tiges feuillées ont une teneur en furocoumarines plus élevée que les suspensions cellulaires (Massot *et al.*, 2000). Nous avons remarqué que les suspensions qui répondent peu à l'élicitation sont celles qui ont une teneur constitutive plus élevée en furocoumarines. Ainsi, le niveau initial de production de furocoumarines constituerait une deuxième explication de la réponse variable à l'élicitation, pour les suspensions et les cultures de tissus différenciés. Cependant, l'hypothèse du niveau de différenciation des tissus n'est pas rejetée.

La stimulation du métabolisme des phénylpropanoïdes est une défense importante chez les plantes contre les stresses environnementaux, comme des blessures ou des attaques de pathogènes. C'est l'augmentation du flux de carbone vers cette voie qui conduirait à l'accumulation de composés ayant des rôles de défense structurale (lignine et autres composés phénoliques liés aux parois) et chimique (isoflavonoïdes, furocoumarines) (Hahlbrock et Scheel, 1989). L'attention a été focalisée sur l'acide jasmonique et le méthyl-jasmonate (jasmonates). Ces molécules de signal intracellulaire entraîneraient l'activation de l'expression de gènes de défense, en réponse à une blessure, un traitement éliciteur ou une infection par un pathogène (Farmer, 1994 ; Blechert *et al.*, 1995 ; Creelman et Mullet, 1995). Il a été montré que les suspensions cellulaires de plusieurs espèces accumulent rapidement des précurseurs de jasmonates en réponse à un traitement éliciteur (parois de levure) (Mueller *et al.*, 1993). Ainsi, des auteurs ont suggéré que les jasmonates ont un rôle dans l'activation des gènes de la voie des phénylpropanoïdes (Dittrich *et al.*, 1992 ; Mueller *et al.*, 1993 ; Fang *et al.*, 1999). Dans le cas de cellules de soja, l'expression de la PAL, enzyme en amont de la voie conduisant aux furocoumarines, est activée par des jasmonates exogènes (Creelman *et al.*, 1992 ; Gundlach *et al.*, 1992). De plus, l'acide jasmonique a activé l'accumulation de furocoumarines dans des suspensions cellulaires de *Petroselium* (Kauss *et al.*, 1992 ; Ellard-Ivey et Douglas, 1996). Par conséquent, dans nos suspensions cellulaires de Rue, les jasmonates pourraient intervenir dans l'activation des gènes stimulant la biosynthèse des furocoumarines.

Planche 12 : Formation d'un cal (gauche) à partir d'un explant d'*Aloe vera* (droite) : microimages RMN. Résolution 110 µm.

Paramètres de la microimagerie RMN : Te = 15 ms ; Tr = 1,5 s

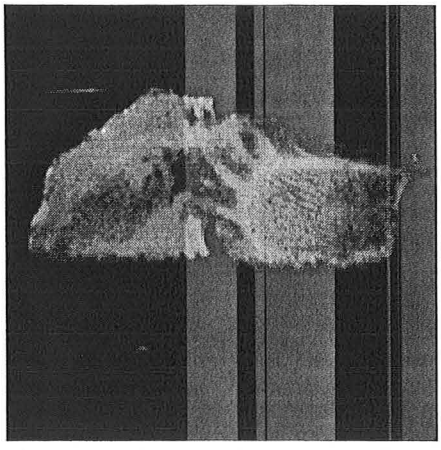
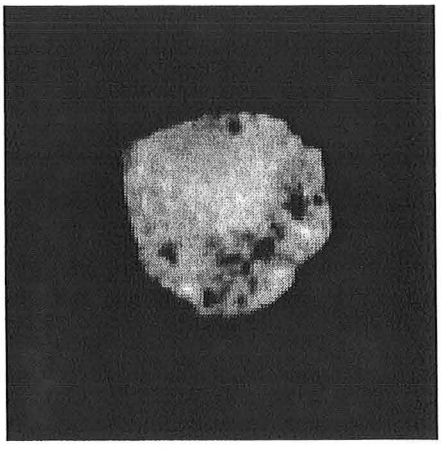


Planche 13 : Immobilisation de cellules indifférenciées de *Ruta graveolens* dans des billes d'alginate : microimages RMN. Résolution 86 µm (a) et 35 µm (b).

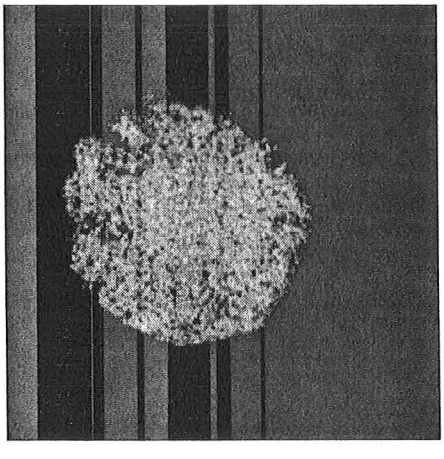
Paramètres de la microimagerie RMN : Te = 25 ms ; Tr = 1,5 s

Billes d'alginate : 2% d'alginate SG300, cultivées par 66 jours, milieu non enrichi en $CaCl_2$.

a)



b)



3.3. IMMOBILISATION DE CELLULES INDIFFERENCIEES DANS DES BILLES D'ALGINATE

L'immobilisation de cellules indifférenciées dans des billes d'alginate est un procédé qui peut induire des modifications physiologiques des cultures végétales (Gontier, 1993). Des cultures de cellules de Rues immobilisées ont été comparées aux suspensions cellulaires pour déterminer si ces modifications se produisent chez *Ruta graveolens*.

Quatorze cultures de cellules immobilisées ont été initiées : les 14 modalités sont présentées dans le **Tableau B-8**, p 45. Nous avons testé 3 dates de récoltes (25, 66 et 75 jours), 2 types d'alginate ayant des viscosités différentes (SIGMA, SG 300), 2 concentrations d'alginate (2% et 3%) et deux milieux de culture (sans ou avec complément de 3 mM de Calcium).

3.3.1. Observation des billes en microimagerie RMN : évaluation de l'apport de cette technique

Nous avons utilisé un outil peu classique pour les cultures *in vitro* : la microimagerie RMN. Le but des essais de microimagerie RMN était d'évaluer les apports éventuels de cette technique dans l'étude de la croissance et la production des cellules immobilisées dans des billes d'alginate : cette technique pourrait permettre d'obtenir des données sur le transfert des nutriments et des métabolites secondaires entre le milieu, l'alginate et les cellules.

Cette méthode présente des avantages majeurs : c'est une méthode d'analyse non destructrice et non invasive. Elle permettrait donc de suivre la croissance de cellules dans des billes d'alginate, sous réserve que la résolution de la méthode soit suffisante. Cette méthode est un couplage de la Résonance Magnétique Nucléaire et d'une méthode d'imagerie. C'est donc une méthode analytique visuelle et indirecte.

Nous avons utilisé une méthode couplant la ^{1}H RMN avec l'imagerie. Cela nous a donné la possibilité de suivre l'état de protons dans les échantillons et surtout les protons de l'eau (H_2O). La microimagerie RMN avait donné des résultats très encourageants sur des cultures *in vitro* d'*Aloe vera* (Milesi, 1997) : un système de vascularisation a été mis en évidence entre l'explant d'*Aloe vera* et le cal néoformé (**Planche 12**) et entre le milieu de culture et le cal. Nous avons donc décidé de réaliser des images de cellules indifférenciées de *Ruta graveolens*, immobilisées dans des billes d'alginate.

L'objectif de la première étape a été de définir les paramètres d'acquisition des données afin d'obtenir des clichés ayant une résolution correcte. Des images de résolution 86 µM (**Planche 13a**), 35µm (**Planche 13b**) et 24 µm ont pu être obtenues. Les images de résolution 24 µm sont très longues à obtenir (12 heures d'acquisition). Les images de résolution 35 µm ont donc été choisies par la suite (2-3 heures d'acquisition).

L'objectif de la deuxième étape a été de comparer des clichés pour lesquels nous avions fait varier la valeur de TE (echo time) c'est-à-dire le temps entre l'excitation de l'échantillon et l'acquisition des données. La valeur de TR (repetition time), c'est-à-dire le temps entre deux excitations, était fixée à 1,5 s. Différents contrastes peuvent être mis en évidence en faisant varier TE (**Planche 14**). Ces différents contrastes correspondent à des interprétations différentes des images. En effet, on considère (Meininger *et al.*, 1997) que des images dont le TR est supérieur à 1,5

Planche 14 : Immobilisation de cellules indifférenciées de *Ruta graveolens* dans des billes d'alginate : microimages RMN. Te = 7,5 ms (a), Te = 15 ms (b), Te = 25 ms (c), Te = 50 ms (d).

Paramètres de la microimagerie RMN : Tr = 1,5 s ; résolution 35 µm

Billes d'alginate : 2% d'alginate SG300, cultivées par 66 jours, milieu non enrichi en $CaCl_2$.

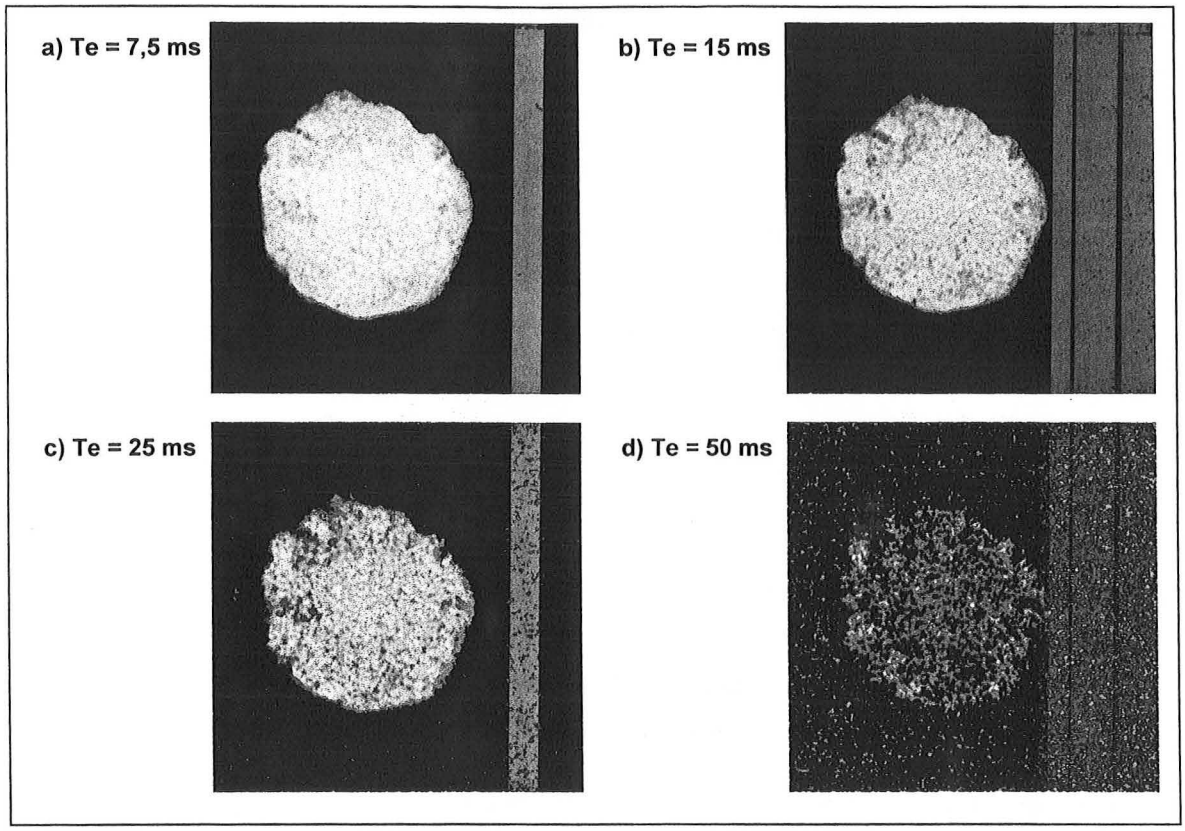
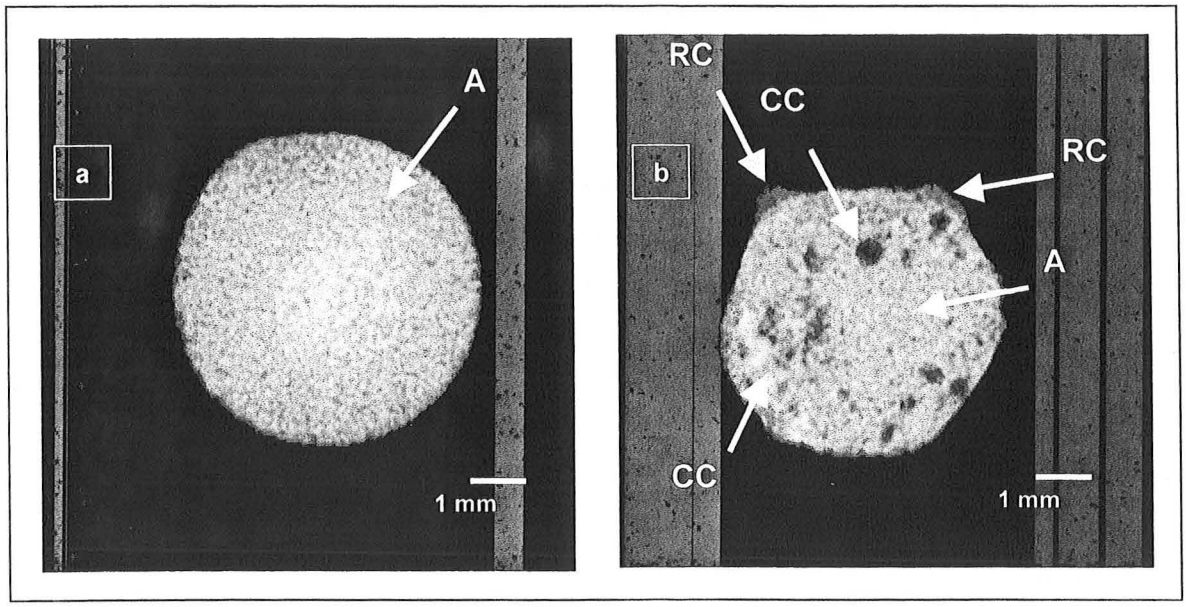


Planche 15 : Immobilisation de cellules indifférenciées de *Ruta graveolens* dans des billes d'alginate : microimages RMN. Bille témoin (a) et Bille contenant des cellules (b).

Paramètres de la microimagerie RMN : Te = 25 ms ; Tr = 1,5 s ; résolution 35 µm

Billes d'alginate : 3% d'alginate SG300, cultivées par 66 jours, milieu enrichi en $CaCl_2$ (3 mM).

A = alginate ; RC = relargage de cellules ; CC = colonies cellulaires



s et dont le **TE est inférieur à 25 ms** représentent la **densité de proton** de l'échantillon (soit par extension la densité de l'eau) (**Planche 14a, b, c**). En revanche, lorsque le **TE est supérieur à 50 ms**, les images représentent le T_2 (= spin spin relaxation time) c'est-à-dire la **densité des protons mobiles** (**Planche 14d**). En d'autres termes, lorsque l'eau est liquide, le T_2 est élevé et lorsque l'eau est à l'état de glace (ou bien liée aux constituants cellulaires), le T_2 est très faible (Ishikawa *et al.*, 1997).

La densité de protons n'est pas homogène dans les billes (**Planche 14a, b, c**) : la périphérie des billes d'alginate est plus hétérogène que le centre des billes. Cependant, la difficulté réside dans l'interprétation des résultats : comment différencier précisément les cellules et l'alginate afin d'attribuer les différentes densités de protons ? L'observation a l'œil nu des cellules montre effectivement que les cellules ont tendance à se développer à la périphérie des billes, du fait de la proximité du milieu de culture (Gontier, 1993).

D'autres clichés ont permis de comparer des billes témoins sans cellules et des billes contenant des cellules (**Planche 15**). Un gradient de densité de proton est observé dans les billes témoins (**Planche 15a**), suggérant une gélification hétérogène de la bille (Murano *et al.*, 1998). Lorsque les billes contiennent des cellules, la structure de la bille est beaucoup moins régulière (**Planche 15b**). Le contour de la bille est plus accidenté et le contenu de la bille montre une densité de proton hétérogène mais sans gradient réel. On peut distinguer cependant l'alginate à l'intérieur (**Planche 15b, A**), et certainement les colonies cellulaires à la périphérie (**Planche 15b, CC**). Cependant, il est difficile de les situer avec précision, dans les zones sombres et/ou claires. Nous avons noté la présence de cellules relarguées dans les milieux de culture : des cellules en cours de relargage peuvent être distinguées sur le cliché (**Planche 15b, RC**).

La microscopie ^{1}H RMN peut apporter de nouvelles informations lors de l'étude des cultures *in vitro*, sur l'état de l'eau dans les échantillons en particulier.

Les interprétations sur la signification biologique des clichés sont encore difficiles. Le travail de collaboration entre les physiciens et les biologistes doit se poursuivre. Des conditions expérimentales très précises (valeurs de TE et TR) pourraient mettre en évidence la circulation de l'eau dans les billes ou bien des gradients de concentrations en sucres.

3.3.2. Evaluation de l'effet immobilisation

Les effets de l'immobilisation ont été évalués sur des cellules de la souche DEO, immobilisées dans des billes d'alginate. Les résultats sur les concentrations en furocoumarines ont été traités par Analyse en Composantes Principales en raison du grand nombre de modalités et du plan incomplet (14 modalités testées sur 24 possibles). Deux ACP ont été effectuées : une avec les variables mesurées dans les cellules et une avec les variables mesurées dans les milieux (Milesi *et al.*, 2001). Les deux ACP sont hautement significatives dans le plan F1*F2 (**Figure C-28**, page suivante) puisque ce plan montre 87% de la variabilité mesurée pour les furocoumarines intracellulaires et 85% de la variabilité mesurée pour les furocoumarines extracellulaires. Les coordonnées des variables, dans le plan F1*F2 (**Figure C-28**), montrent que toutes les variables sont bien représentées dans le plan F1*F2 puisqu'elles sont proches des cercles de rayon 1.

Figure C-28 : **Analyses en composantes principales (ACP) des concentrations intracellulaires et ACP des concentrations intracellulaires des 4 furocoumarines : coordonnées des variables discriminantes dans le plan principal F1*F2.**

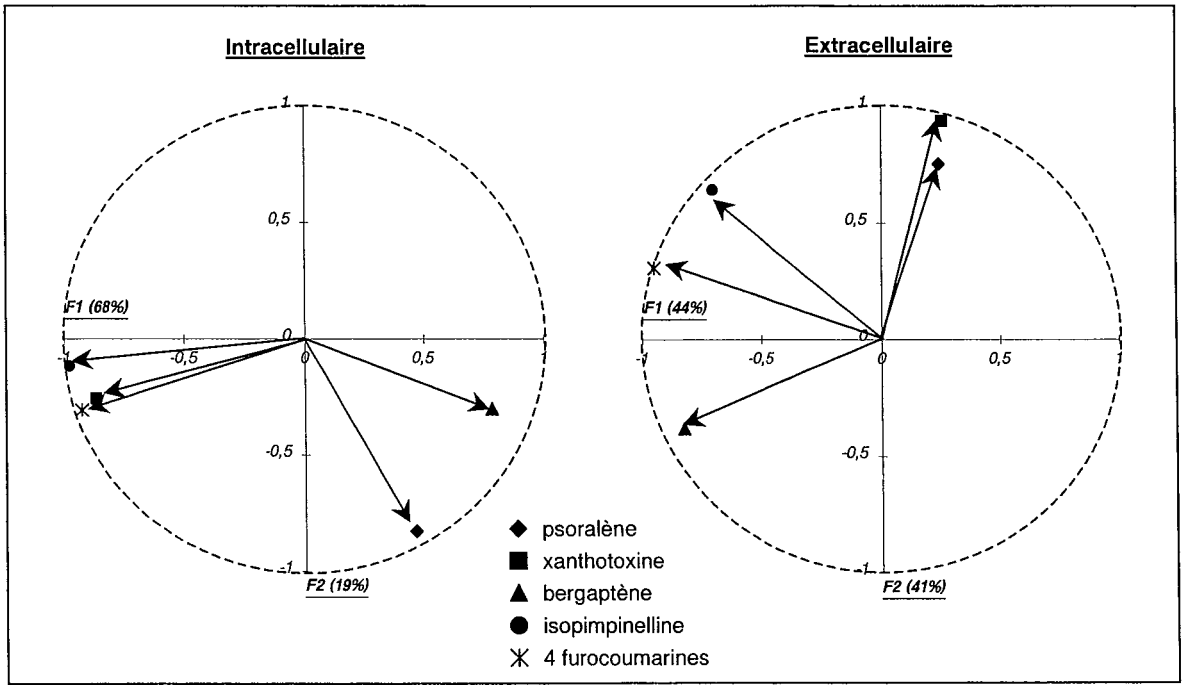


Figure C-29 : Analyses en composantes principales (ACP) des concentrations intracellulaires des 4 furocoumarines : individus représentés dans le plan principal F1*F2.

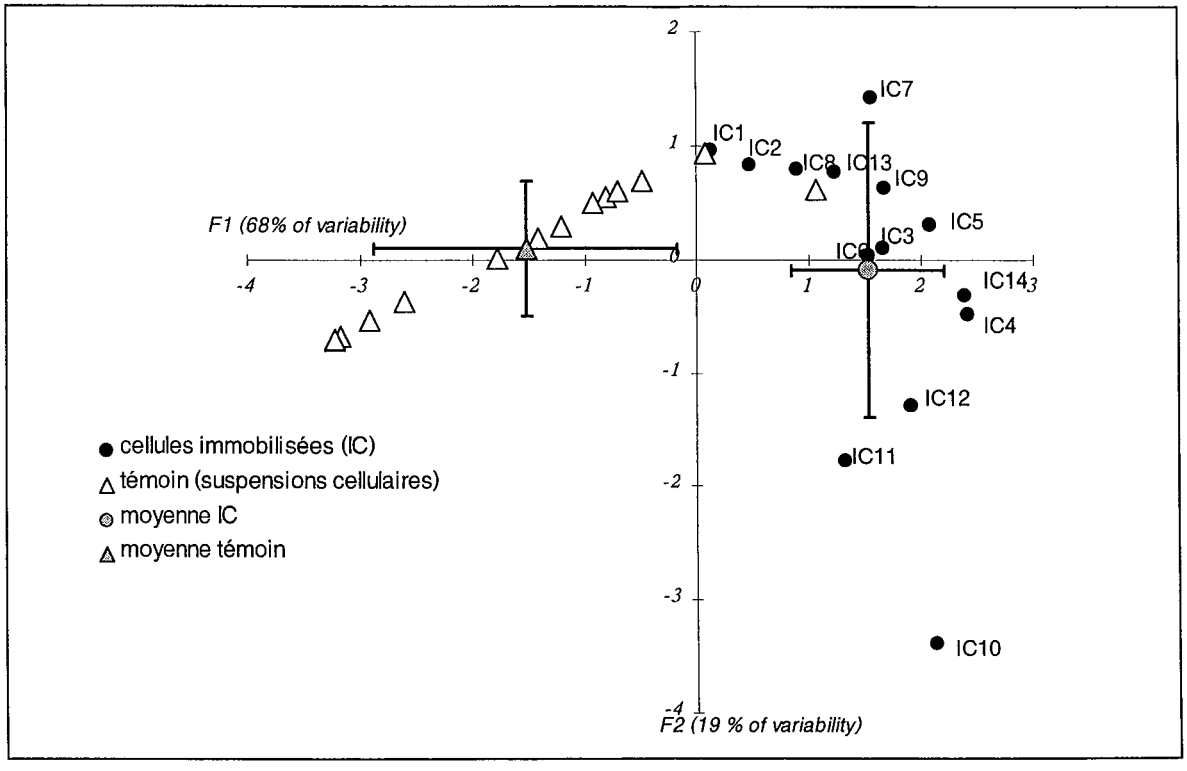
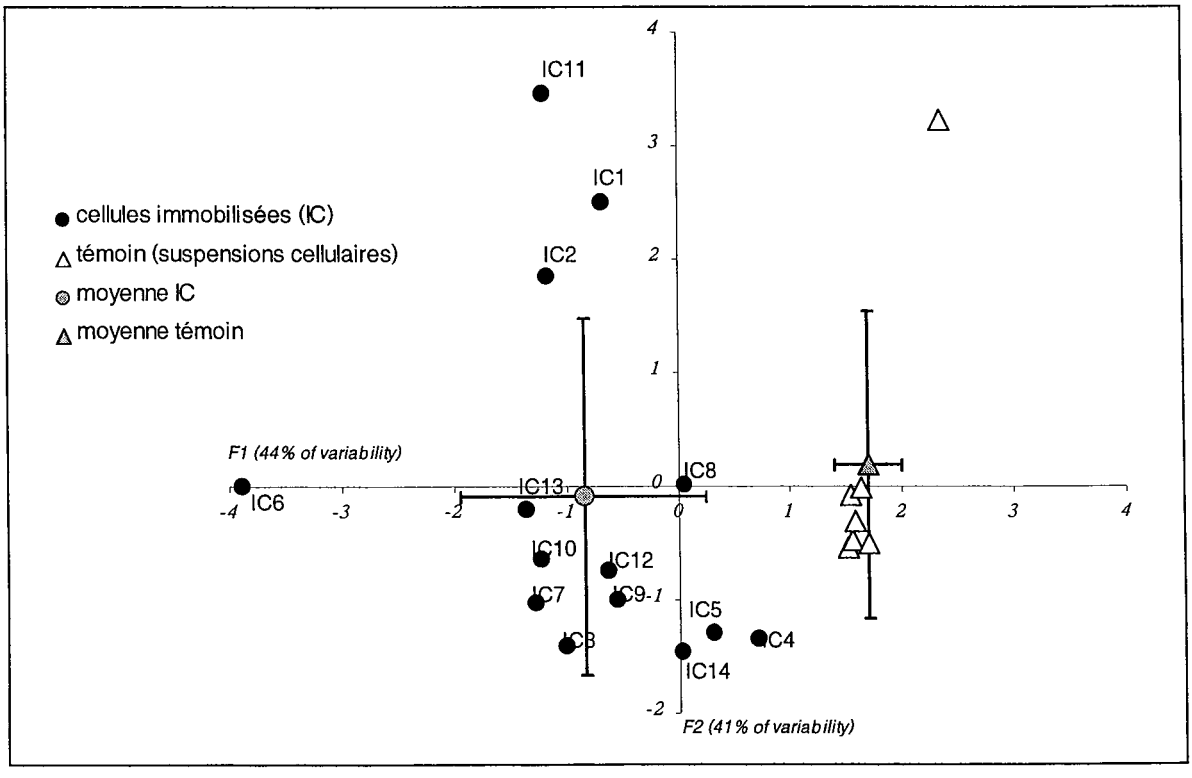


Figure C-30 : Analyses en composantes principales (ACP) des concentrations intracellulaires des 4 furocoumarines : individus représentés dans le plan principal F1*F2.



L'ACP sur les teneurs intracellulaires (**Figure C-29**) discrimine les suspensions cellulaires et les cellules immobilisées, car elles correspondent à deux groupes distincts sur la carte. La variabilité affectant les cellules immobilisées est plus grande que celle des cellules témoins (suspensions cellulaires). L'analyse de variance montre que la teneur des 4 furocoumarines et du bergaptène est supérieure dans les suspensions cellulaires par rapport aux cellules immobilisées (**Tableau C-13**). Les cellules immobilisées contiennent plus d'isopimpinelline.

Dans le milieu de culture, les deux groupes, correspondant aux cellules immobilisées et aux suspensions cellulaires, sont bien discriminés par l'ACP (**Figure C-30**). La concentration des 4 furocoumarines est supérieure dans les milieux de cellules immobilisées par rapport aux milieux de suspensions cellulaires (**Tableau C-13**). Le milieu de culture des cellules immobilisées contient plus d'isopimpinelline et de bergaptène que les suspensions cellulaires.

	Teneur intracellulaire (mg.g^{-1} MS)			**Concentration milieu (mg.L^{-1})**		
	isopimpinelline	*bergaptène*	4 furocoumarines	*isopimpinelline*	*bergaptène*	4 furocoumarines
Cellules immobilisées	*0,66*	*0,81*	1,50	*0,93*	*0,99*	1,96
Cellules témoins	*0,02*	*3,00*	3,14	*0,05*	*0,33*	0,48
Cellules immobilisées	*A*	*B*	B	*A*	*A*	A
Cellules témoins	*B*	*A*	A	*B*	*B*	B
Effet de l'immobilisation	***	***	***	***	*	**

Tableau C- 13 : Analyse de variance des teneurs intracellulaires et concentrations extracellulaires en furocoumarines dans les cultures de cellules immobilisées et les suspensions cellulaires

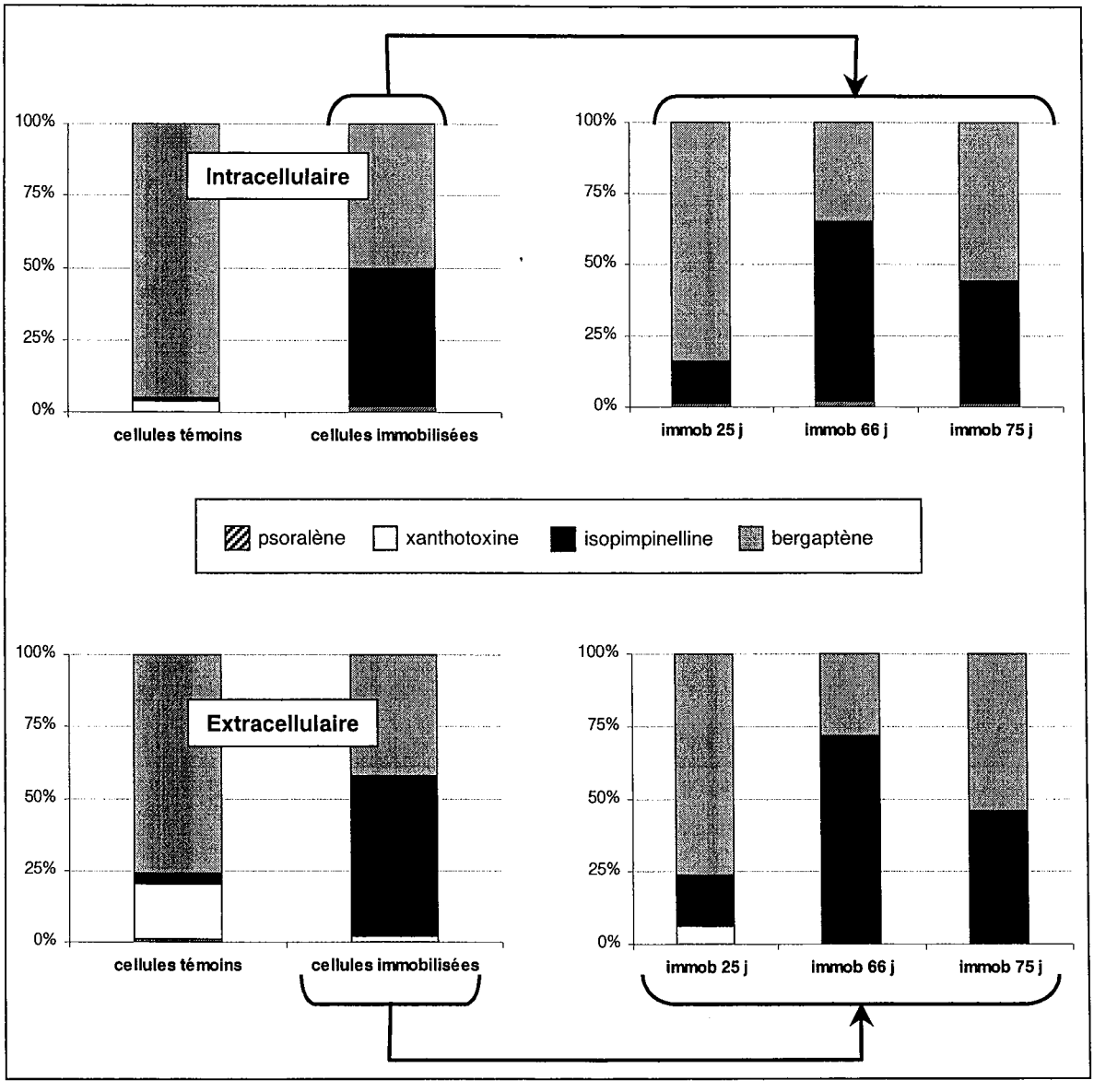
* = *'p<0,05'*, ** = *'p<0,01'*, *** = *'p<0,001'*.

L'immobilisation a un effet sur le profil des 4 furocoumarines (**Figure C-31**, page suivante). Le **psoralène** est excrété dans le cas des cultures témoins, et reste dans les cellules dans le cas de l'immobilisation. Le psoralène représente moins de 2% des 4 furocoumarines pour les cellules en suspension et les cellules immobilisées. La **xanthotoxine** est présente dans les cultures témoins (3% dans les cellules et 19% dans le milieu) et absente dans les cultures immobilisées (sauf dans le milieu des cellules immobilisées depuis 25 jours). L'**isopimpinelline** représente moins de 4% des 4 furocoumarines dans les cultures témoins alors qu'elle représente 50% des 4 furocoumarines dans les cultures immobilisées. En revanche, le **bergaptène** représente respectivement plus de 95% et 75% des furocoumarines dans les cellules et les milieux des cultures témoins alors qu'elle représente 50% des furocoumarines dans les cultures immobilisées.

Quelles que soient les conditions d'immobilisation, des modifications (qualitatives et quantitatives) des furocoumarines sont observées. Les furocoumarines sont relarguées plus largement sous l'effet de l'immobilisation (4 fois plus de furocoumarines dans le milieu des cultures immobilisées). Néanmoins, les suspensions témoins ont 2 fois plus de furocoumarines dans la biomasse. Globalement, l'immobilisation n'a pas induit de synthèse *de novo* des métabolites étudiés.

L'immobilisation modifie le profil des 4 furocoumarines et favorise le relargage de ces molécules. Les cultures témoins contiennent en majorité du bergaptène et de la xanthotoxine et les cellules immobilisées du bergaptène et de l'isopimpinelline.

Figure C-31 : **Immobilisation de cellules de *Ruta graveolens* dans des billes d'alginate : profil des 4 furocoumarines dans les cellules et dans le milieu de suspensions cellulaires et de cellules immobilisées.**



3.3.3. Discussion, conclusions

Microscopie ^{1}H RMN

La microscopie ^{1}H RMN a été évaluée pour l'étude des cultures *in vitro*. Cette technique peut apporter des résultats sur l'état de l'eau dans les échantillons en particulier. Cependant, les interprétations des clichés sont encore difficiles et le travail de collaboration entre les physiciens et les biologistes doit se poursuivre. Dans l'avenir, lorsque les conditions expérimentales et les interprétations seront au point, les recherches seront poursuivies :

- sur le suivi au cours du temps de la colonisation des cellules dans les billes d'alginate
- sur les densités de protons et la mobilité des protons au sein des billes et au sein des colonies cellulaires formées dans les billes. Il sera même possible d'obtenir des résultats sur les coefficients de diffusion des sucres et de l'eau afin d'étudier les transferts de matière dans les billes d'alginate (Pope *et al.*, 1993 ; Kockenberger *et al.*, 1997). Ces recherches devront être couplées avec la microscopie photonique pour accéder au maximum d'informations complémentaires des 2 techniques.

Immobilisation des cellules de *Ruta graveolens*

L'immobilisation des cellules est un des 2 traitements que nous avons essayé afin de modifier la production et les profils des 4 furocoumarines. L'immobilisation modifie le profil des 4 furocoumarines : les cultures témoins contiennent en majorité du bergaptène et de la xanthotoxine alors que les cellules immobilisées contiennent en majorité du bergaptène et de l'isopimpinelline. L'immobilisation favorise nettement le relargage des molécules.

Le calcium, utilisé pour gélifier l'alginate et former les billes, a montré qu'il pouvait être impliqué dans l'induction de phytoalexines (Thomasset *et al.*, 1990 ; Ishihara *et al.*, 1996). Plusieurs autres mécanismes sont mis en avant pour expliquer que l'immobilisation affecte la physiologie cellulaire et la production de métabolites secondaires. Par exemple, l'immobilisation peut avoir des effets physiques sur les cellules (Payne *et al.*, 1991). En fait, l'immobilisation protège les cellules des stress mécaniques qu'elles peuvent subir : ces stress interviennent sur des paramètres morphologiques tels que la taille des agrégats ou la composition des parois (pectine, hémicellulose, cellulose). Dans le cas de l'immobilisation, la division des cellules se réalise dans une espace restreint. Ce stress de compression peut induire un alignement de la division des cellules et induire des signes de différenciation. Cette différenciation morphologique peut expliquer des différenciations biochimiques déterminant la biosynthèse de certaines molécules du métabolisme secondaire.

L'immobilisation agit aussi sur les cellules à travers les effets de matrice (Payne *et al.*, 1991). En effet, les composants du milieu autour des cellules peuvent être influencés par la matrice qui forme un micro-environnement où les nutriments se concentrent. L'immobilisation induit une hétérogénéité spatiale et notamment un gradient de concentration des composants du milieu (hormones, sucres, minéraux) dans les billes (Payne *et al.*, 1991). Ce gradient de concentration peut affecter la différenciation des cellules et la favoriser. De plus, la matrice elle-même peut relarguer des composés (inhibiteurs ou stimulants) qui influence la physiologie des cellules immobilisées.

3.4. POLYMORPHISME DE SUSPENSIONS CELLULAIRES DE RUES

L'amélioration du rendement en furocoumarines par les suspensions cellulaires passe par la sélection de souches ayant de fortes teneurs (**Figure A-13**, p29). Ainsi, nous avons déterminé la teneur en furocoumarines de différentes souches de *Ruta graveolens* afin de quantifier la variabilité de ces souches pour la production de furocoumarines et de déterminer une souche fortement productrice. Ces souches ont été initiées suivant le protocole décrit dans le chapitre **B**, paragraphe **2.1**, p 41. Elles ont été établies dans des conditions identiques et sont cultivées dans le même milieu ($B_5(30)D_2$).

Les teneurs en furocoumarines, mesurées sur 3 périodes de culture, sont comprises entre 0,3 et 19,4 $mg.g^{-1}$ MS (**Figure C-32** et **Tableau C-14**). Pour la période de culture C[a], la teneur des souches varient de 5,0 à 19,4 $mg.g^{-1}$ MS.

La teneur en furocoumarines semble augmenter lorsque la souche cellulaire vieillit (teneurs sur la période B[b] supérieures aux teneurs de la période A[c]). De plus, la teneur en furocoumarines augmentent lorsque la durée de culture augmente: les teneurs de la période C[a] (36 jours de culture) sont supérieures aux teneurs de la période B[b] (**Figure C-32**). Le profil des 4 furocoumarines est aussi très variables entre les souches et, pour une souche, suivant la période de culture considérée (**Tableau C-14**). Globalement, les deux furocoumarines majoritaires sont le bergaptène et l'isopimpinelline.

Souche cellulaire	$mg.g^{-1}$ MS	%			
	Teneur en furocoumarines	**psoralène**	**xanthotoxine**	**isopimpinelline**	**bergaptène**
E	1,6 - 6,8	4 - 5	2 - 11	11 - 31	52 - 83
F	2,5 - 11,0	3 - 12	0 - 12	13 - 73	20 - 75
I	3,8 - 5,1	0 - 6	6 - 9	21 - 24	64 - 70
J	0,3 - 5,4	0 - 0	0 - 13	0 - 43	44 - 100
K	0,7 - 7,6	0 - 23	4 - 14	21 - 61	28 - 49
L	5,0 - 8,3	2 - 17	8 - 10	17 - 48	41 - 58
M	1,4 - 7,7	0 - 6	7 - 18	29 - 41	47 - 58
O	0,4 - 7,3	0 - 13	6 - 27	22 - 45	35 - 66
P	0,8 - 19,4	3 - 11	2 - 8	38 - 55	26 - 57

Tableau C- 14 : Gammes des teneurs en furocoumarines et profil des 4 furocoumarines détectées dans différentes souches de *Ruta graveolens*

Culture en Erlenmeyer, dans 75 mL de milieu B5(30)D2

Gammes obtenues sur 3 périodes de culture : A-du 25/10 au 16/11/1999 ; B-du 01 au 18/02/2000 ; C-du 20/04 au 26/05/2000

Nous avons observé une grande diversité dans la morphologie (de cellules fines à gros agrégats) et la coloration des souches (**Planche 16**). Il nous a semblé intéressant de savoir si des morphologies particulières pouvaient indiquer un fort potentiel de production. L'observation des suspensions fait ressortir que la souche P, ayant la plus forte teneur

[a] *période C = du 20/04 au 26/05/2000 = 36 jours*
[b] *période B = du 01 au 18/02/2000 = 17 jours*
[c] *période A = du 25/10 au 16/11/1999 = 23 jours*

Planche 16 : Polymorphisme de suspensions cellulaires de *Ruta graveolens*.

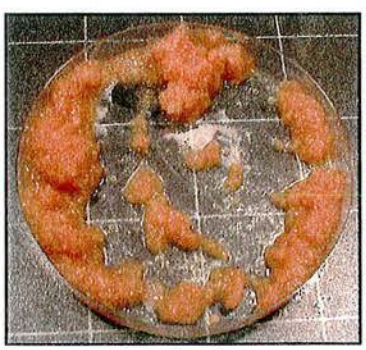
Milieu de culture = $B_5(30)D_2$ = milieu Gamborg B_5, 30 g.L^{-1} saccharose, 2 mg.L^{-1} 2,4D.

M = morphologie ; C = Couleur

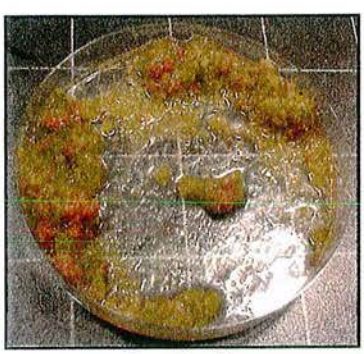
Souche E
M : Cellules fines et agrégats
C : vert et vert clair

Souche F
M : cellules fines
C : vert et jaune

Souche I
M : gros agrégats
C : vert et brun



Souche J
M : cellules fines
C : brun



Souche K
M : gros agrégat
C : vert et brun

Souche L
M : gros agrégats et cellules fines
C : vert

Souche M
M : Cellules fines et filaments
C : jaune

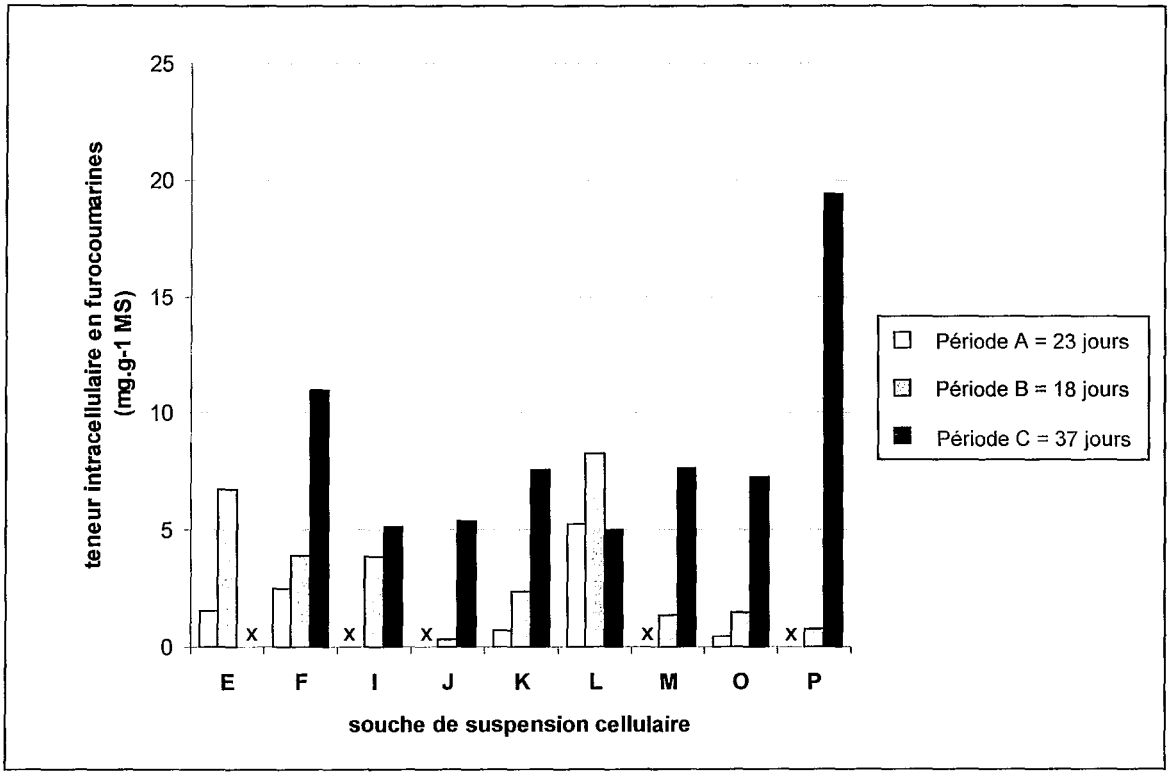
Souche O
M : Cellules fines
C : vert clair et jaune

Souche P
M : gras agrégats
C : vert foncé

Figure C-32 : **Teneurs en furocoumarines de différentes souches de suspensions cellulaires de *Ruta graveolens*.**

cultivées en Erlenmeyer dans 75 mL de milieu $B_5(30)D_2$

X = concentration non déterminée



en furocoumarines, a une morphologie très reconnaissable : en milieu liquide, elle forme de très gros agrégats, a une couleur vert-foncé très soutenue, et sa biomasse a une croissance rapide et importante (**données non présentées**).

Nous savons que les souches proviennent de graines d'un même lot (lot 7284), et ont été initiées dans les mêmes conditions. Pourtant, leur variabilité est très grande à plusieurs points de vue : concentration en furocoumarines, concentration au cours du temps, morphologie, coloration. Les cellules d'une même souche proviennent bien d'un même individu (germination stérile d'une seule graine), mais ont une origine pluricellulaire. En effet, elles peuvent venir de feuilles ou de racines et ont donc subi des influences différentes notamment des influences hormonales : elles ont donc des phénotypes différents (génotypes identiques et environnements différents). Ces cellules, une fois mises en cultures, gardent les traces des influences subies. Ainsi, un phénotype particulier peut devenir majoritaire dans la suspension cellulaire s'il est mieux adapté aux conditions environnementales. De plus, une dérive génétique des cellules peut apparaître. Ceci explique la variabilité au cours du temps de la production de furocoumarines, plus classiquement appelée variation somaclonale. Ainsi, à partir d'un pool de suspensions provenant d'un même lot de *Ruta graveolens*, il est possible d'obtenir des suspensions ayant des morphologies très variées et des niveaux de production de biomasse ou de métabolites secondaires très différents.

La sélection de cellules ayant des compétences particulières peut être accentuée lorsque les souches sont cultivées sur une longue période (comme lors de la période C, pendant 36 jours). Les cellules se retrouvent dans une situation de stress, où les milieux sont appauvris en éléments nutritifs et hormones, et elles peuvent acquérir des potentiels de croissance particuliers (cellules anergiées ou habituées, Jackson et Lyndon, 1990).

Les souches testées montrent une grande variabilité, à la fois dans les teneurs en furocoumarines et dans leur morphologie. Les teneurs en furocoumarines sont comprises entre 0,3 et 19 mg.g-1 MS.

La teneur des souches augmentent lorsque les cultures vieillissent et lorsque la durée entre 2 repiquages augmente.

3.5. CONCLUSIONS

La croissance des suspensions cellulaires de *Ruta graveolens* est très variable : nous avons obtenus des temps de doublement entre 5 et 20 jours pour la même souche. Les suspensions de *Ruta graveolens* semblent très sensibles à l'inoculum de départ, même si ce fait doit être vérifier. La croissance en bioréacteur des cellules n'est pas affectée par rapport à la croissance en flacon. Il semble que l'utilisation de milieux plus riches en minéraux permettrait d'augmentation la production de cellules.

Les suspensions cellulaires de *Ruta graveolens* produisent des furocoumarines. Nous avons globalement détecté des teneurs entre 0,1 et 20 $mg.g^{-1}$ MS. Les plus fortes concentrations ont été obtenues par la sélection de souches après plusieurs repiquages. Pour les teneurs les plus faibles, nous avons montré que l'élicitation pouvait induire une forte augmentation de la production en furocoumarines. L'élicitation permet d'obtenir le relargage des métabolites dans le milieu : ceci permettrait d'éviter le sacrifice des cellules lors de la récolte des métabolites. L'immobilisation permet aussi le relargage des métabolites. Nous avons détecté 4 fois plus de furocoumarines dans le milieu des cellules immobilisées que dans celui des cultures témoins. La production de furocoumarines peut-être optimisée par ces deux traitements.

L'élicitation des cellules et l'immobilisation ont fortement modifié le profil des 4 furocoumarines. Les cellules témoins contiennent surtout du bergaptène (70% environ). En cas d'absence de psoralène et xanthotoxine dans les cellules témoins, l'élicitation induit la synthèse de ces 2 furocoumarines, à l'état de traces. L'immobilisation permet la synthèse préférentielle de bergaptène et d'isopimpinelline sur des cellules témoins contenant du bergaptène et de la xanthotoxine. Ainsi, ces changements métaboliques sont particulièrement intéressants quant à l'étude des voies de biosynthèse de ces 4 furocoumarines.

Nous avons montré dans le chapitre bibliographique que le bergaptène semble être la furocoumarines la plus intéressante sur le plan pharmaceutique, notamment pour la réduction des effets secondaires. Nous avons observé que le filtrat de la culture de *Verticillium dahliae* permet d'obtenir 98% de bergaptène dans le milieu. C'est aussi la fraction de culture fongique qui induit la plus forte stimulation de la synthèse de furocoumarines.

Dans la discussion générale qui suit, nous avons comparé la production de furocoumarines par des plantes cultivées au champ et par des cultures *in vitro* afin de connaître lequel des deux procédés de production serait le mieux adapté pour l'obtention de furocoumarines à grande échelle.

D. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

D. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Après avoir présenté les résultats majeurs obtenus, nous nous proposons de discuter ces résultats ainsi que la démarche que nous avons choisie pour répondre aux objectifs fixés, c'est-à-dire l'étude des potentialités de production de furocoumarines par des plantes entières du genre *Ruta* et des suspensions cellulaires de *Ruta graveolens*. Cette discussion comportera 4 points : nous reviendrons d'abord sur les résultats obtenus pour chacun des 2 procédés de production (plante entière et suspension cellulaire) ; puis, nous comparerons ces deux procédés. Enfin, nous proposerons une réflexion globale sur la démarche que nous avons entreprise pour étudier la production de métabolites secondaires par des végétaux.

1. LA PLANTE ENTIERE

Le premier point que nous avons cherché à éclairer fut la localisation des furocoumarines dans la Rue. Nous avons déjà montré qu'environ 60% de la quantité totale de furocoumarines contenues dans la plante est localisés dans les feuilles et les fruits. Les fruits seuls contiennent environ 40% des furocoumarines. Cette localisation des furocoumarines nous conduit à poser la question suivante : où sont synthétisées les furocoumarines stockées dans ces lieux privilégiés tels que les enveloppes des fruits ? Il est difficile de répondre à cette question au vu des connaissances actuelles sur les voies de biosynthèse des furocoumarines. En effet, il faudrait développer une méthode qui permettrait de connaître, par exemple, la localisation des dernières étapes de la formation des furocoumarines qui nous intéressent. Cette méthode de localisation pourrait être l'**hybridation *in situ*** des ARNm codant pour les enzymes impliquées dans ces dernières étapes. Les enzymes concernées pourraient être la psoralène-synthase (formation du psoralène), les psoralène-(5 ou 8)-monooxygénases (participant à la formation du bergaptène ou de la xanthotoxine) ou encore les (5 ou 8)-O-méthyltransférases (formation de l'isopimpinelline) (**Figure A-4**, p 12). Cependant, les gènes codant pour ces enzymes ne sont pas encore séquencés chez la Rue. Le laboratoire développe actuellement des études dans cette voie, en cherchant notamment à isoler les ARNm des psoralène-monooxygénases.

Nous pourrions encore imaginer une autre méthode de localisation de la synthèse des furocoumarines : il s'agirait de **marquer les assimilats** ($^{14}CO_2$) de la plante et de détecter l'apparition des furocoumarines marquées dans les tissus de la plante (par autoradiographie ou HPLC couplée à un détecteur de radioactivité). Cette méthode est cependant très limitée à cause de la dilution des assimilats marqués jusqu'à la formation des furocoumarines (moins de 1% de la matière sèche).

La localisation plus fine des furocoumarines pourrait aider à mieux comprendre la dynamique de ces métabolites secondaires. Nous avons déjà montré qu'au niveau des feuilles, la teneur en furocoumarines est plus forte dans les nervures que dans les limbes, et qu'au niveau des fruits, la teneur est plus forte dans les péricarpes que dans les graines (100 fois plus). Ces résultats ont été obtenus grâce à des dissections fines des tissus. Nous avons aussi réalisé des essais d'**immunohistolocalisation** des furocoumarines (**données non présentées**). Des anticorps anti-

psoralène et anti-bergaptène ont été utilisés sur des coupes de tissus de Rue (fruit, tiges, feuilles). La localisation de ces anticorps, et par transposition des furocoumarines, est faite grâce à une réaction colorimétrique. Les clichés microscopiques n'ont pas été présentés dans ce mémoire car des interrogations persistent quant à cette méthode. En effet, nous n'avons pas pu déterminer avec précision la part de furocoumarines libres et la part des furocoumarines liées (c'est-à-dire les furocoumarines glycosylées et celles liées aux constituants cellulaires). Or, les furocoumarines libres sont sans doute lessivées au cours des bains successifs nécessaires au protocole d'immunohistolocalisation. Il est donc difficile de savoir quelles sont les formes sous lesquelles les furocoumarines sont détectées et si les furocoumarines effectivement détectées sont représentatives de la localisation de ces molécules.

Nous avons montré que les furocoumarines sont situées majoritairement dans les feuilles et les fruits des plants de Rue. Ce résultat nous a conduit, dans le chapitre **C** (résultats, p 54), à préconiser la **récolte de la partie FRUIT+FEUILLE** de la plante. Dans nos expérimentations, nous avons pratiqué uniquement des coupes rases (à 5 cm du sol) pendant 3 années successives. Nous pouvons nous demander quel est l'effet de la récolte réduite aux feuilles et aux fruits (soit une coupe à 25 cm de la surface), voire de la récolte des fruits uniquement (coupe à 53 cm). Dans le cas de coupes entre 25 et 50 cm de la surface, nos pouvons imaginer que les plantes ne réagiront pas de la même manière que dans le cas de coupes rases. La reprise de la végétation pourrait être plus rapide, et la repousse pourrait être plus importante en quantité de biomasse produite. Suivant le comportement des plantes à la repousse, il serait même possible de réaliser **plusieurs récoltes par an**. Ce cas de figure ne deviendrait intéressant que si la somme des furocoumarines récoltées lors des coupes est significativement supérieure par rapport à une seule récolte par an. Des essais de plantation de Rue en Alsace ont montré que ce n'est pas le cas (Poutaraud *et al.*, 2000), mais les coupes successives ont été réalisées à 10 cm de la surface (coupes relativement basses).

Lors des expérimentations au champ, testant différentes pratiques culturales (effet de coupes, effet du stade de récolte, effet de la fertilisation azotée), nous avons mis en évidence l'**incidence forte du terroir** sur la production de furocoumarines. Comme il a déjà été précisé, le terroir conjugue plusieurs paramètres : la zone géographique, qui détermine le climat sous lequel les plantes vont se développer (niveaux de précipitations, ensoleillement, températures), et le type de sol, caractérisé par sa structure, sa texture ou encore sa fertilité naturelle. *Ruta graveolens* a montré de fortes potentialités sur un sol argilo-limoneux, riche en azote et en magnésium, et sous un climat semi-continental (hiver rude). Cependant, il est difficile de déterminer la part des différents facteurs dans l'élaboration du rendement en furocoumarines. Ce sera l'étude de la culture de la Rue sur plusieurs sites de cultures, ainsi que l'étude plus fine d'autres facteurs (fertilisation minérale notamment), qui conduiront à atteindre une meilleure maîtrise du système Rue/furocoumarines.

Outre les facteurs environnementaux et culturaux, le potentiel génétique permet d'augmenter le rendement en furocoumarines par la culture de Rues. Les études de production de furocoumarines par différentes espèces du genre *Ruta* ont montré que *Ruta graveolens* serait le meilleur candidat. En effet, cette espèce a montré une meilleure adaptabilité au climat semi-continental de Lorraine et une forte production de matière sèche par plante. De plus, *Ruta graveolens* présente une variabilité génétique du caractère "teneur en furocoumarines dans les feuilles". La variabilité de ce caractère offre une marge pour l'amélioration de la production de furocoumarines, par **sélection massale** des individus les plus intéressants. Cependant, la variabilité n'a pas été étudiée pour les caractères "production de

matière sèche" et "quantité totale de furocoumarines produites". De plus, on ne connaît pas l'héritabilité des différentes composantes du rendement chez la Rue. L'héritabilité de la teneur en furocoumarines a été étudiée chez *Pastinaca sativa*. Elle est comprise entre 54 et 98% selon la furocoumarine considérée (54 % pour le bergaptène, 61% pour la xanthotoxine et 98% pour l'isopimpinelline ; Berenbaum *et al.*, 1986). Cependant, nous ne pouvons rien prévoir pour la Rue. De plus, des caractères tels que le rendement en matière sèche sont généralement peu héritables.

Nous ne connaissons pas le mode de reproduction privilégié de *Ruta graveolens*. Cependant, les quelques manipulations que nous avons réalisées ont montré que *Ruta graveolens* pourrait se reproduire aussi bien par autofécondation que par un mode allogame. Dans le cas où l'autofécondation est effectivement possible et que les embryons obtenus sont viables, des individus homozygotes pourraient être obtenus. Ces individus seraient susceptibles de présenter des profils métaboliques particuliers et éventuellement intéressants dans l'étude des voies métaboliques conduisant aux furocoumarines. A l'opposé, une allogamie possible permettrait l'obtention d'hybrides susceptibles d'exprimer un effet hétérosis.

Même si *Ruta graveolens* est le meilleur candidat pour la production au champ de furocoumarines, les autres espèces peuvent être déterminantes dans un **schéma d'amélioration**. Par exemple, *Ruta chalepensis* contient le plus fort pourcentage en bergaptène (environ 65%) alors que *Ruta graveolens* en contient moins de 50%. Nous avons pu remarquer que la classification des espèces du genre Ruta est très flou et variable selon les sources. Un croisement entre *Ruta chalepensis* et *Ruta graveolens* pourrait être tout à fait viable, même si ce sont 2 espèces différentes. Ces deux espèces ont déjà une forte production de matière sèche par plante, comparées à *Ruta angustifolia* et *Ruta montana*. La descendance d'un croisement *R. graveolens* et *R. chalepensis* pourrait avoir des caractéristiques améliorées par rapport aux 2 parents : un plus fort pourcentage en bergaptène par rapport à *Ruta graveolens*, une meilleure résistance au froid par rapport à *Ruta chalepensis*.

2. LES CULTURES *IN VITRO*

Les suspensions cellulaires de *Ruta graveolens* produisent des furocoumarines, contrairement aux cultures de cellules indifférenciées de *Psoralea* (Bouque, 1997). Elles peuvent donc être un moyen de produire des furocoumarines. Nous avons montré que des suspensions cellulaires de morphologie et de teneur en furocoumarines variables peuvent être obtenues. Cette variabilité de base constitue une part de l'amélioration de la production de furocoumarines par des suspensions cellulaires de *Ruta graveolens*. En revanche, nous n'avons pas initié de suspensions cellulaires à partir des autres espèces du genre *Ruta*.

L'élicitation, même si elle semble être dépendante de la teneur initiale en furocoumarines, a déjà permis d'améliorer la production. D'autres facteurs restent à tester pour continuer dans cette voie. Les **principaux composants du milieu** doivent encore être optimisés : les **sucres** utilisés comme source d'énergie par les cellules (quantités et types de source carbonée), les **phytohormones** (types de phytohormones et doses), le dosage des **minéraux** dans le milieu de culture.

La production à grande échelle passera par la détermination du **système de bioréacteur** le plus adapté aux

suspensions cellulaires de Rue. Deux principaux types de bioréacteur existent : ceux dont le milieu est agité mécaniquement ou ceux dont le milieu est agité par de l'air (Payne *et al.*, 1991). Les différents types de bioréacteur vont déterminer des paramètres tels que le transfert d'oxygène disponible pour les cellules en culture, le coefficient de cisaillement ou encore l'homogénéisation du système. Il faut aussi déterminer un **mode opératoire**, c'est-à-dire la manière dont les nutriments vont être apportés aux cellules et les moyens de récupérer les produits de la culture.

Le mode opératoire va dépendre essentiellement des caractéristiques physiologiques des cellules, et notamment de la relation entre la production des furocoumarines au cours du temps et la croissance des cellules. Par exemple, si la production de métabolites a lieu en même temps que la croissance, alors il conviendra de choisir un mode opératoire qui permet la croissance sur une très longue période. En revanche, si la synthèse des produits a lieu dans la phase stationnaire, il faudra choisir un système qui permet d'atteindre rapidement cette phase. Dans notre cas, la production de furocoumarines est plutôt associée à la croissance des cellules de Rue, avec néanmoins un pic de production en fin de croissance exponentielle. Nous préconiserons plutôt d'étudier des systèmes du type **Batch** (tous les nutriments sont placés dans l'enceinte en début de culture), ou du type **Fed Batch** (les nutriments sont apportés régulièrement au cours de la croissance). Dans le cas où les métabolites produits peuvent être excrétés dans le milieu, le mode en **perfusion** convient particulièrement (le milieu circule en continu à travers les cellules puis est récupéré en sortie).

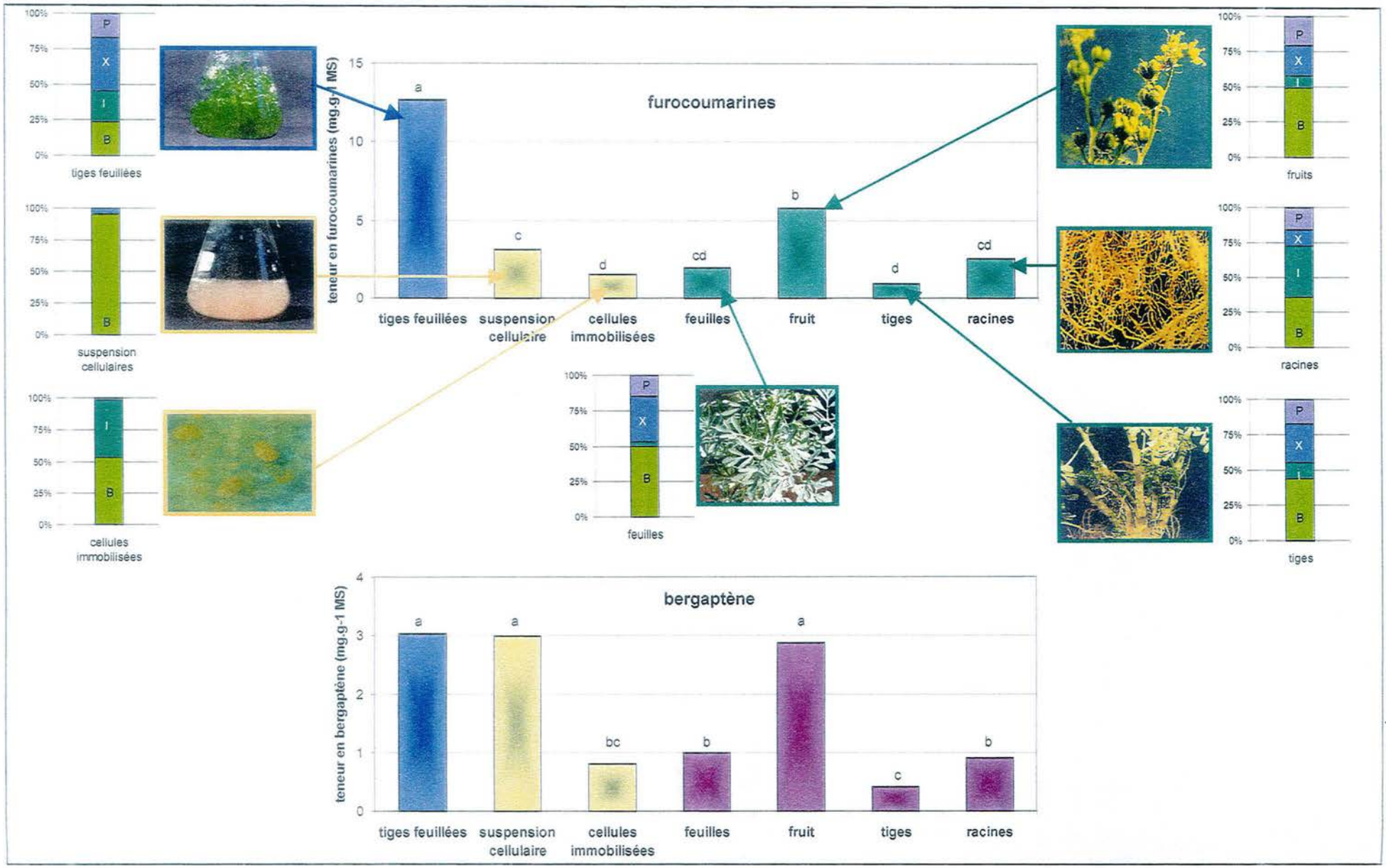
L'**excrétion des métabolites** dans le milieu peut être extrêmement avantageuse puisqu'elle ne nécessite pas le sacrifice des cellules pour récupérer les produits et elle permet d'abaisser le coût de l'extraction. De plus, la sortie des métabolites dans le milieu permettrait de limiter la rétroinhibition de la biosynthèse des métabolites d'intérêt ou une éventuelle dégradation des produits dans les cellules (Payne *et al.*, 1991). Nous avons montré que l'élicitation et l'immobilisation favorisaient le relargage des furocoumarines dans le milieu. D'autres techniques, telle que la perméabilisation des membranes des cellules par l'ajout de tensio-actifs (Boitel-Conti *et al.*, 1995), permettent de faire sortir les métabolites intracellulaires vers le milieu.

Les furocoumarines peuvent aussi être produites par tissus différenciés cultivés *in vitro* comme les tiges feuillées ou les racines. Des travaux sur la production de furocoumarines par des tiges feuillées de *Ruta graveolens* ont été menés au laboratoire. Ils ont montré que les tiges feuillées produisent globalement plus de furocoumarines linéaires que les suspensions cellulaires (Massot *et al.*, 2000). Cependant, les tiges feuillées produisent du bergaptène en plus faible proportion (**Figure D-1**, page suivante). Par conséquent, les suspensions cellulaires sont aussi intéressantes que les tiges feuillées pour la production de bergaptène, du point de vue de la teneur intracellulaire.

La culture de tiges feuillées en bioréacteur est surtout plus difficile à adapter que celle de suspensions cellulaires. En effet, les suspensions cellulaires, même si elles sont plus fragiles, peuvent bénéficier des bioréacteurs élaborés pour les cultures des bactéries. En revanche, les bioréacteurs utilisés pour les cultures de tiges feuillées doivent bénéficier de quelques modifications. Notamment, les tiges feuillées ne peuvent pas être cultivées dans des bioréacteurs à palles, car les tissus sont cisaillés. Les bioréacteurs à flux d'air sont plus appropriés. Les cultures de racines rencontrent le même problème (Tescione *et al.*, 1999). De plus, les tiges feuillées de Rue n'ont pu être élicitées alors que la production de furocoumarines par des suspensions cellulaires a pu être améliorée par l'élicitation et déplacée dans le compartiment extracellulaire.

Les suspensions cellulaires constituent un matériel de choix pour l'étude enzymatique des voies de biosynthèse des

Figure D-1 : Teneurs et profil des 4 furocoumarines linéaires dans diverses cultures *in vitro* et organes de plantes entières de *Ruta graveolens*.



furocoumarines. Elles possèdent moins de pigments et de tannins qui sont gênants pour l'isolement et la purification des enzymes. De plus, le profil des 4 furocoumarines dans les suspensions cellulaires est particulièrement intéressant pour l'étude des enzymes impliquées dans la synthèse du bergaptène et de la xanthotoxine. En effet, les suspensions cellulaires possèdent globalement 75 à 100% de bergaptène (**Figures D-1**, **C-19, C-25**). L'enzyme **psoralène 5-monooxygénase**, responsable de la biosynthèse de bergaptène (**Figure A-4**, p 12) a donc une forte activité, notamment en comparaison à la psoralène 8-monooxygénase, catalysant la réaction concurrente conduisant à la xanthotoxine. A partir de ces cellules de *Ruta graveolens* , il serait donc possible de purifier la **psoralène 5-monooxygénase** et d'obtenir sa séquence protéique. Cette dernière conduira à la construction d'amorces oligonucléotidiques qui serviront à l'amplification par PCR des séquences nucléotidiques codant pour l'enzyme (Meijer *et al.*, 1993) .

Nous avons montré que l'immobilisation des cellules de *Ruta graveolens* induit la production d'isopimpinelline (environ 50% de bergaptène et 50% d'isopimpinelline dans les cellules immobilisées, **Figure C-31**, p 97). Dans ce cas, il devrait être possible de purifier les enzymes spécifiques à la synthèse de l'isopimpinelline.

3. COMPARAISON DES 2 MODES DE PRODUCTION : CULTURES AU CHAMP/CULTURES *IN VITRO*

Nous avons présenté dans ce mémoire les études sur la production de furocoumarines par la Rue, et plus particulièrement par des plantes entières cultivées au champ et par des cellules indifférenciées cultivées *in vitro*. Nous avons montré que les deux types de culture produisent des furocoumarines et notamment du bergaptène. Quel est donc le procédé le plus intéressant pour produire des furocoumarines ?

Les fruits et les feuilles, organes exploités dans le cas de la culture de la plante entière, ont des teneurs en furocoumarines globalement plus élevées que les suspensions cellulaires (**Figure D-1**). Cependant, les suspensions cellulaires ont un pourcentage en bergaptène très fort. Ainsi, nous pouvons noter que les fruits des plantes entières et les suspensions cellulaires de *Ruta graveolens* ont des teneurs semblables en bergaptène. Mais les teneurs en furocoumarines ne suffisent pas à déterminer le meilleur procédé de culture.

Les plantes cultivées au champ sont soumises aux aléas climatiques, aux insectes, aux maladies et ne sont en général récoltées qu'une fois par an. Les cultures *in vitro* ont justement été étudiées pour permettre une production tout au long de l'année et limiter les pertes de production dues aux aléas climatiques puisqu'elles sont réalisées en conditions complètement contrôlées.

Cependant, les cultures *in vitro* induisent des coûts de production beaucoup plus élevés que les plantes entières : maintenance des bioréacteurs (nutriments, température, stérilisation...), locaux, main d'œuvre... Il faut considérer que la productivité (g de produit/g de cellules/jour) doit être 800 à 1000 fois supérieure pour que les cultures *in vitro* deviennent plus rentable que les cultures au champ pour produire des métabolites (Drapeau *et al.*, 1987 ; Payne *et al.*, 1991). Par exemple, la production de shikonine *in vitro* est compétitive lorsque sa productivité devient 870 fois plus élevée que celle des plantes cultivées au champ (Drapeau *et al.*, 1987). Pour la production d'ajmalicine, la productivité *in vitro* doit être 960 fois plus élevée (Drapeau *et al.*, 1987). Nous avons évalué la productivité en

furocoumarines par matière sèche et par jour, pour les Rues cultivées au champ et les suspensions cellulaires (**Tableau D-1**). La productivité des suspensions cellulaires est seulement 10-20 fois plus élevée que celle des plantes cultivées au champ. Même si des améliorations peuvent être apportées à la culture *in vitro* des cellules de *Ruta graveolens*, il sera difficile d'obtenir une productivité suffisante pour devenir rentable.

($mg.g^{-1}$ $MS.jour^{-1}$)	Cultures *in vitro*			Plantes entières			
	Tiges feuillées	Suspensions cellulaires	Cellules immobilisées	Fruits	Feuilles	Tiges	Racines
Bergaptène	0,140	0,140	0,040	0,010	0,007	0,003	0,005
4 furocoumarines	0,600	0,150	0,070	0,030	0,010	0,006	0,020

Tableau D- 1 : Productivité en furocoumarines, par unité de biomasse et unité de temps, de différents tissus cultivés *in vitro* et des organes de la plante

Même si les cultures cellulaires ne s'avèrent pas compétitives du point de vue du rendement en furocoumarines, elles constituent un matériel de choix pour l'étude des voies de biosynthèse. En effet, comme nous l'avons montré, les suspensions produisent un profil très particulier des 4 furocoumarines linéaires (**Figure D-1**). Ce profil varie au cours de la culture et du nombre de repiquages. Ainsi, nous avons pu déterminer des conditions qui conduisent à des cellules ne produisant pas de xanthotoxine. Ces tissus négatifs peuvent s'avérer extrêmement intéressants pour rechercher les séquences nucléotidiques codant pour les enzymes absentes (differential display, criblage differentiel).

Afin d'étudier les gènes codant les enzymes responsables de la production des furocoumarines, une **banque d'ADNc** a été récemment constituée à partir d'un tissu contenant à la fois de la xanthotoxine et du bergaptène : des feuilles de plantes entières (Deleury, 2000). L'étape suivante est le **criblage différentiel**, consistant à comparer sur des empreintes de la banque, l'hybridation de sondes nucléotidiques issues d'une part, du tissu contenant les deux furocoumarines (les feuilles) et d'autre part, des cellules cultivées dans les conditions ne conduisant pas à la synthèse de la xanthotoxine (les suspensions cellulaires). Afin de cibler les séquences qui sont comparées, les études se limiteront aux séquences de type P_{450}, sur les feuilles et sur les cellules indifférenciées (Mizutani *et al.*, 1998). En effet, les psoralène 5-et 8-monooxygénases, responsables de la formation du bergaptène et de la xanthotoxine, sont des enzymes cytochrome P_{450}-dépendantes (chapitre **A** paragraphe **1.1.3**, p 12).

Le clonage d'enzymes de la voie de biosynthèse des furocoumarines est nécessaire dans le cas où l'objectif des études est d'obtenir la production d'une furocoumarine particulière, grâce à des individus **génétiquement modifiés**. De tels individus permettraient aussi d'étudier les conséquences de l'introduction d'une telle construction. Les cellules indifférenciées sont un passage quasi obligé pour l'établissement de telles lignées génétiquement modifiées (pour l'introduction de transgène). De plus, dans le contexte actuel, la culture au champ de plantes génétiquement modifiées ne sera pas forcément autorisée. Dans ce cas, si le gain de productivité est suffisant, alors les furocoumarines pourraient être produites par des cellules transformées, cultivées en bioréacteur. Cependant, la modification des voies de biosynthèse des métabolites secondaires peut échouer, car il est difficile de connaître les procédés de régulation de l'expression des gènes après introduction du transgène, même si les constructions ont été flanquées de promoteurs forts. Comme nous l'avons déjà noté, ces constructions permettent aussi d'apporter un nouveau degré de compréhension de la biosynthèse de métabolites.

Outre les cultures *in vitro*, d'autres solutions pourraient être envisagées pour limiter d'éventuels problèmes climatiques et améliorer la régularité de la production. D'autres procédés de production, intermédiaires entre la culture au champ et la culture *in vitro*, peuvent être étudiés : cultures en serre, sur terre ou sur support inerte (vermiculite, laine de roche), cultures en aéroponie (pulvérisation de solution nutritive).

4. REFLEXION SUR LA DEMARCHE ENTREPRISE POUR ETUDIER LA PRODUCTION DE METABOLITES SECONDAIRES PAR DES VEGETAUX

Finalement, en ayant pour objectif principal d'étudier la production de furocoumarines par une plante, nous avons étudié cette production sous 2 angles.

D'une part, nous avons évalué les niveaux de productions en furocoumarines dans les différentes cultures en déterminant des variables telles que la teneur en furocoumarines, la production de matière sèche, la productivité en furocoumarines. Nous avons cherché les moyens d'améliorer ces niveaux de productions soit en recherchant des individus hautement producteurs (étude de la variabilité interspécifique et interécotype, caractérisation de souches cellulaires), soit en étudiant l'effet de facteurs environnementaux et culturaux.

D'autre part, nous avons recherché des profils particuliers de production des 4 furocoumarines afin de contribuer à l'étude des voies de biosynthèse. Les profils ont été déterminés : chez différentes espèces du genre *Ruta*, dans différents organes et tissus, et après l'action de traitements particuliers (comme l'élicitation ou l'immobilisation).

Nous avons montré dans la partie bibliographique que la xanthotoxine et le bergaptène sont utilisées dans la PUVA thérapie pour le traitement symptomatique de psoriasis graves et dans le traitement de lymphomes cutanés (chapitre **A**, paragraphe **1.2.3**, p 16). La ressource actuelle pour la production de ces furocoumarines est issue de la culture du bergamotier. Cette culture étant en déclin, le laboratoire avait été chargé d'étudier les Psoralées comme nouvelle source naturelle de furocoumarines. Ces plantes étant d'origine australienne, la culture en Europe posaient des problèmes (notamment pour atteindre une somme de température suffisante, Bourgaud, 1990). La Rue a été choisie comme nouveau modèle d'étude pour une bioproduction de furocoumarines.

Il n'est pas courant que les industries du secteur pharmaceutiques travaillent avec les laboratoires de recherche agronomique. En effet, la production des molécules pharmaceutiques est généralement réalisée par l'industrie chimique même si ces molécules ont souvent été découvertes dans les plantes. Peu d'exemples illustrent la bioproduction de molécules pharmaceutiques par des végétaux. Nous pouvons citer celui de la culture de l'œillette pour la production de morphine. Nous avons été confrontés au problème du faible nombre de publications contenant des résultats sur des études agronomiques de production de tels métabolites : le plus souvent, les résultats sont confidentiels. En revanche, un grand nombre d'études a été publié sur la production *in vitro* de métabolites secondaires, alors que ce procédé de production est souvent moins rentable, et sur l'étude des voies de biosynthèse. Ce dernier domaine présente encore de larges perspectives d'études : les composés du métabolisme secondaire des végétaux sont très nombreux et une faible proportion de voies métaboliques est étudiée.

Les furocoumarines sont déjà utilisées et semblent avoir de nouvelles applications, notamment dans le traitement

d'une maladie grave, la sclérose en plaques. Ces nouvelles perspectives seraient susceptibles d'augmenter la demande en furocoumarines et de relancer les études sur ces molécules. Cependant, ce sont les industries pharmaceutiques qui décident d'engager les essais cliniques et le développement de nouveaux médicaments. Si aucun budget n'est affecté à l'étude de nouvelles applications des furocoumarines, ces applications qui donneraient pourtant espoir aux malades n'en resteront qu'à l'état de promesses, car les essais engageraient des budgets trop coûteux.

Ainsi, l'application pharmaceutique des furocoumarines ne justifie que partiellement les recherches présentées dans ce mémoire. Ces résultats illustrent notre démarche mise en oeuvre pour étudier la production de métabolites secondaires d'intérêt par des végétaux. Ils montrent le savoir-faire et les connaissances multidisciplinaires que nous avons acquises et qui pourront être appliqués à d'autres métabolites sur d'autres plantes. Ces disciplines sont l'agronomie, les cultures *in vitro* ou la phytochimie (extraction, séparation et dosage des molécules). Enfin, le laboratoire engage aujourd'hui une quatrième discipline, la génétique moléculaire, pour étudier les voies de biosynthèse et les modifier.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'objectif des travaux présentés dans ce mémoire était de déterminer si la culture de Rue officinale pouvait être une bonne solution pour la production de furocoumarines. Nous avons démontré qu'il est intéressant d'exploiter cette plante dans ce but. Plusieurs raisons nous amènent à cette conclusion. D'abord, la Rue est naturellement présente en Europe et en France : la mise en place de la culture en est donc extrêmement facilitée. Ensuite, les espèces du genre *Ruta* ont des teneurs en furocoumarines entre 4 et 17 $mg.g^{-1}$ MS dans les feuilles. Ces teneurs sont supérieures à la plupart des autres familles produisant des furocoumarines. Parmi les 4 espèces de Rue étudiées ici, nous avons retenu la Rue officinale (*Ruta graveolens*). Cette espèce a montré qu'elle était la mieux adaptée aux conditions climatiques de l'Est de la France dans lesquelles nous avons réalisé les essais. De plus, ces plantes ont un port buissonnant et donc une croissance rapide en comparaison d'espèces arborescentes telles que le bergamotier, déjà utilisé pour l'extraction des furocoumarines.

Nous avons en outre montré que, chez *Ruta graveolens*, les furocoumarines sont situées en majorité dans les fruits et les feuilles (environ 60% de la quantité totale produite dans la plante). Il n'est donc pas nécessaire de détruire la culture pour extraire une majorité de furocoumarines, d'autant que la plante est pérenne et peut donc être cultivée plusieurs années une fois qu'elle a été implantée. Dans le compartiment contenant les fruits et les feuilles, une teneur-moyenne de 5 $mg.g^{-1}$ MS de furocoumarines peut être attendue après la deuxième année de culture au champ. Le bergaptène, furocoumarine la plus intéressante sur le plan pharmaceutique, en représente 50%. Nous avons estimé que la récolte de ce compartiment lors de la deuxième année permet de récupérer entre 10 et 50 kg de furocoumarines par hectare. Ce rendement varie suivant le site de culture considéré à cause d'un effet terroir sur la production.

Nous avons montré que la production de furocoumarines par des plantes cultivées au champ peut être améliorée. D'une part, nous avons montré qu'il était nécessaire de sélectionner le meilleur matériel végétal : la meilleure espèce, et les meilleurs individus parmi un écotype de la meilleure espèce. D'autre part, l'obtention d'un rendement maximum passe par la recherche du meilleur itinéraire technique. La densité de peuplement, la stratégie de récolte (stade de récolte et fréquence de coupe) ou la fertilisation azotée sont des composantes de l'itinéraire technique. Nous en avons étudié les effets sur la production de furocoumarines.

D'abord, nous avons déterminé le stade phénologique définissant la date optimale de récolte : le stade fructification, correspondant à une récolte en été, permet l'obtention de la meilleure production (7 fois plus qu'au stade végétatif et 2 fois plus qu'après la chute des fruits). Ensuite, il apparaît que la densité n'a pas d'effet sur le rendement par hectare, même si les plantes de la plus faible densité ont une meilleure production par pied. Enfin, l'étude du facteur coupe, qui avait pour objectif de mettre la plante en situation de récolte annuelle, a permis d'obtenir les résultats suivants :

- les plantes coupées ont une plus forte productivité que les plantes non coupées,
- le rendement et la productivité augmentent lorsque les plantes vieillissent.

Ces résultats ont aussi démontré que la Rue pouvait être exploitée dès la première année. Ainsi, les plantes de Rue officinale fauchées chaque année se sont enrichies en furocoumarines pendant les 3 années d'observation. Ces

résultats sont très encourageant pour la mise en place de cultures de Rue officinale pour la bio-production de furocoumarines.

Les cultures *in vitro* de Rue ne sont pas aussi intéressantes dans le cadre d'une production à grande échelle. Comparées à la production au champ, les cultures *in vitro* ne sont pas rentables à cause de leur coût de production, même si la productivité annuelle de furocoumarines par gramme de biomasse est à peu près 10 fois plus élevée. Les essais de traitements tels que l'élicitation et l'immobilisation n'ont pas permis d'obtenir des gains de production suffisamment élevés pour atteindre une bonne rentabilité économique.

Afin de poursuivre les travaux sur ce sujet de recherche, nous proposerons des pistes dans 3 domaines : agronomique, biotechnologique et biomoléculaire.

Les **études agronomiques** pourraient se poursuivre par l'étude de nouveaux facteurs. Etant donné que nous avons mis en évidence l'effet déterminant du terroir dans la formation du rendement en furocoumarines, il conviendrait de déterminer les rôles respectifs de facteurs comme l'eau (irrigation, pluviométrie), les éléments minéraux (carences et apports), la texture et la structure du sol, la température... L'étude du rendement obtenu au champ devra être accompagnée par une optimisation du procédé d'extraction et de purification à grande échelle des furocoumarines. Ce procédé devra être adapté à partir de celui de l'huile de bergamotier qui est déjà pratiqué. Enfin, des interrogations persistent sur la localisation de la biosynthèse des furocoumarines dans la plante entière et pourraient faire l'objet d'études plus approfondies.

Les **études biotechnologiques** pourraient être poursuivies non pas dans une optique de production à grande échelle, mais comme matériel pour l'étude et la compréhension de la biosynthèse des furocoumarines. Le but serait de déterminer les facteurs pour lesquels nous observerions un défaut de synthèse d'une des furocoumarines. Parmi ces facteurs, nous pouvons citer l'élicitation biotique (en essayant d'autres agents), l'élicitation abiotique (par UV, métaux lourds, sels), l'élicitation biochimique (par adjonction de méthyl jasmonate); l'immobilisation, l'adjonction de précurseurs métaboliques, l'absence ou au contraire l'addition d'hormones végétales... Les effets de ces facteurs sur le profil des 4 furocoumarines et sur les activités enzymatiques devront être finement observés.

Enfin, les **études biomoléculaires** constituent l'ouverture majeure vers la compréhension de la biosynthèse des furocoumarines. La première étape sera le séquençage des gènes codant pour les enzymes clefs du métabolisme des furocoumarines (grâce au criblage différentiel par exemple). Ensuite, il s'agira d'étudier des plantes modifiées pour ces gènes, soit dans le but de diriger la production vers un profil particulier, soit dans le but d'étudier les conséquences de l'insertion de ces gènes sur les voies métaboliques proches. Des racines de Rue transformées par *Agrobacterium rhizogenes* ont déjà pu être obtenues au laboratoire. Ceci permet de penser que la Rue peut être transformée par une bactérie vecteur d'un gène d'intérêt pour favoriser le métabolisme secondaire des furocoumarines. La Rue pourrait alors devenir un modèle d'étude de la transformation génétique pour une voie du métabolisme secondaire des végétaux. Nous pouvons signaler que la C4H, enzyme située quelques étapes avant la formation des furocoumarines a déjà été séquencée chez la Rue dans notre laboratoire. Dans un avenir proche, des constructions génétiques pourront être réalisées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abu-Mustafa EA, El-Bay FKA, Fayez MBE. 1970.** The distribution of coumarins in the *Ammi majus* L. plant and a possible pattern for their biogenetic evolution. *Natural coumarins XI*: 90-97.

2. **Abu-Mustafa EA, El-Tawil AH, Fayez MBE. 1964.** Constituents of local plants-IV. *Phytochemistry* **3**: 701-703.

3. **Ahmad VU, Basha A. 1972.** Isolation of psoralene and angelicin from *Psoralea plicata* del. *Pak J Sci Ind Res* **5**(3): 158-159.

4. **Albersheim P, Darvill AG, McNeil M, Valent B, Shorp JK, Nothnagel EA, Davis KR, Yamaza N, Gollin D, York WS, Dudman F, Darvill JE. 1983.** Oligosaccharins: naturally occuring carbohydrates with biological regulatory functions. **Dans**: Ciferi O (ed) *Structure and functions of plant genomen.* New York Plenum Pub Corp: 293-312.

5. **Alfermann A, Spieler H, Reinhard E. 1985.** Biotransformation of cardiac glycosides by *Digitalis* cell cultures in airlift reactors. **Dans**: Neumann KH, Barz W, Reinhard E (eds), *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures*, Berlin, Springer: 316-322.

6. **Aliotta G, Cafiero G, De Feo V, Sacchi R. 1994.** Potential allelochemicals from *Ruta graveolens* L. and their action on radish seeds. *Journal of Chemical Ecology* **20**: 2761-2775.

7. **Anwar M, Patra DD, Mukhopadhyay AK, Singh DV. 1993.** Relationship of manganese with iron and zinc with respect to latex yiels and composition in opium poppy (*Papaver somniferum* Linn) under two fertility conditions. *Fertilizer Research* **34**(1):55-58.

8. **Armstrong GM, Rohrbaugh LM, Rice EL, Wender SH. 1971.** Preliminary studies on the effect of deficiency in potassium or magnesium on concentration of chlorogenic acid and scopolin in tobacco. *Proc Okla Acad* **51**: 41-43.

9. **Bailey JA Rowell PM, Arnold GM. 1980.** The temporal relationship between host cell death, phytoalexin accumulation and fungal inhibition during hypersensitive reactions of *Phaseolus vulgaris* to *Collectrotrichum lindemuthiatum. Plant Pathology* **17**: 329-339.

10. **Bajaj YPS. 1998.** *Biotechnology in agriculture and forestry 41. Medicinal and aromatic plants X:* 460 p.

11. **Baskin JM, Ludlow CJ, Harris TM, Wolf FT. 1967.** Psoralen, an inhibitor in the seeds of Psoralea subacaulis(Leguminosae). *Phytochemistry* **6**: 1209-1213.

12. **Baskin JM, Ludlow CJ, Harris TM, Wolf FT. 1967a.** Psoralen, an inhibitor in the seeds of Psoralea subacaulis (Leguminosae). *Phytochemistry* **6**: 1209-1213.

13. **Baskin JM, Murrell JT, Wolf FT. 1967b.** Psoralen in the seeds of *Psoralea psoralioides* (Leguminosae). *Phyton (Buenos Aires)* **24**(2): 85-86.

14. **Bate NJ, Orr J, Ni W, Meromi A, Nadler-Hassar T, Doerner PW, Dixon RA, Lamb CJ, Elkind Y. 1994.**

Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoidaccumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**(16): 7608-7612.

15. **Beier RC, Ivie GW, Oertli EH. 1994.** Linear furanocoumarins and graveolone from the common herb parsley. *Phytochemistry* **36**(4): 869-872.

16. **Bennet EL, Bonner J. 1953.** Isolation of plant growth inhibitors from *Thamnosma montana*. *Amer J Botany* **40**: 29.

17. **Berenbaum MR, Zangerl AR, Nitao JK. 1986.** Constraints on chemical coevolution: wild parsnips and the parsnip webworm. *Evolution* **40**(6): 1215-1228.

18. **Berenbaum MR, Nitao JK, Zangerl AR. 1991.** Adaptative significance of furocoumarin diversity in Pastinaca sativa(Apiaceae). *Journal of Chemical Ecology* **17**(1): 207-215.

19. **Berenbaum Mr, Zangerl AR, Nitao JK. 1984.** Furanocoumarins in seeds of wild and cultivated parnisp. *Phytochemistry* **23**(8): 1809-1810.

20. **Berenbaum MR, Zangerl AR. 1986.** Variation in seed furocoumarin content within the wild parsnip (*Pastinaca sativa*). *Phytochemistry* **25**(3): 659-661.

21. **Berenbaum MR, Zangerl AR. 1993.** Furanocoumarin metabolism in *Papilio polyxenes*: biochemistry, genetic variability, and ecological significance. *Oecologia* **95**:370-375.

22. **Berg M, Ros AM. 1993.** Treatment of psoriasis with psoralens and UVA. A double-blind comparison of 8-MOP and 5-MOP. *Life Sci* **53** (22): 355-358.

23. **Bickers DR. 1987.** Photobiology 1937-1987. *J Invest Dermatol* **92**(4): 25S-31S.

24. **Blechert S, Brodshelm W, Holder S, Kammerer L, Kutchan TM, Mueller J, Xia ZQ, Zenk MH. 1995.** The octadecanoid pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4099-4105.

25. **Bloch F, Habsen WW, Packard M. 1946.** *Phys Rev* **69**: 127.

26. **Blom TJM, Kreis W, van Iren F, Libbenga FR. 1992.** A non-invasive method for the routine-estimation of fresh weight of cells grown in batch suspension cultures. *Plant Cell Reports* **11**: 146-149.

27. **Bohlmann J, Eilert U. 1994.** Elicitor induction secondary metabolism in *Ruta graveolens* L. Role of chorismate utilizing enzymes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **38**: 189-198.

28. **Bohlmann J, Gibraltarskaya E, Eilert U. 1995.** Elicitor induction of furanocoumarin biosynthetic pathway in cell cultures of *Ruta graveolens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **45**: 155-161.

29. **Bohuslavizki KH., Hansel W, Kneip A, Koppenhofer E, Niemoller E, Sanmann K. 1994.** Mode of action of psoralens, benzofurans, acridinons, and coumarins on the ionic currents in intact myelinated nerve fibres and its significance in demyelinating diseases. *Gen Physiol Biophys* **13**: 309-328.

30. **Boitel-Conti M, Gontier E, Laberche JC, Ducrocq C, Sangwan-Norreel BS. 1995.** Inducer effect of Tween 20 permeabilization treatment used for release of stored tropane alkaloids in *Datura innoxia* Mill hairy root cultures. *Plant Cell reports* **16**: 241-244.

31. **Bordin F, Marciani S, Baccichetti FR, Dall'Acqua F, Rodighiero F. 1975.** Studies on the photosensitizing properties of angelicin, an angular furocoumarin forming only monofunctional adducts with the pyrimidine bases of DNA. *Ital J Biochem* **24**(5): 258-67.

32. **Bouque V. 1997.** Etude de la production de métabolites secondaires par des cultures *in vitro* de Psoralées (Leguminosae). *Thèse de doctorat de l'INPL*: 194 p.

33. **Bourgaud F, Allard N, Forlot P, Guckert A. 1990.** Study of two pharmaceutically useful Psoralea species (Leguminosae): influence of inoculation on growth, grain and dry matter yield. *Agronomie* **10**: 1-8.

34. **Bourgaud F, Allard N, Guckert A, Forlot P. 1989.** Natural sources for furocoumarins. **Dans**: Fitzpatrick TB, Forlot P, Pathak MA, Urbach FJ (ed), *Psoralens, Past, Present and Future of Chemoprotection and other Biological Activities.* Libbey Eurotext, Paris, France: 301-326.

35. **Bourgaud F, Brunel MC, Guckert A, Forlot P. 1992.** Effect of nitrogen and environmental conditions on the production of pharmaceutically useful metabolites by Psoralea cinerea. *European Journal of Agronomy* **1**(1): 37-43.

36. **Bourgaud F, Grimal JY, Nguyen C, Bitton G, Guckert A. 1994a.** A selective photobiological assay to detect and quantify psoralen in Psoralea plants (Leguminosae). *Phytochem Analysis* **5**: 315-318.

37. **Bourgaud F, Nguyen C, Guckert A. 1995.** Psoralea species: *in vitro* culture and production of furocoumarins and other secondary metabolites. **Dans**: Bajaj YPS (ed), *Medicinal and aromatic plant* vol. **8**. Springer Verlag, Berlin: 388-411.

38. **Bourgaud F, Poutaraud A, Guckert A. 1994b.** Extraction of coumarins from plant material (Leguminosae). *Phytochemical Analysis* **5**: 127-132.

39. **Bourgaud F. 1990.** Etude de la biologie de plantes du genre Psoralea (Légumineuse) productrice de furocoumarines à intérêt pharmaceutique. Essais de cultures *in vitro*. *Thèse de doctorat de l'INPL*.

40. **Brattsten LB. 1992.** Metabolic defenses against plant allelochemicals. **Dans**: Rosenthal GA, Berenbaum MR (eds), *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites.* Academic Press, NY: 175-242.

41. **Brown SA, El-Dakhakhny M, Steck W. 1970.** Biosynthesis of linear furanocoumarins. *Canadian Journal of Biochemistry* **48**(8): 863-871.

42. **Brown SA, Sampathkumar S. 1977.** The biosynthesis of isopimpinellin. *Canadian Journal of Biochemistry* **55**: 686-692.

43. **Brown SA, Steck W. 1973.** 7-demethylsuberosin and osthenol as intermediates in furanocoumarin biosynthesis. *Phytochemistry* **12**: 1315-1324.

44. **Brown SA, Zobel AM. 1990.** Biosynthesis and distribution of coumarines in the plant. *Atti del convegno*

Cumarine : ricerca ed applicazione, Padova, 20-22 settembre 1990: 15-37.

45. **Brown SA. 1979.** Biosynthetic studies on coumarins. *Planta Medica* **4**(36): 299-310.

46. **Brugidou C, Jacques M. 1990.** Influence des conditions de l'environnement sur la production de digoxine par Digitalis lanata. *Comptes-Rendus de l'Académie d'Agriculture de France* **76**(3): 103-112.

47. **Bryant JP , Chapin FS, Klein DR. 1983.** *Oikos* **40**: 357-368.

48. **Cadet J, Vigny P, Midden WR. 1990.** Photoreactions of furocoumarins with biomolecules. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* **6**: 197-206.

49. **Cappelletti EM, Innocenti G, Caporale G. 1984.** Furocoumarins localization in the fruit and seed of Psoralea corylifolia L.. *Plantes médicinales et phytothérapie* 18 3: 181-190.

50. **Cappelletti EM, Innocenti G, Caporale G. 1992.** Possible ecological significance of within-fruit and seed furocoumarin distribution in two Psoralea species. *Journal of Chemical Ecology* **18**(2): 155-164.

51. **Carbonnier J, Molho D. 1982.** Contribution à l'étude des furocoumarines du genre *Angelica*. Distribution du beta-cyclolavandulil oxy-5proralène. *Planta Medica* **44**(3) : 162-165.

52. **Carbonnier-Jarreau MC, Carbonnier J, Cauwet-Marc AM, Mohlo D. 1978.** Localisation des coumarines chez quelques espèces d'*Heracleum* L.. *Bull Mus Nat Hist Nat* **522**: 23-28.

53. **Carrier DJ, Coulombe P, Mancini M, Neufeld R, Weber M, Archambault J. 1990.** Immobilized *Ginkgo biloba* cell cultures. **Dans**: Nijkamp HJJ, van der Plas LHW, van Aartrijk J (eds), *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Dordrecht / Kluver: 614-618.

54. **Ceska O, Chaudhary SK, Warrington PJ, Ashwood-Smith MJ. 1987.** Photoactive furocoumarins in fruits of some umbellifers. *Phytochemistry* 26(1): 165-169.

55. **Ceska O, Chaudhary SK, Warrington PJ, Ashwood-Smith MT. 1986.** Furocoumarins in the cultivated carrot, *Daucus carota*. *Phytochemistry* **25**(1): 81-83.

56. **Chaudhary SK, Ceska O, Tetu C, Warrington PJ, Ashwood-Smith MJ, Poulton GA. 1986.** Oxypeucedanin, a major furocoumarin in Parsley, *Petroselium crispum*. *Planta Medica* **6**: 462-464.

57. **Choudhury S, Gupta K. 1996.** Effect of CCC on growth and alkaloid production in Catharanthus roseus (L.) G. Don. *Indian Journal of Plant Physiology* **1**(3): 163-167.

58. **Chung B. 1990.** Effects of plant popumlation density and rectangularity on the growth and yield f poppies (Papaver somniferum). *Journal of Agricultural Science* **115**(2):239-245.

59. **Clergeot PH. 1994.** Répartition en métabolites secondaires chez *Psoralea cinerea* (*Leguminosae*) au cours de sa croissance : phénomènes de translocation. *DAA de l'ENSAIA*: 30p.

60. **Coley PD, Bryant JP, Chapin FS. 1985.** *Science* **230**: 895-899.

61. **Creelman RA, Mullet JE. 1995.** Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development

and in response to biotic and abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4114-4119.

62. **Creelman RA, Tierney ML, Mullet JE. 1992.** Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soy bean hypocotyls and modulate wound gene expression. *PNAS* **89**: 4938-4941.

63. **Dachler M. 1990.** Varieties and nitrogen requirements of some medicinal and spice plants grown for seed (*Papaver somniferum* L., *Linum usitatissimum* L., *Carum carvi* L. and *Sinapis alba* L.). *Herba Hungarica* **29**(3): 41-50.

64. **Dall'Acqua F, Capozzi A, Marciani S, Caporale G. 1972.** Biosynthesis of furocoumarins: further studies on *Ruta graveolens*. *Zeitschrift Naturforschrung Teilb* **27b**: 813-817.

65. **Dall'Acqua F, Innocenti G, Caporale G, Rodighiero P, Guiotto A. 1979.** *Zeitschrift Naturforschring Teilb* **34c**: 1278.

66. **Dall'Acqua F, Innocenti G, Caporale G. 1975.** Biosynthesis of o-alkyl-furocoumarins. *Planta Medica* **27**(4): 343-348.

67. **Dall'Acqua F, Marciani S, Marciano G. 1970.** Interstrand cross-linkages occuring in the photoreaction between psoralen and DNA. *FEBS Lett* **9**: 121-123.

68. **Dall'Acqua F, Martelli P. 1991.** Photosensitizing action of furanocoumarins on membrane components and consequent intracellular events. *J Photochem Photobiol:* 235-254.

69. **Damadian R. 1971.** Tumor detection by nuclear magnetic resonance. *Science* **171**: 1151.

70. **Darvill AG, Albersheim P. 1984.** Phytoalexins and their elicitors. Adefence against microbial infection in plants. *Ann Rev Plant Physiol.* **35**: 243-276.

71. **De Feo V, Senatore F. 1993.** Medicinal plants and phytotherapy in the Amalfitan Coast, Salerno Province, Campania, Southern Italy. *Journal of Ethnopharmcology* **39**: 39-51.

72. **Del Moral R. 1972.** On the variability of chlorogenic acid concentration. *Oecologia* **9**: 289-300.

73. **Deleury E. 2000.** Clonage et séquençage de l'ADNc partiel de la cinnamate 4-hydroxylase et construction d'une banque d'ADNc de feuilles de *Ruta graveolens*. *Mémoire de DEA de l'INPL et mémoire de DAA de l'ENSAIA*: 29p.

74. **Dhillon DS, Brown SA. 1976.** Localization, purification and characterization of dimethylallyl-pyrophosphate:umbelliferone dimethylallyltransferase from *Ruta graveolens*. *Arch Bichem Biophys* **177**: 74-83.

75. **Diawara MM, Trumble JT, Quiros CF, MillarJG. 1992.** Resistance to *Spodoptera exigua* in *Apium prostratum*. *Entomol Exp Appl* **64**: 125-133.

76. **Dittrich H, Kutchan TM, Zenk MH. 1992.** The jasmonate precursor, 12-oxo-phytodienoic acid, induces phytoalexin synthesis in Petroselium crispum cell cultures. *FEBS Lett* **309**: 33-36.

77. **Dixon RA, Howles PJ, Lamb C, Korth K, He, XZ, Sewalt VJH, Rasmussen S. 1999.** Plant secondary metabolism: control points and prospects for genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis. **Dans**: Fu TJ,

Singh G, Curtis WR (eds), *Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredients*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York: 7-22.

78. **Dixon RA, Paiva NL. 1995.** Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**: 1085-1097.

79. **Dixon RA. 1986.** The phytoalexin response: elicitation, signaling, and control of host gene expression. *Biol Rev.* **61**: 239-291.

80. **Dornenburg H, Knorr D. 1995.** Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology* **17**: 674-684.

81. **Drapeau D, Blanch HW, Wlike CR. 1987.** Economic assessment of plant cell culture for the production of ajmalicine. *Biotechnol Bioeng* **30**: 946-953.

82. **Ebel J. 1986.** Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. *Ann Rev Pythopathol.* **25**: 235-264.

83. **Edelson R. 1988.** Les médicaments photoactivés. *Pour la Science* **132**: 64-72.

84. **Eilert U, DeLuca V, Kurz WGW, Constabel F. 1987.** Alkaloid formation by habituated and tumorous cell suspension cultures of Catharanthus roseus. *Plant Cell Rep* **6**: 271-274.

85. **Eilert U. 1989.** Elicitor induction of secondary metabolism in dedifferenciated and differenciated *in vitro* systems of *Ruta graveolens*. **Dans**: Kurz WGW (ed), *Primary and secondary metabolism of Plant Cell Cultures II.* Springer-Verlag, Berlin: 219-228.

86. **El Mofty AM. 1947.** A primary clinical report on the treatment of leukoderma with 9 *Ammi majus* linn. *J Roy Egypt Med Ass* **31**: 651-655.

87. **Elkind Y, Edwards R, Mavandad M, Hedrick SA, Ribak O, Dixon RA, Lamb CJ. 1990.** Abnormal plant development and down regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9057-9061.

88. **Ellard-Ivey M, Douglas CJ. 1996.** Role of jasmonates in the elicitor- and wound-inducible expression of defense genes in parsley and transgenic tobacco. *Plant Physiol* **112**: 183-192.

89. **Ena P, Cerri R, Dessi G, Manconi PM, Atzei AD. 1991.** Photoxicity due to *Cachrys libanotis*. *Contact Dermatisis* **24**: 1-5.

90. **Facchini PJ, Johnson AG, Bird DA. 1997.** Regulation of alkaloid biosynthesis in *Opium* poppy and related species: prospects for pathway engineering. *AgBiotech News and Information* **9**(6): 131N-138N.

91. **Fahrendorf T, Dixon RA. 1993.** Molecular cloning stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). Molecular and expression of the elicitor-inducible cinnamic 4-hydroxylase cytochrome P450. *Arch Biochem Biophys* **6**: 351-509.

92. **Fakuda H, Stao Y, Yoshimura T, Demura T. 1993.** Molecular mechanisms of xylem differentiation. *Journal of Plant Research* **3**: 97-107.

93. **Fang Y, Smith MAL, Pepin MF. 1999.** Effects of exogeneous méthyljasmonate in elicited anthocyanin-producing cell cultures of ohelo (*Vaccinium pahalae*). *In vitro Cell Dev Biol Plant* **35**: 106-113.

94. **Farmer EE. 1994.** Fatty acid signaling in plants and their associated microorganisms. *Plant Mol. Biol.* **26**: 1423-1438.

95. **Fedorin GF, Georgievskii VP, Komissarenko NF, Beletskii Yu N. 1975.** Comparative content of psoralen and other furocoumarins in raw materials from Coronilla scorpioïdes, Psoralea drupacea and Ficus carica. *Chemical Abstract* **83**, n°128701k.

96. **Feeny PP. 1976.** *Recent Advances in Phytochemistry* **10**: 1-40.

97. **Fernandez-Bolanos J, Heredia A. 1993.** Review: Plant cell wall fragments as elicitors. *Revista Espanola de Cience y Tacnologia de Alimentos* **33**(6): 577-596.

98. **Fitzpatrick T, Pathak MA. 1959.** Historical aspects of méthoxsalène and others furocoumarins. *J Invest Dermatol* **32**(II): 229-231.

99. **Floss HG, Paikert H. 1969.** Biosynthesis of furanocoumarins in *Pimpinella magna* (Umbelliferae). *Phytochemistry* **8**: 589-596.

100. **Fowlks *et al.*, 1958** dans **Fowlks WL. 1959.** The chemistry of psoralens. *J Invest Dermatol* **32**(2): 249-254.

101. **Fritsch PO, Honigsmann H, Jaschke E. 1978.** Augmentation of oral methosalen-photochemotherapy with oral retinoic acid derivative. *J Invest Dermatol* **70**: 178-182.

102. **Fujita Y, Tabata M. 1987.** Secondary metabolites from cells: pharmaceutical application and progress in commercial production. **Dans**: Green CE *et al.* (eds), Plant *Tissue and Cell Culture, Plant Biology, vol 3.* New York / AR Liss Inc: 169-185.

103. **Funk C, Brodelius P. 1990.** Influence of growth regulators and an elicitor on phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia*. *Phytochemistry* **29**(3): 845-848.

104. **Gamborg OL, Muller RA, Ojima V. 1968.** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* **50**: 151-158.

105. **Gautheret RJ. 1939.** Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. *C R Hebd Séances Acad Sci* **208**: 118-121.

106. **George J, Bais HP, Ravishankar GA. 2000.** Biotechnological production of plant-based insecticides. *Crit Rev Biotechnol* **20**(1): 49-77.

107. **Giles A, Wamer W, Kornhauser A. 1985.** *In vivo* protective effect of B-carotene against psoralen phototoxicity. *Photochemistry and photobiology* **41**(6): 661-666.

108. **Gontier E. 1993.** Etude de la production d'alcaloïdes tropaniques chez le *Datura inoxia* Mill. cultivé *in vitro*: impact physiologique d'une matrice d'alginate de calcium. *Thèse de doctorat de l'Université de Picardie Jules Verne.* 165 p.

109. **Grossweiner LI. 1984.** Mechanisms of photosensitization by furocoumarins. *Natl Cancer Inst Monogr* **66**: 47-54.

110. **Gundlach H, Mueller MJ, Kutchan TM, Zenk MH. 1992.** Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2389-2393.

111. **Gustine DL, Sherwood RT, Lukezic FL, Moyer BG, Devlin WS. 1994.** Metabolites of Pseudomonas corrugata that elicit plant defense reactions. **Dans**: Hedin PA (ed), *Bioregulators for Crop Protection ad Pest Control.* American Chemical Society: 169-181.

112. **Haberlandt G. 1902.** Culturvesuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Akad Wiss Wien Math Naturwiss KL Abt* **3**: 69.

113. **Hahlbrock K, Scheel D. 1989.** Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* **40**: 347-369.

114. **Hamerski D, Matern U. 1986.** Psoralens 5-monooxygenase activity from elicitor-treated Ammi majus cells. *FEBS* **239**(2): 263-265.

115. **Hamerski D, Matern U. 1988a.** Biosynthesis of psoralens. Psoralen 5-monooxygénase activity from elicitor-treated Ammi majus cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **239**(2): 263-265.

116. **Hamerski D, Matern U. 1988b.** Elicitor-induced biosynthesis of psoralens in Ammi majus L. suspension cultures. Microsomal conversion of demethylsuberosin in (+)marmesin and psoralen. *European Journal of Biochemistry* **171**:369.

117. **Harber LC, Baer LC. 1972.** Pathogenic mechanisms of drug induced photosensitivity. *J Invest Dermatol* **58**: 327-342.

118. **Heller R. 1953.** Recherche sur la nutrition minérale de tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann Sci Natl Biol Veg* 14: 1-223.

119. **Howles PA, Paiva NL, Sewalt VJH, Elkind NL, Bate Y, Lamb CJ, Dixon RA. 1996.** Overexpression of L-phenylalanine ammonia-lyase in transgenic tobacco plants reveals control points for flux into phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiol* **112**: 1617-1624.

120. **Innocenti G, Cappelletti EM, Caporale G. 1984.** Morphological and chemical characteristics of some australian *Psoralea* species. *International Journal of Crude Drug Res* 3: 97-109.

121. **Innocenti G, Cappelletti EM, Caporale G. 1991.** Furocoumarin contents in the vegetative organs of cultivated *Psoralea* species. *Int J Pharmacignosy* **29**(4): 311-316.

122. **Innocenti G, Dall'Acqua F, Caporale G. 1976.** Investigations of the content of furocoumarins in Apium graveolens and in Petroselium sativum. *Planta Medica* **29**(2): 165-170.

123. **Innocenti G, Dall'Acqua F, Guiotto A, Caporale G. 1977.** Investigations on the role of 7-demethylsuberosin in the biosynthesis of linear furocoumarins. *Atti Dell'Instituto Veneto Di Scienze. Letters ed Arti.*

124. **Innocenti G, Dall'Acqua F, Rodighiero P, Caporale G. 1978.** Biosynthesis of o-alkylfurocoumarins in Angelica

archangelica. *Planta medica* **34**: 167-171.

125. **Innocenti G, Dall'Acqua F, Caporale G. 1983.** The role of 5,8-Dihydroxypsoralen in the biosynthesis of isopimpinellin. *Phytochemistry* **22**(10): 2207-2209.

126. **Innocenti G, Dall'Acqua F, Guitto A, Rodighiero P, Caporale G. 1981.** The role of hydroxymarmesins in the biogenesis of o-alkylfurocoumarins. *Il Farmaco, Edizione scientifica* **36**(7): 615-621.

127. **Ishihara A, Miyagawa H, Kuwahara Y, Ueno T, Mayama S. 1996.** Involvement of Ca^{2+} ion in phytoalexin induction in oats. *Plant Science* **115**: 9-16.

128. **Ishikawa M, Price WS, Ide H, Arata Y. 1997.** Visualization of freezing behaviors in leaf and flower of full-moon by nuclear magnetic resonance microscopy. *Plant physiology* **115**: 1515-1524.

129. **Ivie GW, Beier RC. 1996.** Isopimpinellin is not phototoxic in a chick skin assay. *Photochem Photobiol* **63**(3): 306-307.

130. **Ivie, 1978** dans **Ivie GW. 1982.** Chemical and biochemical aspects of photosensitization in livestock and poultry. *J Natl Cancer Inst* **69**(1): 259-262.

131. **Jackson JA, Lyndon RF. 1990.** Habituation: relationship between alternative pathways, regulation and subcellular location. *Recent Adv Phytochem* **20**: 57-81.

132. **Jaeck E, Martz F, Stiefel V, Fritig B, Legrand M. 1996.** Expression of class I O-methyltransferase in healthy and TMV-infected tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* **9**(8): 681-688.

133. **Junttila O. 1976.** Allelopathic inhibitors in sedds of Heracleum laciniatum. *Physiol Plant* **36**: 374-378.

134. **Kahar LS, Nigram KB. 1990.** Response of opium poppy (*Papaver somniferum*) to phosphorus and potassium. *Indian Journal of Agricultural Sciences* **60**(6): 417-418.

135. **Kammerer L, De-Eknamkul W, Zenk MH. 1996.** Enzymatic 12-hydroxylation and 12-O-methylation of dihydrochelirubine in dihydromacarpine formation by *Thalictrum bulgaricum*. *Phytochemistry* **36**: 1409-1416.

136. **Kartashakina IN, Shamsutdinov MRI, Shakirov TT. 1966.** Isolation of psoralen from the seeds of Psoralea drupacea. *Chemical Abstract* **65**: 1038b.

137. **Kauss H, Krause K, Jeblick W. 1992.** Methyl jasmonate conditions parsley suspension cells for increased elicitation of phenyl propanid defense responses. *Biochem Biophys Res Commun* **189**: 304-308.

138. **Keen NT, Yoshikawa M, Wangen MC. 1983.** Phytoalexin elicitor activity of carbohydrates from *Phytophtora megasperma* ssp. var *glycinea* and other sources. *Plant Physiology* **71**: 466-471.

139. **Khastagir H. 1947.** Natural coumarins isolated from the leaves of *Citrus acida*. *J India Chem Soc* **24**: 421.

140. **Kindl, 1971** dans **Matern U, Strasser H, Wendorff H, Hamerski D. 1988.** Coumarins and furanocoumarins. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants* **5**: 3-21.

141. **Knogge W, Kombrick E, Schmelzer E, Hahlbrck K. 1987.** Occurrence of phytoalexins and other putative

defense-related substances in uninfected parsley plants. *Planta* **171**: 279-287.

142. **Kochenberger W, Pope JM, Xia Y, Jeffrey KR, Komor E, Callaghan PT.** 1997. A non-invasive measurement of phloem and xylem water flow in castor bean seedlings by nuclear magnetic resonance microimaging. *Planta* **201**: 53-63.

143. **Kofinas C, Chinou I, Loukis A, Harvala C, Maillard M, Hostettmann K. 1998.** Flavonoids and bioactive coumarins of *Tordylium apulum*. *Phytochemistry* **48**(4): 637-641.

144. **Kuhn W. 1990.** NMR microscopy fundamentals: limits and possible applications. *Angew Chem Int Ed Engl* **29**: 1-19.

145. **Kurz WGW, Paiva NL, Tyler RT. 1990.** Biosynthesis of sanguinarine by elicitation of surface immobilized cells of *Papaver somniferum* L. **Dans**: Nijkamp HJJ, van der Plas LHW, van Aartrijk J (eds), *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Dordrecht / Kluver:

146. **Kuske H. 1938.** Experimentelle untersuchunggen zur photosensibilisierung der haut durch pflanzliche wirstoffs. *Arch. F. Dermatol. Syphil.* **178**: 112-113.

147. **Labbe G, Descatoire V, Letteron P, Degott C, Tinel M, Larrey D, Carrion-Pavlov Y, Geneve J, Amouyal G, Pessayre D. 1987.** The drug methoxsalen, a suicide substrate for cytochrome P450, decreases the metabolic activation, and prevent the hepatotoxicity, of carbon tetrachloride in mice. *Biochemical Pharmacology* **36**: 907-914.

148. **Lauterbur PC. 1973.** *Nature* **242**: 190.

149. **Lee JE, Vogt T, Hause B, Lobler M. 1997.** Methyl jasmonate induces an O-methyltransferase in barley. *Plant Cell Physiol* **38**(7): 851-862.

150. **Lehman RH, Rice EL. 1972.** Effect of deficiencies of nitrogen, potassium and sulfur on chlorogenic acids and scopolin in sunflower. *Am Midl Nat* **87**: 71-80.

151. **Lerner AB, Denton CR, Fitzpatrick TB. 1953.** Clinical and experimental studies in vitiligo. *J Invest Dermatol* **20**: 299-308.

152. **Loche J, Chouteau J. 1963.** Incidences des carences en Ca, Mg or P sur l'accumulation des polyphenol dans la feuille de tabac. *C R Hebd Seances Acad Agric Fr* **49**: 1017-1026.

153. **Lord KM, Epton HAS, Frost RP. 1988.** Virus infection and furanocoumarins in celery. *Plant Pathology* **37**: 385-389.

154. **MacFall J, Johnson A. 1994.** The architecture of plant vasculature and transport as seen with magnetic resonance microscopy. *Canadian Journal of Botany* **72**: 1561-1573.

155. **Macias FA, Galindo JCG, Massanet GM, Rodriguez-Luis F, Zubia E. 1993.** Allelochemicals from *Pilocarpus goudotianus* leaves. *Journal of chemical ecology* **19**(7): 1371-1379.

156. **Malane MS, Gasparro FP. 1991.** T cell molecular targets for psoralen. *Annals New York Academy of sciences* :

196-208.

157. **Marschner H. 1986.** *Mineral nutrition of higher plants.* Academic Press.

158. **Martz F, Maury S, Pincon G, Legrand M. 1998.** cDNA cloning, substrate specificity and expression study of tobacco caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, a lignin biosynthetic enzyme. *Plant Mol Biol* **36**(3): 427-437.

159. **Massot B, Milesi S, Gontier E, Bourgaud F, Guckert A. 2000.** Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of Ruta graveolens. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* in press.

160. **Masuda T, Takasugi M, Anetai M. 1998.** Psoralen and other linear furanocoumarins as phytoalexins in *Glehnia littoralis*. *Phytochemistry* **47**(1): 13-16.

161. **McKey D. 1974.** Adaptative patterns in alkaloid physiology. *American naturalist* **108**: 305-320.

162. **McNeely W, Goa KL. 1998.** 5-Methoxypsoralen. A review of its effects in psoriasis and vitiligo. *Exp Toxicol Pathol* **50**(4-6): 397-401.

163. **Meijer H, Souer E, Verpoorte R, Hoge JH. 1993.** Isolation of cytochrome P-450 cDNA clones from the higher plant *Catharanthus roseus* by a PCR strategy. *Plant Molecular Biology* **22**: 379-383.

164. **Meininger M, Stowasser R, Jakob PM, Schneider H, Koppler D, Bringmann G, Zimmermznn U, Haase A.** 1997. Nuclear magnetic resonance microscopy if *Ancistrocladus heyneanus*. *Protoplasma* **198**: 210-217.

165. **Milesi S. 1997.** Caractérisation de l'hydroparenchyme d'*Aloe vera* et de son constituant acemannan, dans diverses conditions de cultures. *Mémoire de DEA de l'INPL et mémoire de DAA de l'ENSAIA*: 32p.

166. **Milesi S, Massot B, Piutti S, Goergen JL, Murano E, Toffanin R, Bourgaud F, Gontier E, Guckert A. 2001.** *Ruta graveolens* cell cultures for psorelens production: culture in bioreactor, effect of elicitation and calcium-alginate immobilization. *In press.*

167. **Mizutani M, Ward E, Dimaio J, Ohtao O, Ryals J, Sato R. 1993.** Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding mung bean cutyochrome P450 possessing C4H activity. *Biochem Biophys Res Comm* **190**: 850.

168. **Mizutani M, Ward E, Ohtao O. 1998.** Cytochrome P450 superfamily in *Arabidopsis thaliana*; isolation of cDNA, differential expression, and RFLP mapping of multiple cytochromes P450. *Plant Molecular Biology* **37**: 39-52.

169. **Morard P. 1995.** *Les cultures végétales hors sol.* Publications agricoles Agen, ISBN 2-9509297-0-2: 304p.

170. **Mueller MJ, Brodschelm W, Sannagl E, Zenk M. 1993.** Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 7490-7494.

171. **Muhlbach HP. 1998.** Use of plant cell cultures in biotechnology. *Biotechnology Annual Review* **4**:113-176.

172. **Mukundan U, Bhide V, Dawda H. 1999.** Production of betalains by hairy root culltures of *Beta vulgaris* L. **Dans**: Fu TJ, Singh G, Curtis WR (eds), *Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredients.* Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York: 121-128.

173. **Müller K, Börger H. 1940.** Experimentelle Untersuchungen über die Phytophtora-resistenz der Kartoffel. *Arb. Biol. Reichsanstat. Land-u Forstwirtsch Berlin* **23**:189-231.

174. **Müller K. 1956.** Eininge einfache versuchenzum nachweis von phytoalexinen. *Phytopathol. Z.* **27**:237-254.

175. **Murano E, Jellus V, Piras A, Toffanin R.** 1998. Cell wall polysaccharides from *Gelidium* species: physico-chemical studies using MRI techniques. *Journal of Applied Phycology* **10**:315-322.

176. **Murashige T, Skoog F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497.

177. **Murray RDH, Mendez J, Brown SA. 1982.** *The natural coumarins. Occurrence, chemistry and biochemistry.* John Wiley and Sons, Chichester, England.

178. **Musajo L, Bordin F, Caporale G *et al.* 1967.** Photoreactions et 3655 : a between pyrimidine bases and skin photosensitizing furocoumarines. *Photochem Photobiol* **6** : 711-719.

179. **Musajo *et al.*, 1965.** dans **Musajo L, Rodighiero G, Beccia A, Dall'Acqua F, Malesani G. 1966.** The photoreaction between DNA and the skin-photosensitizing furocoumarins studied using labelled bergapten. *Experientia* **22**(2): 75.

180. **Nakaoki T, Morita N. 1953.** Constituent of fruits of *Fagara* species of Japan. *J Pharm Soc Japan* **73**: 770.

181. **Nguyen C, Bouque V, Bourgaud F, Guckert A.1997.** Quantification of daidzein and furanocoumarin conjugates of *Psoralea cinerea* L. (Leguminosae). *Phytochemical Analysis* **8** : 27-31.

182. **Nitsch JP. 1969.** Experimental androgenesis in *Nicitiana*. *Phytomorphol* **19**: 389-404.

183. **Oksman-Caldentey KM, Hiltunen R, Hokkanen HTM. 1996.** Transgenic crops for improved pharmaceutical products. *Field Crop Research* **45**(1-3): 57-69.

184. **Osakabe Y, Nanto K, Kitamura H, Kawai S, Kondo Y, Fujii T, Takabe K, Katayama Y, Morohoshi N. 1996.** Immunocytochemical localization of phenylalanine ammonia-lyase in tissues of Populus kitakamiensis. *Planta* **200**(1): 13-19.

185. **Pagani F. 1981.** Fiticostituenti della *Pastinaca urens. Boll Chim Farm* **120**: 213-221.

186. **Pank F. 1990.** The influence of chemical weed control on quality characters of medicinal and aromatic plants. *Herba Hungarica* **29**(3): 51-58.

187. **Pathak MA, Fitzpatrick TB. 1959.** Relationship of molecular configuration to the activity of furocoumarins which increase the cutaneous responses following long wave ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol* **32**:255-262.

188. **Pathak MA, Farrington Daniels Jr, Fitzpatrick TB. 1962.** The presently known distribution of furocoumarins (psoralens) in plants. *J Invest Dermatol* **39**: 225-299.

189. **Pathak MA, Fitzpatrick TB. 1992.** The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedecine* **9**(1): 33-35.

190. **Pathak MA. 1961.** Mechanism of psoralen photosensitization and in vivo biologic action spectrum of 8-methoxypsoralen. *J Invest Dermatol* **37**: 397-407.

191. **Payne GF, Bringi V, Prince C, Shuler ML. 1991.** *Plant cell and tissue culture in liquid systems.* Hanser series in biotechnology: 346 p.

192. **Pira E, Romano C, Sulotto F, Pavan I, Monaco E. 1989.** *Heracleum mantegazzianum* growth phases and furocoumarin content. *Contact Dermatitis* **21**: 300-303.

193. **Poli F, Titillini B, Tosi B, Saccheti G, Bruni A. 1995.** Histological localization of coumarines in differents organs of *Smyrnium perfoliatum* (Apiaceae). *Phyton* **35**(2): 209-217.

194. **Pope J, Jonas D, Walker R. 1993**. Applications of NMR micro-imaging to the study of water, lipid and carbohydrate distribution in grape berries. *Protoplasma 173*: 177-186.

195. **Poutaraud A, Bourgaud F, Girardin P, Gontier E. 2000.** Cultivation of rue (*Ruta graveolens* L., *Ruta*ceae) for the production of furanocoumarins of therapeutic value. *Canadian Journal of Botany* **78**: 1-10.

196. **Purcell EM, Torrey HC, Pound RV. 1946**. *Phys Rev* **69**: 37.

197. **Reinhard E, Corduan G, Volk OH. 1968.** Uber Gewebekulturen von *Ruta graveolens. Planta Medica* **16**: 8-16.

198. **Reyes RE, Gonzales AG. 1970.** Structure of pinnarin and furopinnarin. Two new coumarins from the roots of *Ruta pinnata. Phytochemistry* **9**: 833-840.

199. **Rhoades DF. 1979.** Evolution of plant chemical defense against herbivores. **Dans**: Rosenthal GA et Janzen DH (eds), *Herbivores : their interaction with secondary plant metabolites.* Academic press, New-York: 4-54.

200. **Rhodes MJC. 1994.** Physiological roles for secondary metabolites in plants: some progress, many outstanding problems. *Plant Molecular Biology* **24**: 1-20.

201. **Rodighiero G, Caporale G, Albiero. 1953.** Ricerche sulle cumarine della *Ruta graveolens. Gazz Chim Ital* **84**: 874.

202. **Rodighiero G, Dall'Acqua F. 1976.** Biochemical and medical aspects of psoralens. *Photochemistry and Photobiology* **24**: 647-653.

203. **Roelandts R. 1984.** Mutagenicity and carcinogenicity of methoxsalen plus UV-A. *Arch Dermatol* **120**: 662-669.

204. **Roisin C, Gillet-Manceau F, Nava Saucedo JE, Fliniaux M, Jacquin-Dubreuil A, Barbotin JN. 1997.** Enhanced production of scopolin by *Solanum aviculare* cells immobilised within Ca-alginate gel beads. *Plant Cell Rep* **16**: 349-353.

205. **Saqib GN, Hui Y-H, Anderson JE, McLaughin JL. 1990.** Bioactive furanocoumarins from the Berries of Zanthoxylum americanum. *Phytotherapy research* **4**(6): 216-219.

206. **Scheel D, Sandermann H. 1975.** On the mechanism of light induction of plant microsomal cinnamic acid 4-hydroxylase. *Planta* **124**: 211-214.

207. **Schuler MA. 1996.** Plant cytochrome P450 monooxugenases. *Critical Reviews in Plant Sciences* **15**(3): 235-284.

208. **Scott BR, Pathak MA, Mohn GR. 1976.** Molecular and genetic basis of furocoumarin reactions. *Mutation Research* **39**: 29-74.

209. **Sharp JK, Valent BS, Albersteim P. 1984.** Purification and partial characterization of β-glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *Journal of Biological Chemistry* **259**: 11312-11320.

210. **Singh G. 1999.** Elicitationmanipulating and enhancing secondary metabolite production. **Dans**: Fu TJ, Singh G, Curtis WR (eds), *Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredients*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York: 101-112.

211. **Singh M, Shivaraj B. 1998.** Intercropping in lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) (Steud. Wats).; *Journal of Agronomy and Crop Science* **180**(1): 23-26.

212. **Singh SP, Sudhir S, Khanna KR, Shukla S. 1999.** Breeding strategies in opium poppy (*Papaver somniferum* L.) at National Botanical Research Institute, Luchnow, India. *Applied Botany Abstracts* **19**(2): 121-139.

213. **Smith MAL. 1995**. Large-scale production of secondary metabolites. **Dans**: Terzi M, Cella R, Falavigna A (eds), *Current issues in plant molecular and cellular biology*. Dordrecht / Kluwer Academic: 669-674.

214. **Song PS, Tapley KJ. 1979.** Photochemistry and photobiology of psoralens. *Photochemistry and Photobiology* **29**: 1177-1197.

215. **Souetre E, Salvati E, Belugou JL, Krebs B, Darcourt G. 1990.** 5-methoxypsoralen as a specific stimulating agent of melatonin secretion in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **71**(3): 670-674.

216. **Spath E. 1937.** Die naturlichen Cumarine. *Chemische Berchte* **70a**: 83-117.

217. **Steck W, Bailey BK, Shyluk JP, Gamborg OL. 1971.** Coumarins and alkaloids from cell cultures of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry* **10**: 191-194.

218. **Steck W, Brown SA. 1970.** Biosynthesis of angular furocoumarins. *Can J Biochemistry* **48**: 872-880.

219. **Steck W. 1969.** The role of marmesin and columbianetin in the biosynthesis of furanocoumarins. *Tetrahedron Letters* **54**: 4805-4808.

220. **Steck W. 1970.** Leaf furanocoumarins of *Heracleum lanatum*. *Phytochemistry* **9**: 1145-1146.

221. **Subramaniam R, Reinold S, Molitor EK, Douglas CJ. 1993.** Structure, inheritance, and expression of hybrid poplar (Populus trichocarpa x Populus deltoids) phenylalanine ammonia-lyase genes. *Plant Physiol* **102**(1): 71-83.

222. **Suphla B, Gupta AP, Gupta MM, Govil CM, Suchil K, Bajpai S. 1998.** Identification of a genotype of opium poppy Papaver somniferum in which foliage, peduncles and capsules are rich in morphine. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*. **20**(3): 690-692.

223. **Swain LA, Downum KR. 1991.** Phototoxic metabolites of tropical plants. *Naturally occuring pest bioregulators*

chap 25: 361-370.

224.**Swerdlow JL. 2000.** Remèdes naturels. *National Geographic* **2.5**(8): 82-101.

225.**Tabata M, Fujita Y. 1985.** Production of shikonin by plant cell cultures. **Dans**: Day P, Zaitlin M, Hollaender A (eds), *Biotechnology in Plan Science*. Orlando / Academic Press: 207-218.

226.**Tabata M, Mizukami H, Hiraoka N, Konoshima M. 1974.** Pigment formation in callus cultures of Lithospermum erythrorhizon. *Phytochemistry* **13**: 927-932.

227.**Tescione L, Asplund P, Curtis WR. 1999.** Reactor design for root culture. **Dans**: Fu TJ, Singh G, Curtis WR (eds), *Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredients*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York: 139-156.

228.**Teutsch HG, Hasenfrantz MP, Lesot A, Stoltz C, Garnier JM, Jeltsch JM, Durst F, Werck-Reichhart D. 1993.** Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 4102.

229.**Thomasset B, Gontier E, Sangwan_Norreel BS, Barbotin JN. 1990.** Influence of stress conditions (i.e. immobilization) on growth, viability and alkaloids contents of *Coffea arabica* and *Datura innoxia* cells. **Dans**: de Bont JAM, Visser J, Mattiasson B, Tramper J (eds), *Physiology of immobilized cells*. Elsevier, Amsterdam: 597-602.

230.**Thompson HJ, Sharma SK, Browm SA. 1978.** O-methyltransferases of furocoumarin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* **188**: 272-281.

231.**Tinel M, Belghiti J, Descatoire V, Amouyal G, Letteron P, Geneve J, Larrey D, Pessayre D. 1987.** Inactivation of human liver cytochrome P450 by drug methoxsalen and other psoralen derivatives. *Biochemical Pharmacology* **36**: 951-955.

232.**Torssell KBG. 1997.** *Natural product chemistry : a mechanistic, biosynthetic and ecological approach.* Apotekarsocietete, Swedish pharmaceutical society: 480p.

233.**Ulbrich B. 1986.** Nutrition and environment of plant cells in bioreactors. **Dans**: Khorhola M, Tuompo H, Kauppinen V (eds), *Proc Conf on Global Impacts of Applied Microbiology / Symposium on Alcohol Fermentation and Plant Cell Culture*, Helsinki 1985, Volume 4. Helsinki / Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research 1986: 147-164.

234.**Varga E, Kusovkina IN, Rozsa ZS, Szendrei K. 1978.** Coumarins and alkaloids from root-originated tissue culture of *Ruta graveolens* L. ssp. Hortensis (Mill.). *Chemical Abstracts* **89**: 176400g.

235.**Varga E, Szendrei K, Novak I, Reisch J. 1975.** Isolation of coumarin glucosides from tissue cultures of *Ruta graveolens*. *Chemical Abstracts* **82**: 13996x.

236.**Veronese FM, Schiavon O Bevilacqua R, Bordin F, Rodighiero G. 1982.** Photoinactivation of enzymes by minear and angular furocoumarins. *Photochem Photobiol* **36**: 25-30.

237.**Verpoorte R, van der Heijden R, ten Hoopen HJG, Memelink J. 1999.** Novel approaches to improve plant

secondary metabolite production. **Dans**: Fu TJ, Singh G, Curtis WR (eds), *Plant Cell and Tissue Culture for the Production of Food Ingredients*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York: 85-100.

238. **Von Broke W, Reinhard E, Nicholson G, Koning WA. 1971.** Uber das Vorkommen von 3-(1',1'-dimethylallyl)-scopoletin in Gewekulturen von *Ruta graveolens*. *Z Naturforsch, B: Anorg Chem, Org Chem, Biochem, Biophys, Biol* **26B**: 1252-1255.

239. **Waxman StG. 1987.** Conduction properties and pathophysiology of myelinated and non myelinated nerve fibers. **Dans**: Matthews WBS (ed), *Handbook of Clinical Neurology*. Amsterdam: 41-62.

240. **Wendorff H, Matern U. 1986.** Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi. Microsomal conversion of (+)marmesin into psoralen. *Eur J Biochem* **161**(2): 391-398.

241. **Werck-Reichhart I, Hehn I, Didierjean I. 2000.** Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends Plant Sci* **5**(3): 116-123.

242. **Westphal K. 1990.** Large-scale production of new biologically active compounds in plant-cell cultures. **Dans**: Nijkamp HJJ, van der Plas LHW, van Aartrijk J (eds), *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Dordrecht / Kluver: 601-608.

243. **White PR. 1963.** The cultivation of animal and plant cells. *The Ronald press, New-York*: 228 p.

244. **Wink M. 1988.** Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theor Appl Genet* **75**: 225-233.

245. **Ye ZH, Varner JE. 1995.** Differential expression of two O-methyltransferases in lignin biosynthesis in Zinnia elegans. *Plant Physiol* **108**(2): 459-467.

246. **Yukimune Y, Tabata H, Higashi Y, Hara Y. 1996.** Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature Biotechnol* **14**: 1129-1132.

247. **Zangerl AR, Berenbaum MR. 1987.** Furanocoumarins in wild parsnip: effects of photosynthetically active radiation, ultraviolet light and nutrients. *Ecology* **68**(3): 516-520.

248. **Zangerl AR, Berenbaum MR. 1993.** Plant chemistry, insect adaptations to plant chemistry, and host plant utilization patterns. *Ecology* **74**(1): 47-54.

249. **Zangerl AR, Nitao JK. 1998.** Optimal defence, kin conflict and the distribution of furanocoumarins among offspring of wild parnsip. *Evolutionary Ecology* **12**: 443-457.

250. **Zangerl AR, Rutledge CE. 1996.** The probability of attack and patterns of constitutive and induced defense: a test of optimal defense theory. *The American Naturalist* **147**(4): 599-608.

251. **Zangerl et Bazzaz, 1992** dans **Zangerl AR, Rutledge CE. 1996.** The probability of attack and patterns of constitutive and induced defense: a test of optimal defense theory. *The American Naturalist* **147**(4): 599-608.

252. **Zenk MH, El-Shagi H, Schulte U. 1975.** Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta Med* (suppl): 79-101.

253.**Zenk MH. 1978.** The impact of plant cell culture on industry. **Dans**: Thorpe TA (ed), *Frontiers of plant tissue culture*. Calgary / the International Association for Plant Tissue Culture: 1-13.

254.**Zobel A, Brown SA, March E. 1990.** Histological localization of psoralens in fruits of Psoralea bitumosa. *Can J Bot* **69**: 1673-1678.

255.**Zobel AM, Brown SA. 1989.** Histological localization of furanocoumarins in *Ruta graveolens* shoots. *Canadian Journal of Botany* **67**: 915-921.

256.**Zobel AM, Brown SA. 1990.** Seasonal changes of furanocoumarin concentrations in leaves of *Heracleum lanatum*. *Journal of Chemical Ecology* **16**(5): 1623-1634.

257.**Zobel AM, Brown SA. 1991a.** Furanocoumarin concentration in fruits and seeds of *Angelica archangelica*. *Environmental and Experimental Botany* **31**(4): 447-452.

258.**Zobel AM, Brown SA. 1991b.** Psoralen on the surface of seeds of Rutaceae and fruits of Umbelliferae and Leguminosae. *Canadian Journal of Botany* **69**: 485-488.

259.**Zobel AM, Wang J, March RE, Brown SA. 1991.** Identification of eight coumarins occurring with psoralen, xanthotoxin, and bergapten on leaf surfaces. *Journal of Chemical Ecology* **17**(9): 1859-1870.

260.**Zobel AM, Wang J, March RE, Brown SA. 1991.** Identification of eight coumarins occurring with psoralen, xanthotoxin, and bergapten on leaf surfaces. *Journal of Chemical Ecology* **17**(9): 1859-1870.

261.**Zobel AM. 1991.** Comparison of furanocoumarin concentrations of greenhouse-grown *Ruta chalepensis* with outdoor plants later transferred to greenhouse. *Journal of Chemical Ecology* **17**(1): 21-27.

262.**Zumwalt JG, Neal JJ. 1993.** Cytochromes P450 from *Papilio polyxenes*: adaptations to host plant allelochemicals. *Comp Biochem Physiol* **106C**(1): 111-118.

LISTES DES FIGURES, TABLES ET PHOTOGRAPHIES

FIGURES, TABLES ET PHOTOGRAPHIES

FIGURES

Chapitre A : Synthèse bibliographique

Figure A-1 : Structure chimique et poids moléculaire du psoralène et de 3 dérivés méthoxylés : le bergaptène, la xanthotoxine, l'isopimpinelline 11

Figure A-2 : Principales voies du métabolisme secondaire chez les végétaux. D'après Torssell, 1997 11

Figure A-3 : Voie de biosynthèse des furocoumarines linéaires, à partir de la L-phénylalanine. D'après Brown, 1979 12

Figure A-4 : Voies de biosynthèse aboutissant à l'isopimpinelline : hypothèses soutenues par l'équipe de Brown (Brown *et al.*, 1970) et celles soutenues par l'équipe de Dall'Acqua (Dall'Acqua,et al., 1972) 12

Figure A-5 : Chaîne d'oxydoréduction conduisant à l'hydroxylation du psoralène : intervention d'enzymes cytochrome P450-dépendantes au niveau de la membrane endoplasmique. D'après Werck-Reichhart *et al.*, 2000 13

Figure A-6 : Mécanismes impliqués dans les photoréactions des furocoumarines avec des substrats : voies toxiques et anoxiques. D'après Dall'Acqua et Martelli, 1991 14

Figure A-7 : Représentation schématique de la photocycloaddition d'une furocoumarine linéaire avec des bases pyrimidiques de l'ADN 15

Figure A-8 : Structure moléculaire d'une cycloaddition C4 entre le psoralène et le méthylester d'acide linolénique 15

Figure A-9 : Mécanisme de transduction de messages extracellulaires au travers de la membrane et réponses intracellulaires en cascade : conséquences sur la prolifération cellulaire et niveaux d'action des furocoumarines. D'après Dall'Acqua et Martelli, 1991 16

Figure A-10 : Photophérèse 16

Figure A-11 : Hypothèses des mécanismes de réactions phototoxiques et photoallergiques dans les dermites de contact. Proposées par Harber et Baer, 1972 17

Figure A-12 : Concentrations (% de MS) en furocoumarines linéaires identifiées chez quelques espèces végétales supérieures 22

Figure A-13 : Procédure de montée en échelle pour des cultures de cellules végétales. Proposée par Muhlbach, 1998 29

Chapitre B : Matériels, méthodes et protocoles

Figure B-1 : Scarification, germination et mise en culture des plantes entières 37

Figure B-2 : Découpage des plantes récoltées sur l'essai Azote (Bouzule 2000) 39

Figure B-3 : Coupes et prélèvements sur l'essai multifactoriel (Sologne 1997-2000) 40

Figure B-4 : Découpage des plantes récoltées sur l'essai multifactoriel (Sologne 1997-2000) 40

Figure B-5 : Etablissement des suspensions cellulaires 41

Figure B-6 : Dispositif d'évaluation de la croissance de suspensions cellulaires sans ouverture du flacon de culture 42

Figure B-7 : Calibration de la méthode de mesure indirecte de la croissance de suspensions cellulaires en flacon Erlemeyer de 250 ml 42

Figure B-8 : Obtention des cultures de *Verticillium dahliae*, pour l'élicitation de cultures cellulaires de *Ruta graveolens* 44

Figure B-9 : Immobilisation de cellules végétales dans des billes d'alginate 45

Figure B-10 : Résultats des expérimentations pour évaluer les effets du séchage (A), de la finesse du broyage de feuilles (B) ou de tiges (C), de la quantité de biomasse extraite (D) 47

Figure B-11 : Gradient de solvants de la phase mobile et débit, utilisés pour la séparation des furocoumarines par HPLC 48

Figure B-12 : Séquence d'écho de spin utilisée pour obtenir les microimages RMN 52

Chapitre C : Résultats

Figure C-1 : Teneur en furocoumarines (a) et profil des 4 furocoumarines (b) dans les feuilles de 4 espèces du genre *Ruta* 56

Figure C-2 : Teneur en furocoumarines (a) et profil des 4 furocoumarines (b) dans les feuilles de 16 écotypes de l'espèce *Ruta graveolens* 58

Figure C-3 : Production de matière sèche (a), teneur en furocoumarines (b) et quantité totale de furocoumarines (c) stockées dans la plante (*Ruta graveolens*) 60

Figure C-4 : Profil des 4 furocoumarines linéaires dans les 4 compartiments d'une plante (Ruta graveolens) 60

Figure C-5 : Teneurs en furocoumarines (a) dans les feuilles, tiges et racines de plantes (*Ruta graveolens*) cultivées en serre et profil des 4 furocoumarines linéaires (b) dans les 3 tissus 60

Figure C-6 : Concentrations en furocoumarines (a) et profil des 4 furocoumarines (b) dans le compartiment FRUIT de plantes cultivées au champ (*Ruta graveolens*) 62

Figure C-7 : Concentrations en furocoumarines (a et c) et profil des 4 furocoumarines (b et d) dans le compartiment FEUILLE de plantes (*Ruta graveolens*), cultivées au champ (a et b) ou en serre (c et d) 62

Figure C-8 : Concentrations en furocoumarines (a) et profil des 4 furocoumarines (b) de tiges de plantes cultivées au champ (*Ruta graveolens*) 64

Figure C-9 : Production de matière sèche (a), teneur en furocoumarines (b) et quantité de furocoumarines produite par plante chez *Ruta graveolens* récoltée à 3 stades phénologiques 65

Figure C-10 : Suivi de la teneur en furocoumarines dans les différents compartiments au cours de 3 stades phénologiques 65

Figure C-11 : Hauteurs des compartiments (avril, juillet et octobre 1998) 70

Figure C-12 : Effet de la hauteur de prélèvement sur le poids de matière sèche (a), la teneur (b) et la quantité de furocoumarines (c) 70

Figure C-13 : Interaction des facteurs DENSITE et DATE DE RECOLTE sur la production de matière sèche (a), la teneur (b) et la quantité totale (c) de furocoumarines dans le compartiment FRUIT+FEUILLE 72

Figure C-14 : Effet d'une coupe à 5 cm sur le poids de matière sèche et la quantité de furocoumarines de plantes récoltées au stade fructification (juillet 1998) 73

Figure C-15 : Effet de l'âge de la plante lors de la première coupe sur le poids de matière sèche et la quantité de furocoumarines de plantes récoltées au stade fructification (juillet) 73

Figure C-16 : Effet de la fertilisation azotée sur la production de matière sèche dans la plante entière 81

Figure C-17 : Effet de la fertilisation azotée sur la production de matière sèche (a), la teneur (b) et la quantité de furocoumarines produites dans le compartiment FRUIT+FEUILLE 81

Figure C-18 : Production de biomasse fraîche et quantité de furocoumarines dans la suspension cellulaire SC cultivée en flacon Erlenmeyer (250 ml) 87

Figure C-19 : Production de biomasse fraîche et quantité de furocoumarines (a), profil intra- et extra-cellulaires des 4 furocoumarines (b), de la suspension cellulaire DEO cultivée en flacon Erlenmeyer (250 ml) 87

Figure C-20 : Croissance de la suspension cellulaire deo cultivée dans plusieurs milieux de culture : la croissance (matière fraîche) a été estimée par la projection du ménisque des cellules décantées dans l'Erlemeyer incliné à 60° 88

Figure C-21 : Croissance et production de furocoumarines par des suspensions cellulaires de Rue en bioréacteur. Production de biomasse fraîche et quantité de furocoumarines produites par la suspension cellulaire SC cultivée en bioréacteur (2,5 L) 89

Figure C-22 : Elicitation de cellules indifférenciées de *Ruta graveolens* par le champignon *Verticillium dahliae* 90

Figure C-23 : Production de matière sèche par le champignon *Verticillium dahliae* 90

Figure C-24 : Elicitation de cellules indifférenciées de *Ruta graveolens* par le champignon *Verticillium dahliae* : effet de la quantité et de l'âge de l'agent éliciteur sur la croissance (a) et sur la quantité totale de furocoumarines produites par flacon (b) 90

Figure C-25 : Elicitation de cellules indifférenciées de *Ruta graveolens* par le champignon *Verticillium dahliae* : effet de la quantité et de l'âge de l'agent éliciteur sur les concentrations et le profil des 4 furocoumarines dans les cellules et dans le milieu90

Figure C-26 : Elicitation de cellules indifférenciées de *Ruta graveolens* par le champignon *Verticillium dahliae* : réponse au cours du temps 91

Figure C-27 : Elicitation de cellules indifférenciées de *Ruta graveolens* par le champignon *Verticillium dahliae* : réponse à l'élicitation en fonction de la concentration initiale des cellules 93

Figure C-28 : Analyses en composantes principales (ACP) des concentrations intracellulaires et ACP des concentrations extracellulaires des 4 furocoumarines : coordonnées des variables discriminantes dans le plan principal F1*F2 97

Figure C-29 : Analyses en composantes principales (ACP) des concentrations intracellulaires des 4 furocoumarines : individus représentés dans le plan principal F1*F2 97

Figure C-30 : Analyses en composantes principales (ACP) des concentrations extracellulaires des 4 furocoumarines : individus représentés dans le plan principal F1*F2 97

Figure C-31 : Immobilisation de cellules de Rue dans des billes d'alginate : profil des 4 furocoumarines dans les cellules et dans le milieu de suspensions cellulaires et de cellules immobilisées 98

Figure C-32 : Teneurs en furocoumarines de souches de suspensions cellulaires de *Ruta graveolens* 99

Chapitre D : Discussion générale

Figure D-1 : Teneurs et profil des 4 furocoumarines linéaires dans diverses cultures *in vitro* et dans les organes de plantes entières de *Ruta graveolens* 107

TABLES

Chapitre A : Synthèse bibliographique

Tableau A- 1 : Photoactivité des quatre furocoumarines 18

Tableau A- 2 : Concentrations maximales (% de MS) détectées dans les 4 familles productrices de furocoumarines, d'après l'Annexe 2 23

Tableau A- 3 : Usages médicaux de *Ruta graveolens* L. sur la côte amalfitaine (Province de Salerne, Italie) 25

Tableau A- 4 : Coumarines constitutives dans les cultures de cellules de *Ruta graveolens* L. 28

Tableau A- 5 : Exemples de bioréacteurs utilisés en industrie pour la production de métabolites secondaires de végétaux 28

Tableau A- 6 : Rendement en métabolites secondaires par des cultures de cellules végétales. La production peut être stimulée par certains traitements 29

Chapitre B : Matériels, méthodes et protocoles

Tableau B- 1 : Provenances des semences du genre *Ruta* et nombre de répétitions testées pour la production de furocoumarines 36

Tableau B- 2 : Provenances des semences des écotypes de l'espèce *Ruta graveolens* et nombre de répétitions testées pour la production de furocoumarines 37

Tableau B- 3 : Conditions de culture en phytotron 38

Tableau B- 4 : Apports azotés et prélèvements sur l'essai AZOTE 39

Tableau B- 5 : Récapitulatif des modalités coupe sur l'essai MULTIFACTORIEL (Sologne 1997-2000) 40

Tableau B- 6 : Mise en culture de cellules de *Ruta graveolens* élicitées par *Verticillium dahliae* autoclavé. Expérience 2 44

Tableau B- 7 : Mise en culture de cellules de *Ruta graveolens* élicitées par différentes cultures liquides de *Verticillium dahliae*. Expérience 3 45

Tableau B- 8 : Cellules immobilisées préparées à partir de cellules de *Ruta graveolens* 45

Tableau B- 9 : Calcul des facteurs de réponses des 4 furocoumarines 49

Chapitre C : Résultats et éléments de discussion

Tableau C- 1 : Teneurs en psoralène, xanthotoxine, isopimpinelline et bergaptène mesurées dans les feuilles chez 4 espèces du genre *Ruta* 56

Tableau C- 2 : Teneurs en furocoumarines et profil des 4 furocoumarines dans 3 tissus du compartiment FEUILLE de plantes *Ruta graveolens* récoltées en serre : lobes (plages 63

Tableau C- 3 : Effet de la date de récolte sur la production de matière sèche, la teneur et la quantité de furocoumarines par la Rue dans le compartiment FRUIT+FEUILLE 72

Tableau C- 4 : Effet d'une coupe à 5 cm sur la teneur en furocoumarines dans les 4 compartiments de la plante : Fruit, Feuille, Tige, Racine 73

Tableau C- 5 : Effet de l'âge de la plante lors de la première coupe, sur la teneur en furocoumarines dans les 4 compartiments de la plante : Fruit, Feuille, Tige, Racine 74

Tableau C- 6 : Effets des facteurs densité, coupe et année de récolte sur la production de matière sèche par la Rue, dans le compartiment supérieur FRUIT+FEUILLE 76

Tableau C- 7 : Effets des facteurs densité, coupe et année de récolte sur la teneur en furocoumarines dans le compartiment supérieur FRUIT+FEUILLE chez la Rue officinale 76

Tableau C- 8 : Effets des facteurs densité, coupe et année de récolte sur la quantité de furocoumarines stockées dans le compartiment supérieur FRUIT+FEUILLE chez la Rue 77

Tableau C- 9 : Décomposition du rendement en furocoumarines dans le compartiment FRUIT : effet des facteurs densité et coupe sur les plantes récoltées en 2000 78

Tableau C- 10 : Effets des facteurs densité, coupe et année de récolte sur le rendement surfacique en furocoumarines par la Rue, dans le compartiment supérieur FRUIT+FEUILLE 79

Tableau C- 11 : Effets du site de culture sur la production de matière sèche et la production de furocoumarines par la Rue, dans le

compartiment supérieur FRUIT+FEUILLE 82

Tableau C- 12 : Elicitation de suspensions cellulaires de *Ruta graveolens* par *Verticillium dahliae* : effet de la fraction de culture du champignon sur la réponse à l'élicitation 92

Tableau C- 13 : Analyse de variance des teneurs intracellulaires et concentrations extracellulaires en furocoumarines dans les cultures de cellules immobilisées et les 97

Tableau C- 14 : Gammes des teneurs en furocoumarines et profil des 4 furocoumarines détectées dans différentes souches de *Ruta graveolens* 99

Chapitre D : Discussion générale

Tableau D- 1 : Productivité en furocoumarines, par unité de biomasse et unité de temps, de différents tissus cultivés *in vitro* et des organes de la plante 108

PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES

Planche 1 : Effet photosensibilisant des furocoumarines 17

Planche 2 : Dessins de quelques espèces du genre *Ruta* (Flore Bonnier) 25

Planche 3 : Initiation de cals de *Ruta graveolens* 41

Planche 4 : Suspensions cellulaires de *Ruta graveolens* 41

Planche 5 : Bioréacteur de culture des suspensions cellulaires de *Ruta graveolens* 43

Planche 6 : Culture de *Verticillium dahliae* en milieu liquide 43

Planche 7 : Cellules de *Ruta graveolens* immobilisées dans des billes d'alginate 43

Planche 8 : Quatre espèces du genre *Ruta* : *R. chalepensis, R. angustifolia, R. graveolens, R. montana* 57

Planche 9 : Découpage de *Ruta graveolens* cultivée au champ : compartiments Fruit, Feuille, Tige et Racine 59

Planche 10 : Essai Multifactorel (Sologne 1997-2000) : vues du champ en avril 1998 et juillet 2000 79

Planche 11 : Sites de culture de *Ruta graveolens* : essai Multifactoriel et essai Azote 82

Planche 12 : Formation d'un cal (gauche) à partir d'un explant d'*Aloe vera* (droite): microimages RMN. Résolution 110 µm 95

Planche 13 : Immobilisation de cellules indifférenciées de *Ruta graveolens* dans des billes d'alginate : microimages RMN. Résolution 86 µm (a) et 35 µm (b) 95

Planche 14 : Immobilisation de cellules indifférenciées de *Ruta graveolens* dans des billes d'alginate : microimages RMN. TE = 7,5 ms (a), TE = 15 ms (b), TE = 25 ms (c), TE = 50 ms (d) 96

Planche 15 : Immobilisation de cellules indifférenciées de *Ruta graveolens* dans des billes d'alginate : microimages RMN. Bille témoin (a) et bille contenant des cellules (b) 96

Planche 16 : Polymorphisme de suspensions cellulaires de *Ruta graveolens* 99

ANNEXES

ANNEXE 1

PRINCIPALES FUROCOUMARINES IDENTIFIEES CHEZ QUELQUES ESPECES VEGETALES SUPERIEURES (1)

pso = psoralène
berg = bergaptène
xanth = xanthotoxine
isop = isopimpinelline
marm = marmésine
ang = angélicine
imp = impératorine
isoip = isoimpératorine
oxyp = oxypeucédanine
ost = ostrudhol
phel = phellaptorine
be = bergaptol
oxyhy = *hydrate d'oxypeucédanine*

APIACEES

Genre	*espèces*	molécules													*Références*
		pso	berg	xanth	isop	marm	ang	imp	isoip	oxyp	ost	phel	be	oxyh	
Heracleum	*H. lanatum*	*	*	*	*		*					*			*Steck et Brown, 1970; Pathak et al., 1962; Zobel et al.1991; Zobel et Brown, 1990; Steck 1970.*
	H. sphondylium		*	*	*			*							*Ceska et al., 1987; Pathak et al., 1962*
	H. giganteum		*												*Pathak et al., 1962*
	H. nepalens		*												*Pathak et al., 1962*
	H. mantegazzianum	*	*	*	*										*Pira et al., 1989*
Ammi	*A. majus*		*	*	*	*		*	*	*				*	*Abu-Mustafa et al., 1970; Pathak et al., 1962; Zobel et al.1991*
Pasticana	*P. sativa*		*	*	*			*	*						*Berenbaum et al., 1984; Pathak et al., 1962; Zangerl et Berenbaum, 1993*
	P. urens		*	*	*			*				*			*Pagani, 1981*
Apium	*A. graveolens*		*	*	*			*				*			*Innocenti et al., 1976; Ceska et al., 1987; Zobel et al.1991*
Petroselium	*P. crispum*	*	*	*	*			*	*	*					*Chaudhary et al., 1986; Ceska et al., 1987; Knogge et al, 1987*
	P. sativum	*	*	*	*			*	*	*				*	*Innocenti et al., 1976; Pathak et al., 1962; Beier et al, 1994*
Prangos	*P. pabularia*							*		*					*Pathak et al., 1962*
Angelica	*A. archangelica*	*	*	*	*		*	*	*	*	*				*Steck et Brown, 1970; Pathak et al., 1962; Ceska et al., 1987*
	A. glabra						*	*				*			*Pathak et al., 1962*
	A. sylvatica			*		*		*	*	*	*	*		*	*Carbonnier et Molho, 1982*
Glehnia	*G. littoralis*	*	*	*											*Masuda et al., 1998*
	T. apulum						*								*Kofinas et al., 1998*
Pimpinella	*P. magna*		*												*Floss et Paikert, 1969; Pathak et al., 1962*
	P. saxifraga		*		*										*Pathak et al., 1962*
	P. anisum	*	*	*				*							*Ceska et al., 1986; Ceska et al., 1987; Zobel et al.1991*
Imperatoria	*I. ostruthium*							*	*	*					*Pathak et al., 1962*
Levisticum	*L. officinale*	*	*	*				*							*Ceska et al., 1986; Ceska et al., 1987*
Ligusticum	*L. acutifolium*		*												*Pathak et al., 1962*
	L. acutilobum		*												*Pathak et al., 1962*
Foeniculum	*F. vulgare*	*	*					*							*Ceska et al., 1986*
	C. libanotis		*	*	*										*Ena et al., 1991*
	A. prostatum	*	*	*											*Diawara et al., 1992*
Coriandrum	*C. sativum*		*	*											*Ceska et al., 1987*
Phellaptorus	*P. littoralis*											*			*Pathak et al., 1962*
Peucedanum	*P. ostruthium*							*	*	*	*				*Pathak et al., 1962*
	P. officinale									*					*Pathak et al., 1962*
Sesli	*S. indicum*		*		*										*Pathak et al., 1962*
Daucus	*D. carota*	*	*	*											*Ceska et al., 1986*

MORACEES

Genre	*espèces*	molécules													*Références*
		pso	berg	xanth	isop	marm	ang	imp	isoip	oxyp	ost	phel	be	oxyh	
Ficus	*F. carica*	*	*	*											*Khastagir, 1947; Abu-Mustafa et al., 1964; Swain et Downum, 1991; Pathak et al., 1962*
	F. sycomorus	*	*												*Abu-Mustafa et al., 1964; Swain et Downum, 1991*
	F. salicifolia	*	*												*Abu-Mustafa et al., 1964; Swain et Downum, 1991*
	F. asprima		*												*Swain et Downum, 1991*
	F. palmata		*												*Swain et Downum, 1991*
	F. pumila	*	*												*Swain et Downum, 1991*
	F. religiosa		*												*Swain et Downum, 1991*
Dorstenia	*D. zanzibrica*	*	*												*Swain et Downum, 1991*
	D. foetida	*	*												*Swain et Downum, 1991*
	D. contrajerva	*	*												*Swain et Downum, 1991*
Fatoua	*F. villosa*		*												*Swain et Downum, 1991*

ANNEXE 1 (SUITE)

PRINCIPALES FUROCOUMARINES IDENTIFIEES CHEZ QUELQUES ESPECES VEGETALES SUPERIEURES (2)

pso = psoralène
berg = bergaptène
xanth = xanthotoxine
isop = isopimpinelline
marm = marmésine
ang = angélicine
imp = impératorine
isoip = isoimpératorine
oxyp = oxypeucédanine
ost = ostrudhol
phel = phellaptorine
be = bergaptol
oxyhy = *hydrate d'oxypeucédanine*

FABACEES

Genre	*espèces*	molécules													***Références***
		pso	berg	xanth	isop	marm	ang	imp	isoip	oxyp	ost	phel	be	oxyh	
Psoralea	*P. corylifolia*	*					*								*Innocenti et al., 1977; Pathak et al., 1962; Innocenti et al., 1984*
	P. glandulosa	*					*								*Innocenti et al., 1991*
	P. onobrychis	*					*								*Innocenti et al., 1991*
	P. plumosa	*					*								*Innocenti et al., 1977; Innocenti et al., 1984*
	P. cinerea	*					*								*Innocenti et al., 1977; Innocenti et al., 1984*
	P. machnostachys	*					*								*Innocenti et al., 1977; Innocenti et al., 1991; Innocenti et al., 1984*
	P. martini	*					*								*Innocenti et al., 1977; Innocenti et al., 1991; Innocenti et al., 1984*
	P. pustulata	*					*								*Innocenti et al., 1977; Innocenti et al., 1984*
	P. leucantha	*					*								*Innocenti et al., 1984*
	P. subacaulis	*													*Baskin et al., 1967*
	P. bituminosa	*	*	*			*								*Innocenti et al., 1991; Zobel et al.1991*
	P. obtusifolia	*													*Bourgaud et al., 1994*
	P. canescens	*													*Bourgaud et al., 1994*
	P. lupinellus	*													*Bourgaud et al., 1994*
	P. drupacea	*													*Kartashakina et al., 1966*
	P. plicata	*					*								*Ahmad et Basha, 1972*
	P. psoralioides	*													*Baskin et al., 1967b*
Coronilla	*C. juncea*	*													*Innocenti et al., 1977*
	C. glauca	*					*								*Fedorin et al, 1975; Pathak et al., 1962*
	C. scorpioides	*					*								*Fedorin et al, 1975*

RUTACEES

Genre	*espèces*	molécules													***Références***
		pso	berg	xanth	isop	marm	ang	imp	isoip	oxyp	ost	phel	be	oxyh	
Ruta	*R. pinnata*	*	*	*	*	*				*					*Reyes et Gonzalez, 1970*
	R. graveolens	*	*	*						*					*Reinhard et al., 1968; Pathak et al., 1962*
	R. chalepensis	*	*	*				*							*Pathak et al., 1962; Zobel 1991*
	R. montana			*											*Pathak et al., 1962*
	R. bracteosa			*											*Pathak et al., 1962*
Citrus	*C. bergamia*		*										*		*Späth, 1937; Pathak et al., 1962*
	C. limonum		*									*			*Rodighiero et al., 1953; Pathak et al., 1962*
	C. acida		*		*										*Khastagir, 1947; Pathak et al., 1962*
	C. aurantifolia				*								*		*Pathak et al., 1962*
Thamnosma	*T . montana*		*		*										*Bennet et Bonner, 1953; Pathak et al., 1962*
	F. shinofolia		*		*										*Nakaoki et al., 1953*
Xanthoxylum	*X. americanum*	*	*	*				*	*						*Saqib et al., 1990*
	X. flavum	*		*											*Pathak et al., 1962*
Fagara	*F. xantholoides*		*	*											*Pathak et al., 1962*
	F. schinofolia		*												*Pathak et al., 1962*
	F. oilanthoides				*										*Pathak et al., 1962*
	P. goudotianus		*	*				*							*Macias et al., 1993*
Evodia	*E. danielli*	*	*	*											*Zobel et Brown, 1991b*
Aegle	*A. marmelos*							*							*Pathak et al., 1962*
Skimmia	*S. laureola*		*		*										*Pathak et al., 1962*
Luvanga	*L. scandens*			*	*										*Pathak et al., 1962*
Phellodendron	*P. chinensis*	*	*	*											*Zobel et Brown, 1991b*

ANNEXE 2

SITE LA NOUE/LA GITINIERE (1) : ANALYSE DE SOL

Granulométrie 5 fraction dans décarbonatation		
Argile (< 2 µm)	$g.kg^{-1}$ *sol*	30
Limon fin (2-20 µm)	$g.kg^{-1}$ *sol*	62
Limon grossier (20-50 µm)	$g.kg^{-1}$ *sol*	31
Sable fin (50-200 µm)	$g.kg^{-1}$ *sol*	199
Sable grossier (200-2000 µm)	$g.kg^{-1}$ *sol*	678
Carbone organique (C) - méthode Anne -	$g.kg^{-1}$ *sol*	4.08
Matières organiques	$g.kg^{-1}$ *sol*	7.0
Azote organique total (N) - méthode Kjeldahl -	$g.kg^{-1}$ *sol*	0.37
Rapport C/N		11.03
pH eau		6.2
Calcaire ($CaCO_3$) total	$g.kg^{-1}$ *sol*	1
Phosphore (P_2O_5) – méthode Olsen -	$g.kg^{-1}$ *sol*	0.107
Magnésium (MgO) échangeable acétate d'ammonium	$g.kg^{-1}$ *sol*	0.01
Potassium (K_2O) échangeable acétate d'ammonium	$g.kg^{-1}$ *sol*	0.10

ANNEXE 3

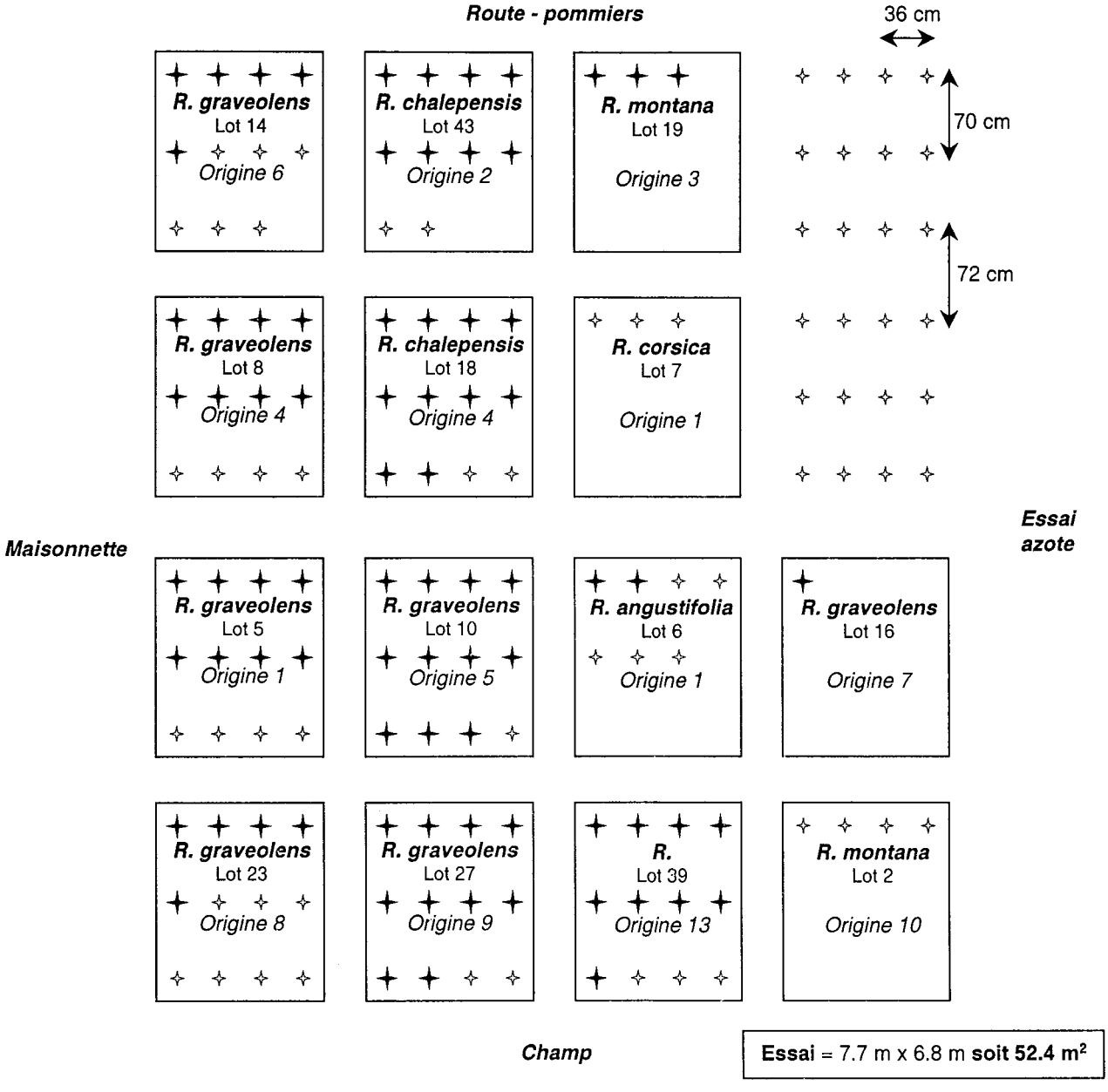
SITE LA BOUZULE (1) : ANALYSE DE SOL

Granulométrie 5 fraction dans décarbonatation		
Argile (< 2 µm)	*g.kg⁻¹ sol*	295
Limon fin (2-20 µm)	*g.kg⁻¹ sol*	313
Limon grossier (20-50 µm)	*g.kg⁻¹ sol*	172
Sable fin (50-200 µm)	*g.kg⁻¹ sol*	33
Sable grossier (200-2000 µm)	*g.kg⁻¹ sol*	187
Carbone organique (C) - méthode Anne -	*g.kg⁻¹ sol*	17.2
Matières organiques	*g.kg⁻¹ sol*	29.6
Azote organique total (N) - méthode Kjeldahl -	*g.kg⁻¹ sol*	1.62
Rapport C/N		10.62
pH eau		7.3
Calcaire ($CaCO_3$) total	*g.kg⁻¹ sol*	1
Phosphore (P_2O_5) – méthode Olsen -	*g.kg⁻¹ sol*	0.096
Magnésium (MgO) échangeable acétate d'ammonium	*g.kg⁻¹ sol*	0.23
Potassium (K_2O) échangeable acétate d'ammonium	*g.kg⁻¹ sol*	0.40

profondeur	**NO3-** (kg d'azote/ha)	**NH4+** (kg d'azote/ha)	**N total** (kg d'azote/ha)
0-20 cm	54.3	15.3	**69.6**
20-40 cm	24.3	4.8	**29.1**

ANNEXE 4

PLAN EXPERIMENTAL DE LA COLLECTION DE PLANTES DU GENRE *RUTA*



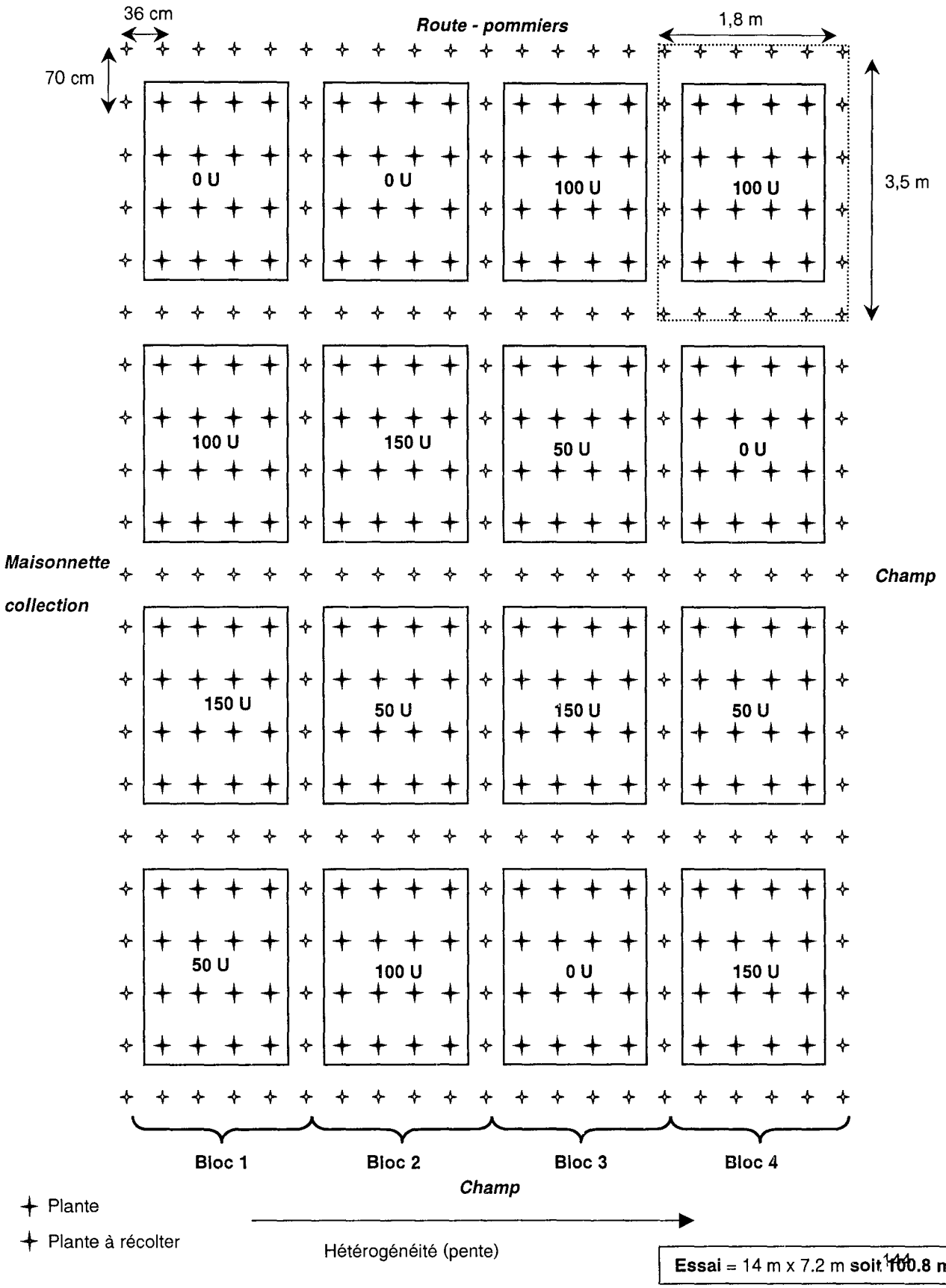
✧ Nb de plantules présentes au moment de la mise en place de l'essai (mai 1999)

✦ Nb de plantules présentes au moment du prélèvement de feuilles (octobre 1999)

Origines : ***1*** *– Museum d'Histoire Naturelle, Paris, France ;* ***2*** *– Orto Botanico Dell'Università, Sienne, Italie ;* ***3*** *– Botanischer Garten und Botaniches Museum, Berlin, Allemagne ;* ***4*** *– Botanischer Garten der Stadt, Krefeld, Allemagne ;* ***5*** *– Botanischer Garten der Universität, Leipzig, Allemagne ;* ***6*** *– Jardin Botanique, Nancy, France ;* ***7*** *– Station* Fédérale de *Recherches Agronomiques, Changins, Suisse ;* ***8*** *– Hortus Botanicus, Leuven, Belgique ;* ***9*** *– Botanischer Garten der Universität, Wien, Autriche ;* ***10*** *– CNPPMAI, Milly-la-Forêt, France ;* ***13*** *- Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Allemagne.*

ANNEXE 5

PLAN EXPERIMENTAL DE L'ESSAI AZOTE



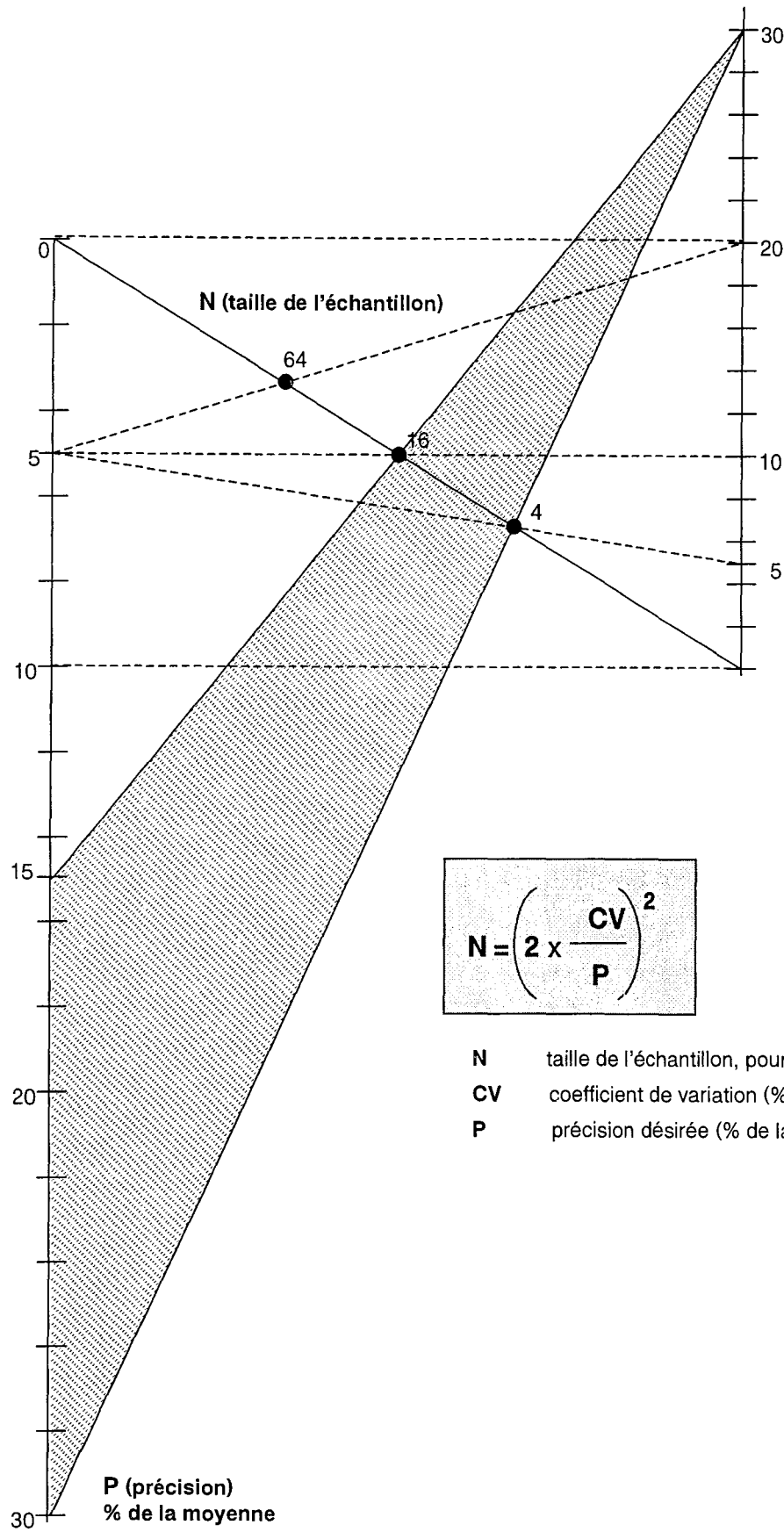
ANNEXE 6

COMPOSITION DE MILIEUX DE CULTURES TRADITIONNELLEMENT UTILISES EN CULTURE *IN VITRO*

		mg.L^{-1}					
		White	Heller	Nitsch	MS	Gamborg B_5	Z
Macroéléments	NH_4NO_3			720	1650		1800
	KNO_3	80		950	1900	2527,5	2000
	$CaCl_2$, 2 H_2O		75		440	150	300
	$MgSO_4$, 7 H_2O	750	250	185	370	246,5	300
	KH_2PO_4			68	170		200
	$Ca(NO_3)_2$, 4 H_2O	300					
	$NaNO_3$		600				
	$NaH2PO_4$, 2 H_2O	19	125			170	
	Na_2SO_4	200					
	KCl	65	750				
	$CaCl_2$			166			
	$(NH_4)SO_4$					134	
Microéléments	KI	0,75	0,01		0,83	0,75	0,83
	H_3BO_3	1,5	1	10	6,2	3	10
	MnSO4, H_2O					10	
	$MnSO_4$, 4 H_2O	5	0,1	25	22,3		20
	$ZnSO_4$, 7 H_2O	3	1	10	8,6	2	6,16
	Na_2MoO_4, 2 H_2O			0,25	0,25	0,25	0,25
	MoO_3	0,001					
	$CuSO_4$, 5 H_2O	0,01	0,03	0,025	0,025	0,025	0,025
	$AlCl_3$		0,03				
	$NiCl_2$, 6 H_2O		0,03				
	$CoCl_2$, 6 H_2O				0,025	0,025	0,025
Fer	$FeCl_3$, 6 H_2O		1				
	$Fe_2(SO_4)_3$	2,5					
	$FeSO_4$, 7 H_2O			27,8	27,8		27,8
	Na_2EDTA, 2 H_2O			37,3	37,3		37,3
	Sequestrene 330 Fe					28	
	ou FeNaEDTA			51,4	51,4	51,4	
Vitamines	Inositol			100	100	100	100
	Acide Nicotinique	0,05		5	0,5	1	1,5
	Pyridoxine HCl	0,01		0,5	0,5	1	0,3
	Thiamine HCl	0,01	1	0,5	0,1	10	0,8
	Glycine	3		2	2		
	Acide folique			0,5			
	Biotine			0,05			
Sucres	Saccharose	20000	20000	20000	30000	30000	20000
	Mannitol						2000
	pH	6,5	6,5	6,5	5,8	5,8	5,8

ANNEXE 7

ABAQUE DONNANT LA TAILLE DE L'ECHANTILLON, EN FONCTION DU COEFFICIENT DE VARIATION DE LA VARIABLE ETUDIEE ET DE LA PRECISION DESIREE (EN % DE LA MOYENNE), POUR UN RISQUE DE 5%



$$N = \left(2 \times \frac{CV}{P}\right)^2$$

N taille de l'échantillon, pour un risque de 5%

CV coefficient de variation (%)

P précision désirée (% de la moyenne)

PUBLICATIONS

SANDRINE MILESI

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

PUBLICATIONS DANS DES REVUES INTERNATIONALES A COMITE DE LECTURE

1. **Milesi S**, Massot B, Gontier E, Bourgaud F, Guckert A. **2001**. *Ruta graveolens* L.: a promising species for the production of furanocoumarins. *Plant Science* 161: 189-199.

   Voir page 150

2. Bourgaud F, Gravot A, **Milesi S**, Gontier E. **2001**. Production of plant secondary metabolites: from cell cultures to metabolic engineering. *Review in Plant Science*: Accepté avec corrections majeures.

3. **Milesi S**, Massot B, Piutti S, Goegen J-L, Murano E, Toffanin R, Bourgaud F, Gontier E, Guckert A. **2000.** *Ruta graveolens* cell cultures for psoralens production : Culture in bioreactor, effect of elicitation and calcium-alginate immobilization. *International Journal of Bio-Chromatography* **5**(4): 281-296.

   Voir page 161

4. Massot B, **Milesi S**, Gontier E, Bourgaud F, Guckert A. **2000.** Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropopagated shoots of *Ruta graveolens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **62**: 11-19.

   Voir page 177

CONFERENCES A DES COLLOQUES

5. **Milesi S**, Piutti S, Massot B, Gontier E, Bourgaud F, Guckert A. **1998.** *In vitro* cultures of *Ruta graveolens* for furanocoumarins production. *Congrès national IAPTC "l'usine cellulaire végétale in vitro"*, 2-4 décembre 1998, Amiens, France.

6. Bourgaud F, **Milesi S**, Massot B, Gontier E, Guckert A. **1998.** Plant sources for psoralens. International *Congress on psoralens and Bergamot Tree*, 30 nov-2 dec 1998, Reggio Calabria Italie.

COMMUNICATIONS A DES COLLOQUES

7. **Milesi S**, Massot B, Bourgaud F, Gontier E, Guckert A. **1999**. Secondary metabolite profile of *Ruta graveolens*: comparison between cell suspension, in vitro shoot culture and entire plant for furanocoumarin productivity. *Congrès national IAPTC&B "Les biotechnologies végétales à l'aube du XXième siècle: bilan et perspectives"*, 8-10 décembre 1999, Nancy, France.

8. Massot B, Gravot A, **Milesi S**, Bourgaud F, Gontier E, Guckert A. **1999**. Immuno-histo-localization of psoralen and bergapten in *Ruta graveolens* shoot tissue. Comparison with *Ficus carica* leaves. *Congrès national IAPTC&B "Les biotechnologies végétales à l'aube du XXième siècle: bilan et perspectives"*, 8-10 décembre 1999, Nancy, France.

9. Gontier E, Cléme,t A, maldant L, L'Hote B, **Milesi S**, Massot B, Bourgaud F, Guckert A. **1999**. Plant secondary metabolite production: a promising alternative between bioreactor and field. *Congrès national IAPTC&B "Les biotechnologies végétales à l'aube du XXième siècle: bilan et perspectives"*, 8-10 décembre 1999, Nancy, France.

10. **Milesi S**, Massot B, Goegen J-L, Murano E, Toffanin R, Bourgaud F, Gontier E, Guckert A. **1999**. Cell cultures of *Ruta graveolens* for psoralens production. *XXIII Symposium international "Affinity technology and bio-recognition"*, 4-8 juillet 1999, Compiègne, France.

11. Massot B, **Milesi S**, Gontier E, Bourgaud F, Guckert A. **1999**. Furanocoumarins production by shoot cultures of *Ruta graveolens*: effect of medium composition on growth and furanocoumarin content. *XXIII Symposium international "Affinity technology and bio-recognition"*, 4-8 juillet 1999, Compiègne, France.
12. Massot B, **Milesi S**, Gontier E, Bourgaud F, Guckert A. **1998.** Study of furanocoumarin production by Ruta graveolens L.: effect of genotype and differenciation. *Congrès national IAPTC "l'usine cellulaire végétale in vitro"*, 2-4 décembre 1998, Amiens, France.
13. Piutti S, Gontier E, Massot B, **Milesi S**, Bourgaud F, Guckert A. **1998**. Bioreactor shoot culture of Ruta graveolens for psoralen production. *Congrès national IAPTC "l'usine cellulaire végétale in vitro"*, 2-4 décembre 1998, Amiens, France.
14. **Milesi S**, Granger A, Navarini L, Murano E. **1997.** Caratterizzazione di acemmannano da *Aloe vera*. *XIII convegno italiano di Scienza e Tecnologia della macromolecole*, 21-25 Settembre 1997, Genova, Italy.

MEMOIRES

15. **Milesi S. 2001**. Etude de la production de furocoumarines par la Rue officinale (*Ruta graveolens* L.) : cultures de plantes au champ et cultures *in vitro*. Thèse de Doctorat de l'INPL, 152 pages.
16. **Milesi S. 1997**. Caractérisation de l'hydroparenchyme d'*Aloe vera* et de son constituant acemannan, dans diverses conditions de culture. Mémoire DAA et DEA Sciences Agronomiques, 39 pages.

ELSEVIER

Plant Science 161 (2001) 189–199

PLANT SCIENCE

www.elsevier.com/locate/plantsci

Ruta graveolens L.: a promising species for the production of furanocoumarins

S. Milesi, B. Massot, E. Gontier, F. Bourgaud *, A. Guckert

Laboratoire Agronomie et Environnement, ENSAIA-INRA, BP 172, 54505 Vandoeuvre-Les-Nancy, France

Received 13 December 2000; received in revised form 29 March 2001; accepted 29 March 2001

Abstract

Psoralen and its derivatives (linear furanocoumarins) are used in dermatology, and are also very promising in the treatment of other diseases. These secondary metabolites occur naturally in plants. *Ruta chalepensis*, *R. angustifolia*, *R. graveolens* and *R. montana* (Rutaceae) have been studied to evaluate their potential for the production of furanocoumarins (psoralen, xanthotoxin, bergapten, isopimpinellin). The *Ruta* species contained from 4 to 17 mg g^{-1} dry weight (DW) of furanocoumarins (FCs). These concentrations were higher than those found in other families known to produce the same compounds (Moraceae, Apiacae and Fabaceae). Among the four species tested, *R. graveolens* exhibited high concentrations of FCs and the best biomass production. Sixteen different *R. graveolens* origins were cultivated in order to find the best candidate for FC production. Plants contained an average concentration of 10 mg g^{-1} DW of FCs, ranging from 2.8 to 17.5 mg g^{-1} DW, but there was no statistical difference due to origins. FCs allocation was studied within *R. graveolens* in different parts of the plant. Fruits had a greater FCs concentration, five–tenfold higher than roots, stems or leaves. Isopimpinellin, a minor FC in other organs, was highly concentrated in roots, where it reached 25% of the total FCs. Potential yield of FCs is the result of both biomass and secondary metabolite production. These parameters were affected by the phenological stage of plants, with greatest production from fruits, which had the highest concentrations, biomass and therefore yield of FCs. *R. graveolens* plants cultivated in field could possibly produce 12 kg of FCs per hectare, mainly in fruits and leaves. © 2001 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Bergapten; Defence allocation; Furanocoumarins; Phenological stage; Plant; Psoralens; *R. angustifolia* L.; *R. chalenpensis* L.; *R. graveolens* L.; Secondary metabolites

1. Introduction

Plants that induce photosensibilization of human skin have been used for their pigment-stimulating properties in the treatment of vitiligo for a long time. Furanocoumarins (FCs), which naturally occur in plants (Fig. 1), have been shown to be responsible for these photoreactive properties [1]. Actually, photochemotherapy established the therapeutic effectiveness of FCs for the symptomatic treatment of severe vitiligo, psoriasis and mycosis fungoides [2], as FCs photoinduce defined adducts and interstrand crosslinks with DNA [3]. Dermatology uses two FCs: xanthotoxin (8-methoxypsoralen; 8-MOP) and bergapten (5-methoxypsoralen; 5-MOP). However, bergapten seems particularly interesting in that patients showed a higher tolerability, with less secondary effects than xanthotoxin [4].

New opportunities for these linear FCs have been found in neurology: bergapten was shown to be a large selective blocker of axolemmal potassium channels which is the characteristic required for the symptomatic treatment of demyelinating diseases, in particular multiple sclerosis [5].

FCs have been mainly described in four plant families, the Rutaceae, Moraceae, Apiaceae and Fabaceae [6]. In plants, these molecules are phytoalexins against herbivores [7] or pathogens [8,9].

* Corresponding author. Tel.: +33-3-83595864; fax: +33-3-83595799.

E-mail address: frederic.bourgaud@ensaia.inpl-nancy.fr (F. Bourgaud).

0168-9452/01/$ - see front matter © 2001 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.
PII: S0168-9452(01)00413-7

This role is directly related to crosslinks between FCs and DNA, which inhibit the replication of the DNA. They are also allelopathic agents, inhibiting seed germination [10].

The chemical synthesis being rather expensive, FCs are presently extracted from bergamot oil (*Citrus bergamia*). However, the cultivation of the bergamot tree, localized mainly in Calabria (Italy) and the Ivory Coast, is decreasing. This is why new sources for the bio-production of FCs have to be found.

In this work, the genus *Ruta* has been investigated for the production of FCs, with the objective to establish differences between *Ruta* species and to evaluate which is the most interesting. *R. angustifolia*, *R. chalepensis*, *R. graveolens* and *R. montana* were then cultivated to quantify interspecific variability of the production of psoralen, xanthotoxin, bergapten and isopimpinellin (Fig. 1). In a second part, 16 *Ruta graveolens* origins were studied to investigate inter-origin variability of FC production with the objective to find an origin highly rich in FCs. In a third part, FCs were quantified in *Ruta graveolens* organs (fruits, stems, leaves, roots) to determine FCs allocation in the plant and extrapolate a possible field production (per hectare). Compartments corresponding to these organs were also characterized for three phenological stages to determine the best harvesting stage.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and cultivation

2.1.1. Inter-specific studies

Experiments were carried out on four species of the genus *Ruta*, with seeds provided by nine European botanical gardens or companies (Table 1). The numbers of replicates was two for *R. angustifolia L.*, six for *R. chalepensis* L., 19 for *R. graveolens* L., three for *R. montana* L.

Plants, obtained from seeds previously scarified for 5 min in H_2SO_4 95%, were grown in the greenhouse for 60 days (from march to may 1999) before transplantation to the field (La Bouzule-experimental farm-ENSAIA, Champenoux, France). Four leaves were harvested on 6-month old plants to investigate the furanocoumarin (FC) content.

2.1.2. Inter-origin studies

The experiment was carried out on 16 origins of *R. graveolens* species, whose seeds were provided from 11 European botanical gardens or companies (Fig. 3). Eight to 14 plants of each origin were used.

Plants were obtained from seeds previously scarified for 5 min. in H_2SO_4 95%. Plantlets were cultivated in 15 × 15 cm pots, in a growth chamber with monitored conditions: humidity 60%, photoperiod 16:8 (day–night), light 300

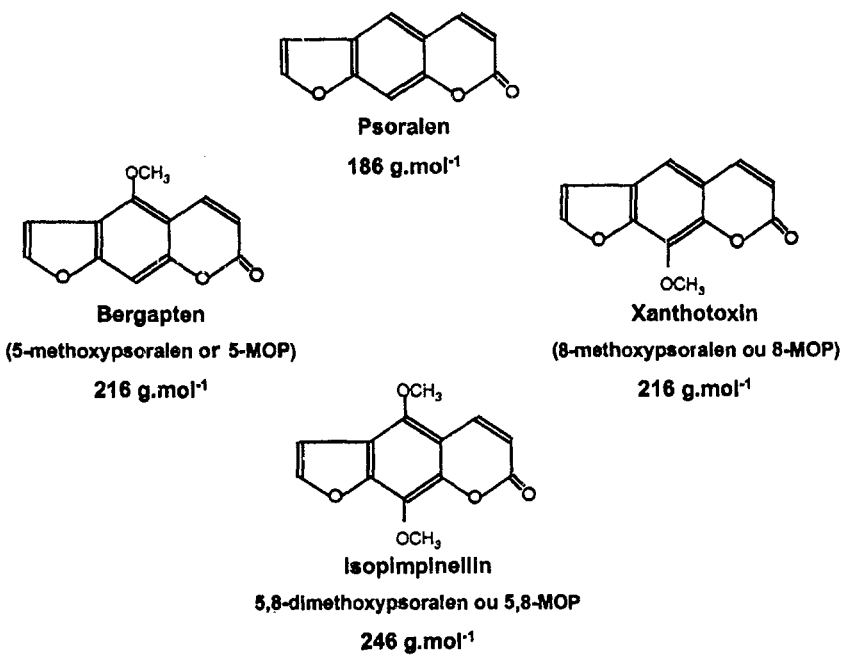


Fig. 1. Chemical structure and molecular weight of the four linear furanocoumarins.

Table 1
Origins of *Ruta*[a] plants, number of replicates and furanocoumarins contents in leaves (mg g^{-1} DW)

Species	Provided by	No of replicates	(total)	Furanocoumarins content in mg g^{-1} dry weight (± standard deviation)					
				Psoralen	Xanthotoxin	Isopimpinellin	Bergapten	Total	$P = 0.000$ Statistical differences
R. angustifolia	1	2	2	7.8 (0.2)	7.2 (0.5)	0.3 (0.0)	1.7 (0.0)	16.9 (0.8)	A
R. chalepensis	2	3	6	1.1 (0.8)	0.1 (0.0)	0.1 (0.2)	2.6 (1.1)	3.9 (1.0)	C
	3	3							
	1	3							
	4	3							
	5	3							
R. graveolens	6	3	19	1.3 (0.7)	1.0 (0.6)	0.1 (0.1)	1.6 (0.5)	4.0 (1.5)	C
	7	1							
	8	3							
	9	3							
R. montana	3	3	3	1.4 (1.4)	4.1 (2.2)	0.7 (0.3)	1.1 (0.5)	7.3 (4.1)	B

[a] *Ruta* plants were provided by: (1) Museum d'Histoire Naturelle, Paris, France; (2) Orto Botanico Dell'Universitá, Siena, Italy; (3) Botanischer Garten und Botaniches Museum, Berlin, Germany; (4) Botanischer Garten der Stadt, Krefeld, Germany; (5) Botanischer Garten der Universität, Leipzig, Germany; (6) Jardin Botanique, Nancy, France; (7) Station Fédérale de Recherches Agronomiques, Changins, Switzerland; (8) Hortus Botanicus, Leuven, Belgium; (9) Botanischer Garten der Universität, Wien, Austria.

μmol.m^{-2}.s^{-1}, temperature 22°C day and 18°C night. The first, fifth, ninth and 13th leaves (from the apex) were harvested on 210-day old plants to characterize the FC production.

2.1.3. Study on R. graveolens organs

Plants were obtained from seeds provided by the Bertrand Frères Company (Orléans, France). Plantlets (sown on soil and grown in greenhouse) were transplanted to field at a density of 15 000 plants per hectare (EARL La Gitinière, Soings-en-Sologne, France). Plants were harvested in April, July, and October 1 year after transplantation.

2.2. Biomass analysis

Leaves harvested for inter-specific and inter-origin studies were frozen and lyophilized. In experiments conducted on *R. graveolens* organs, each organ (roots, stems, leaves, fruits) was separated before drying. Plants were dried at 60°C, and dry weights (DW) were then measured.

2.3. Furanocoumarins analysis

After drying, plant tissues were ground and 20 mg of powder suspended in 1.2 ml of extraction solvent (ethanol 50%) for 30 min. After a 12 000-rpm centrifugation (8 min), the supernatant was filtered though 0.45 μm Millipore® acetate filters and used for HPLC analysis.

FCs analyses (psoralen, xanthotoxin, bergapten and isopimpinellin) were performed with reverse-phase high-performance-liquid-chromatography (HPLC), using a LiChroCART 125-4 HPLC-cartridge column (Merck, Darmstadt, Germany). Two solvents were used to separate the four linear FCs; solvent A was ultrapure water and solvent B was constituted with methanol–acetonitrile 1:1 (Merck, Darmstadt, Germany). The HPLC method used a non-linear gradient of solvents A and B (based on [11]). Starting from 0%, solvent B reached 60% after 30 min, following a convex curve. Psoralen, xanthotoxin, bergapten and isopimpinellin were detected at 300-nm wavelength with a diode-array detector (200–400 nm) as previously described [12].

Psoralen, xanthotoxin, bergapten and isopimpinellin concentrations were calculated with calibration curves, made with standard solutions (Extrasynthese, Lyon, France).

2.4. Statistical analysis

Analyses of variance (ANOVA) were performed using STATBOX software (Grimmer Logiciels, 1997, Paris France) to determine statistical effect of factors. Effects are significant (*) when $P < 0.05$, highly significant (**) when $P < 0.01$ and very highly significant (***) when $P < 0.001$. Differences between mean values were compared by Newman–Keuls' post hoc test ($P < 0.05$).

3. Results and discussion

3.1. Comparison of furanocoumarins production by plants belonging to Ruta genus

Among all the plant material obtained from nine European botanical gardens and firms (45 seed bags from five species), we selected the four *Ruta* species that seemed to be the best material in regard to our preliminary results (not shown). These four species — *R. angustifolia*, *R. chalepensis*, *R. graveolens*, *R. montana* — were compared for their ability to produce linear FCs. Leaf concentrations (Table 1) ranged from 4 to 17 mg g^{-1} DW. Significant higher total FCs concentrations (16.9 mg g^{-1} DW) were detected in *R. angustifolia* when *R. montana*, *R. graveolens and R. chalepensis* leaves contained only 7.3, 4.0 and 3.9 mg g^{-1} DW respectively. The highest psoralen and xanthotoxin levels were also measured in *R. angustifolia* leaves (with respectively 7.8 and 7.2 mg g^{-1} DW) but isopimpinellin (0.7 mg g^{-1} DW) and bergapten (2.6 mg g^{-1} DW) leaf concentrations were higher in *R. montana* leaves and *R. chalepensis*, respectively (Table 1).

The proportion of the different FCs differed considerably in the four *Ruta* species (Fig. 2). *R. angustifolia* produced mainly psoralen (46%) and xanthotoxin (43%). *R. chalepensis* contained a large proportion of bergapten (67%). *R. graveolens* had a more similar proportion of bergapten (43%), psoralen (31%) and xanthotoxin (23%), whereas *R. montana* produced mainly xanthotoxin (58%). Small quantities of isopimpinellin were present in the leaves of the four species.

The four sp. are shrub and perennial plants. *R. montana* and *R. angustifolia* contained most FCs. However, it was difficult to germinate *R. montana* and *R. angustifolia* seeds. This inhibition could be

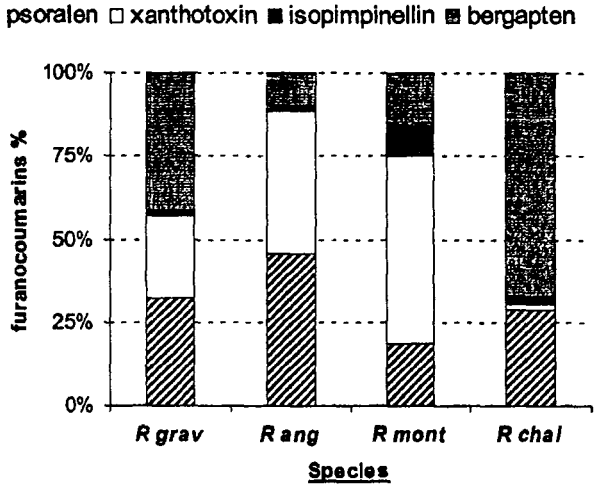


Fig. 2. Proportion of the four linear furanocoumarins in leaves of *Ruta* plants. R grav = *R. graveolens*, R ang = *R. angustifolia*, R mont = *R. montana*, R chal = *R. chalepensis*.

due to the high FCs concentrations, as Baskin and co-workers (1967) showed that FCs inhibit germination. Moreover, *R. montana* and *R. angustifolia* grew slowly during the 6 months of cultivation and remained very small, not exceeding 10–15 cm height. In contrast, *R. graveolens* and *R. chalepensis* produced high quantities of biomass and plants height exceeded 70–80 cm. Moreover, *R. chalepensis* was very easily damaged by frost in our cultivation conditions, and all plants died after the following winter. *R. graveolens* appeared to be well adapted to the semi-continental climate of our experimental fields (Nancy, France).

Compared to other genera of the family Rutaceae, plants from the genus *Ruta* are very good candidates for the bio-production of linear FCs to replace the declining *Citrus bergamia*. Bergapten concentration in bergamot oil is around 3 mg g^{-1} of essential oil [6]. Due to this low concentration, the cultivation of the bergamot tree is not suitable for the production of FCs per se.

In the Rutaceae family, linear FCs have already been detected in the genus *Citrus*, *Thamnosma*, *Xanthoxylum* or *Evodia* [13–15]. Zobel and Brown quantified psoralen, xanthotoxin and bergapten in fruits of *Evodia danielli*, in respective concentrations of 0.01/0.4/0.5 mg g^{-1} DW [15]. These concentrations are two–100-fold lower than those detected in leaves of *Ruta* plants.

Compared to the three other main families also producing FCs (Moraceae, Fabaceae, Apiaceae), *Ruta* plants contain high concentrations of FCs. Isopimpinellin has not been detected in the Moraceae [16] and among this family, xanthotoxin was only evidenced in *Ficus carica* L. leaves [13]. In this family, the highest concentration of bergapten and psoralen was found in *Ficus carica*, respectively 6 and 4 mg g^{-1} DW. These concentrations are similar or slightly higher than those measured in *Ruta* genus (depending on species). In the case of *Psoralea* plants belonging to the Fabaceae family [11], psoralen was the only linear FC with a concentration ranging from 0.1 to 1 mg g^{-1} DW.

The most studied family is undoubtedly Apiaceae, with more than 19 genus investigated for the production of linear FCs [13,17,18]. Psoralen, bergapten, xanthotoxin and isopimpinellin are present in almost all species. The highest concentrations of FCs were detected in *Heracleum mantegazzianum*, with about 4 mg g^{-1} DW for each linear FCs [19]. Again, these concentrations are comparable or slightly higher than those measured in *Ruta* species.

In conclusion, the concentrations of FCs in *Ruta* plants were comparable to those in other families. It also produced large amounts of biomass with a high FCs concentration (4 mg g^{-1} DW). *Ruta* plants are shrub and perennial: this is an advantage in term of growth rate compared to *Citrus bergamia* or *Ficus carica* trees. *R. graveolens* can then be considered as the best possible candidate, in semi-continental climate, compared to other *Ruta* species, because this species exhibited a good cold-resistance.

3.2. Inter-origin variability of furanocoumarins production in R. graveolens

In order to select the best source of material for furanocoumarins (FCs) production, inter-origin variability of *R. graveolens* was studied, by comparing 16 origins of *R. graveolens*. Eight to 15 plants (= replicates) of each origin were analyzed to determine the range and differences in FCs concentration.

Fig. 3 shows total FCs concentration in leaves of the 16 origins. There were no significant differences between the 16 origins. *R. graveolens* produced an average of 10 mg g^{-1} DW of FCs in the growth chamber (mean of 175 plants). Concentrations measured for all plants ranged from 2.8 to 17.5 mg g^{-1} DW of FCs. The comparison of all

origins showed that the lowest concentration was 8.0 mg g^{-1} DW, in origin C, and the highest was 11.5 mg g^{-1} DW, in origin M (Fig. 3).

Total variance (V), quantified for all plants and whatever the origin, was expressed as the sum of intra-origin variance (W = within-variance) and inter-origin variance (B = between-variance):

$$V = W + B.$$

$$W = (1/n).\sum(n_k.V_k)$$

and

$$B = (1/n).\sum(n_k.(M_k - M)^2) \quad (1)$$

where, n = total number of plants;
$k \in$ [Origin A, Origin B, ..., Origin P];
n_k, number of plants in the origin k;
V_k, variance among plants of the origin k;
M_k, mean among plants of the origin k; and
M, general mean.

In *R. graveolens*, FCs concentration variability was higher within the origins — 78% of total variance — than between them: 22% of the total variance. As a consequence, no high potential origin could emerge.

Within *R. graveolens* leaves, percentages of psoralen, xanthotoxin, isopimpinellin and bergapten were respectively 18, 43, 11 and 27% (data not shown). This profile was fairly constant for all the origins except for four: the best candidate for producing bergapten was the origin F (3.7 mg g^{-1} DW of bergapten). The most interesting origins for psoralen, xanthotoxin and isopimpinellin were respectively, origin O (2.7 mg g^{-1} DW), origin M (5.2 mg g^{-1} DW) and origin J (1.4 mg g^{-1} DW), based on statistical analysis.

R. graveolens FCs concentrations were 2.5 fold higher in this experiment (Fig. 3) compared to the previous inter-specific (Table 1). In inter-origin studies, *R. graveolens* plants were cultivated in the growth chamber, whereas plants of *Ruta* sp. were grown outdoors. Such variations in FC concentrations have been observed by [20] with *R. chalepensis* plants: FC concentrations were higher in greenhouse-grown plants than in outdoor plants. The physiological explanation remains unknown.

In inter-origin studies, *R. graveolens* plants grown in the growth chamber were cultivated in 15 × 15 cm pots. As a consequence, their development was limited: these plants did not exceed 20-cm height, whereas plants grown outdoors, in inter-specific studies, were higher than 80-cm. There could be a dilution of metabolites (lower concentrations in tissues) when plants are more developed.

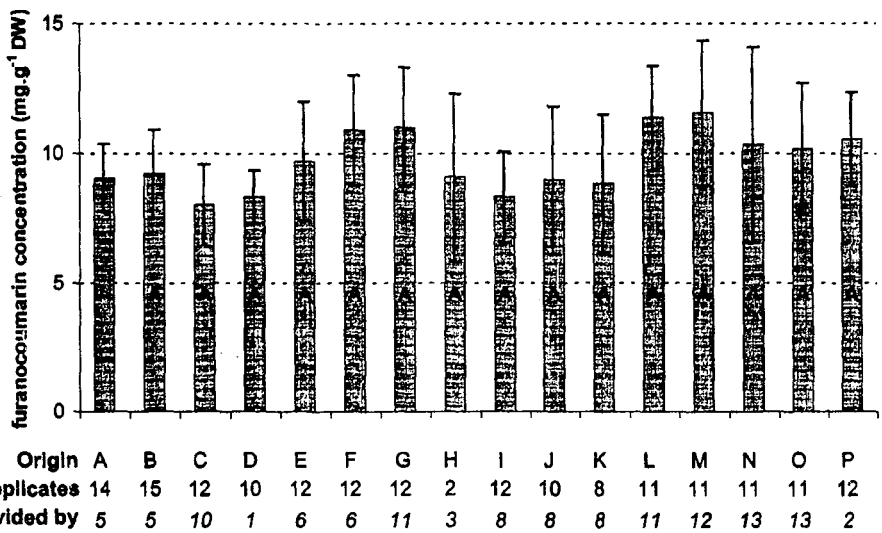


Fig. 3. *R. graveolens* origins, number of replicates and furanocoumarin concentration in leavse (mg g^{-1} DW). $P = 0.000$***. Bars represent standard deviations. R. graveolens origins were provided by: (1) Museum d'Histoire Naturelle, Paris, France; (2) Orto Botanico Dell'Università, Siena, Italy; (3) Botanischer Garten und Botaniches Museum, Berlin, Germany; (5) Botanischer Garten der Universität, Leipzig, Germany; (6) Jardin Botanique, Nancy, France; (8) Hortus Botanicus, Leuven, Belgium; (9) Botanischer Garten der Universität, Wien, Austria; (10) CNPPMAI, Milly-La-Forêt, France; (11) Mr Lemoine, EARL La Gitinière, Soings-en-Sologne, France; (12) Hortus Botanicus of Instituti Oecologici et Botanic Academiae Scientiarum Hungarica, Vacratot, Hungary; (13) Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Germany.

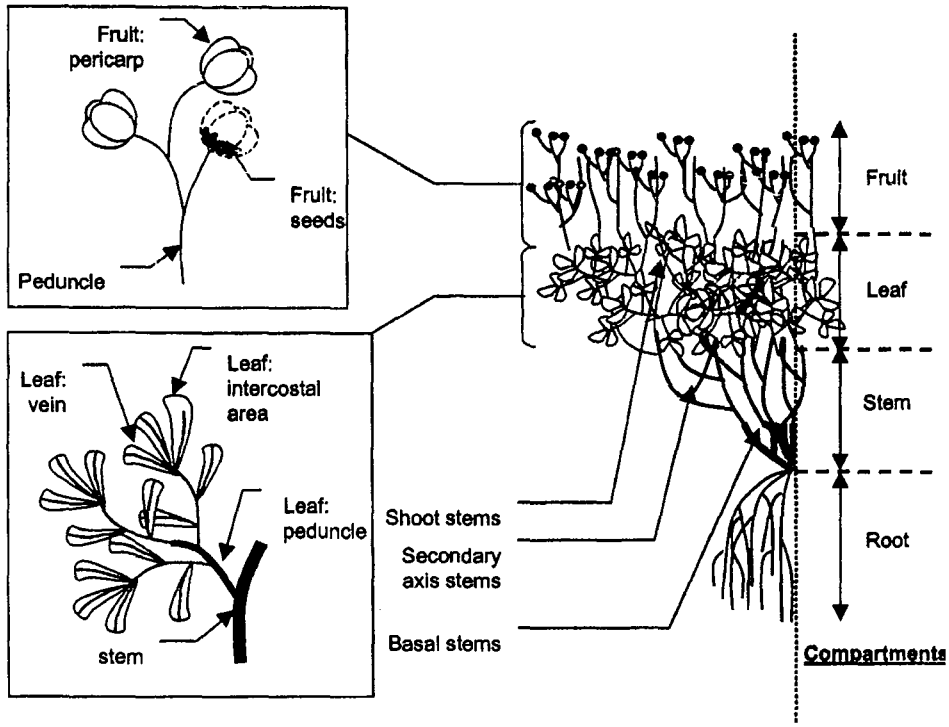


Fig. 4. Schemes of *R. graveolens* L. compartments and microdissections of organs.

Studies of *R. graveolens* conducted within an origin revealed variability in FCs concentrations for plants cultivated in identical and controlled conditions. These results suggest that variability is dependent on genotypic effects. This variability is higher within an origin than between all origins. This means that one origin does not contain homogeneous plants. This heterogeneity could allow a genetic improvement of *R. graveolens* for the production of FCs, if the heritability of FCs synthesis could be demonstrated.

3.3. Allocation of furanocoumarins in R. graveolens organs

The establishment of *R. graveolens* cultivation for FCs production depends upon information on the localization of these molecules inside the plant. Firstly, leaves, fruits and stems were dissected to determine FC concentrations in specific tissues of these organs. Secondly, in order to mimic a possible harvest cutting, *R. graveolens* plants were also separated in four compartments (Fig. 4), containing the four organs: fruits, leaves, stems and roots. FCs and biomass were analyzed in these four compartments, for three phenological stages: end of vegetative stage (April), fructification stage (July) and stage after fruit shedding (October).

3.3.1. Furanocoumarin concentrations in R. graveolens tissues

Fruits, leaves and stems were separated by micro dissection to show where FCs occur in these organs (Fig. 4).

- Fruit compartments, consisting in **(1) peduncles**, supporting the fruits, **(2) pericarp** and **(3) seeds**, were harvested during fruit growth (Fig. 4). Statistical analysis showed that pericarp contained larger FCs concentration (15 mg g^{-1} DW) than peduncles (1 mg g^{-1} DW) and seeds (0.2 mg g^{-1} DW). Major FCs concentration found in pericarps is probably related to allelopathic, antiherbivore and antimicrobial effects of FCs [7,9,10].
- The foliage consists of **(1) leaves** and **(2) stems** supporting leaves (Fig. 4). FCs concentration was higher in leaves (3.6 mg g^{-1} DW) than in stems (2 mg g^{-1} DW).
- Separation of tissues in the leaf showed that FCs concentration was higher in veins (7.1 mg g^{-1} DW) than in peduncle (5.8) and intercostal areas (5.3). Methyl-transferase and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) occur in veins [21–25]. These enzymes catalyze many steps in the biosynthetic pathway of FCs [26]. Their presence in veins could explain why FCs are detected in higher quantities there.

- Three kinds of stems could be separated in the plant: **(1) 'shoot stems'**, **(2) 'basal stems'** and **(3) 'secondary axis stems'** (Fig. 4). 'Shoot stems' are stems supporting leaves and are localized in the leaf compartment. 'Basal stems' are highly lignified stems in the first 5 cm on the bottom of the plant near the roots. 'Secondary axis stems' are localized between 'shoot stems' and 'basal stems', and do not support leaves.
- 'Shoot stems' FCs content (2.4 mg g^{-1} DW) is higher than 'basal stems' (1.2) and 'secondary axis stems' (0.7). 'Shoot stems' are closer to leaves than 'secondary axis stems' and 'basal stems'. 'Basal stems' and 'secondary axis stems', which are more lignified, contain a lot of dead tissues and are not highly concentrated in FCs.

The harvesting of just fruit pericarps or leaf veins cannot be performed for industrial cultivation of *R. graveolens* for FCs bio-production. At the field level, it is necessary to compare the most interesting plant compartments to harvest.

3.3.2. Furanocoumarins production in different compartments of plant

The morphology of *R. graveolens* led us to separate the plant in four horizontal compartments: root, stem, leaf and fruit compartments (Fig. 4).

In order to cultivate *R. graveolens* for furanocoumarins (FCs) production, biomasses and FCs quantities produced by each compartment need to be evaluated. The organs for harvesting determined the height of cutting.

The four compartments (root, stem, leaf, fruit) were studied on 16 plants (= 16 replicates), harvested in July during fructification stage. At this stage of harvesting, all organs are present in the plant.

Biomass production of the four compartments is described in Fig. 5a. Stem, leaf and fruit compartments produced a significantly higher amount of dry biomass per plant (69–85 g $plant^{-1}$), compared to root (38 g $plant^{-1}$).

Fig. 5b represents FCs concentration in the four compartments. Fruits showed a significantly higher concentration (8.2 mg g^{-1} DW of FCs). This concentration was, on the average, five–tenfold higher than that in the root, stem and leaf compartments (respectively, 1.6, 0.8 and 2.0 mg g^{-1} DW of FCs).

Fig. 6 represents the relative proportion of psoralen, xanthotoxin, isopimpinellin and bergapten in

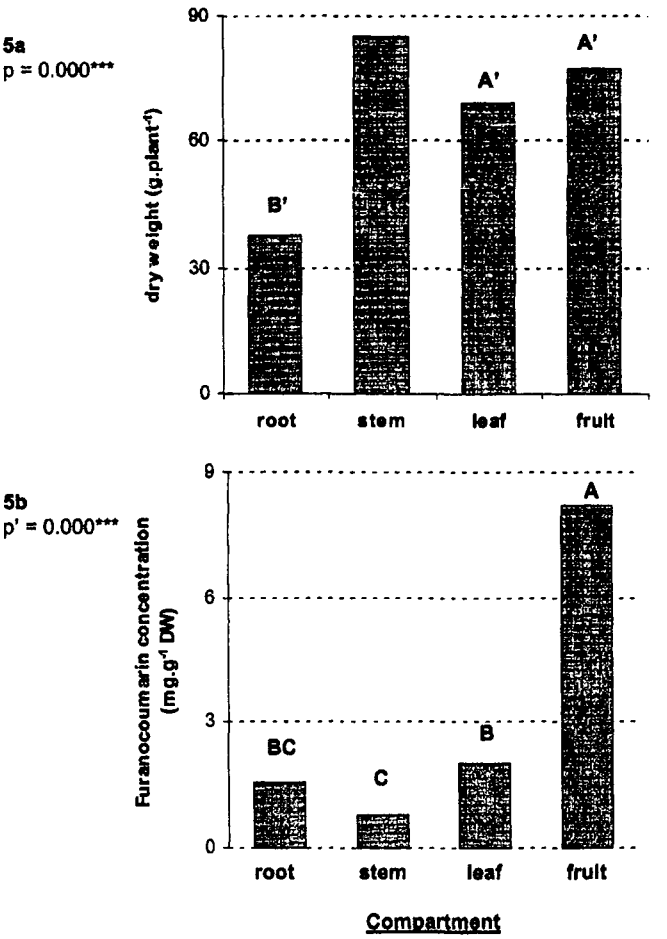


Fig. 5. Dry weight (a) and furanocoumarin concentration (b) in roots, stems, leaves, fruits of *R. graveolens* plants. 16 different plants were analyzed as replicates.

roots, stems, leaves and fruits. In all compartments, FCs were mainly represented by bergapten (more than 50% for stem, leaf and fruit compartments). Xanthotoxin was the second most represented linear FC (more than 25%) in leaf, fruit or stem

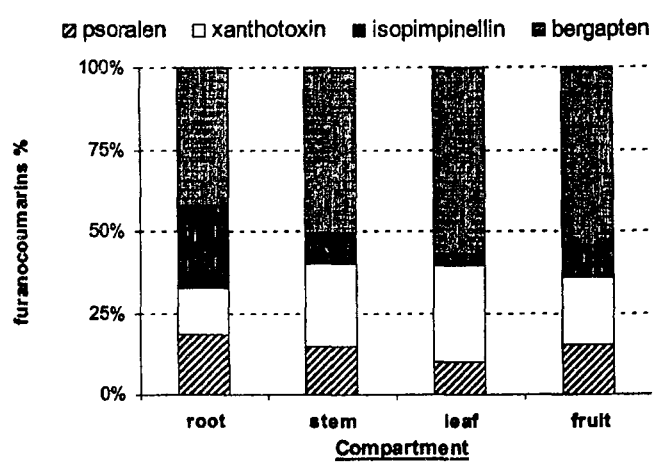


Fig. 6. Proportion of the four linear furanocoumarins in roots, stems, leaves, fruits.

compartments. Psoralen represented 10–15% and isopimpinellin 5–10%. Roots showed a different profile as compared to the leaf, fruit or stem compartments. Isopimpinellin in roots reached 25% of linear FCs measured. Psoralen and xanthotoxin represented, 15–20% of the four FCs considered.

Results have shown that *R. graveolens* roots produced a higher percentage of isopimpinellin compared with other organs exposed to daylight. This linear FC is not photobiologically active [27] and was shown to be enhanced by the reduction of UV light in *Pastinaca sativa* L. plants [28]. Isopimpinellin is however responsible for mutations and cell death, based on physiological effects independent of photoaddition to DNA [29]. The increased concentration of isopimpinellin in roots leads to the maintainance of the toxicological efficacy in shaded environments. The second main observation was that the fruit compartment showed high concentrations of FCs. These molecules are well known to be involved in plant defence against herbivores or pathogens [29]. The allocation of FCs in the *R. graveolens* plant can be related to the optimal defence theory [30] that makes specific predictions about patterns of chemical defence. This theory assumes that the production of phytoalexins represents a cost for the plant. Therefore the areas the most protected are those for which a loss would induce a serious decrease of the plant fitness and concomitantly those for which the probability to be attacked is high. This theory predicts that such critical areas would benefit from constitutive defences while areas less attacked would have inducible ones [30].

The distribution of FCs in reproductive parts of plants agrees with these hypotheses. Seeds and fruits are rewarding targets for herbivores as rich nutrients and provisions are allocated to the plant embryo for its successful seedling establishment [31]. In *R. graveolens* plants, FCs are allocated preferentially to reproductive parts: 8 mg g^{-1} DW in the fruit compartment. Leaves, stems or roots were less protected by FCs (2, 0.8, 1.6 mg g^{-1} DW, respectively).

The consequence of this allocation of FCs in *R. graveolens* plants is that 70% of FCs synthesized by the plant are stored within fruits, while fruit biomass represents only 25% of the total plant biomass. Harvesting of only fruits and leaves will lead to the collection of 80% of the FCs produced by the *Ruta* plant. Stems and roots are not harvested because they will produce fruits and leaves for the following harvesting.

3.4. Furanocoumarin production versus phenological stages

The stage of development could influence the harvesting date of *Ruta* plants, as furanocoumarins (FCs) concentrations could be modified by phenological stages. Plants at three phenological stages were investigated for FCs production. One group of *R. graveolens* plants was harvested in April at the end of the vegetative stage (Stage I, 16 replicates). A second group was harvested in July during the stage of fructification (Stage II, 16 replicates). A third group of plants was harvested in October after the fall of fruits, at the beginning of winter (Stage III, six replicates). Dry weight, FCs concentration and total quantity of FCs were studied at the three stages.

Whatever the parameter studied, DW, concentration or quantity of FCs, plants harvested during the fructification stage had means significantly higher than those of plants harvested at the vegetative or senescence stages (Fig. 7, ANOVA $P = 0.000$***). Lowest means were obtained for plants harvested at the end of vegetative stage, in April.

Fig. 7a shows the total DW of plants with the contribution of the four compartments (root, stem, leaf, fruit). Plants harvested in April (end of vegetative stage) weighed 111 g DW per plant. Plants harvested in July (fructification stage) and in October (senescence stage) weighed significantly more than April plants: respectively, 269 and 200 g DW per plant. Dry biomass of root and leaf compartments increased from April to October, while stem biomass was significantly higher in July.

Plants harvested in July (fructification stage) produced 3.4 mg FCs g^{-1} DW (Fig. 7b), which was 1.3 and 1.9 fold higher than the concentrations in plants harvested in October and April, respectively (vegetative stages).

Fig. 7c shows the total FCs amount with the contribution of the four compartments. Allocation of FCs was quite different compared to biomass. Plants harvested during fructification (Stage II), stored more than 70% of FCs in the fruits. Actually, the fruit compartment, storing about 650 mg (mean value), contained ten fold more FCs than the root and stem compartments (60 and 67 mg respectively). The leaf compartment stored about 140 mg

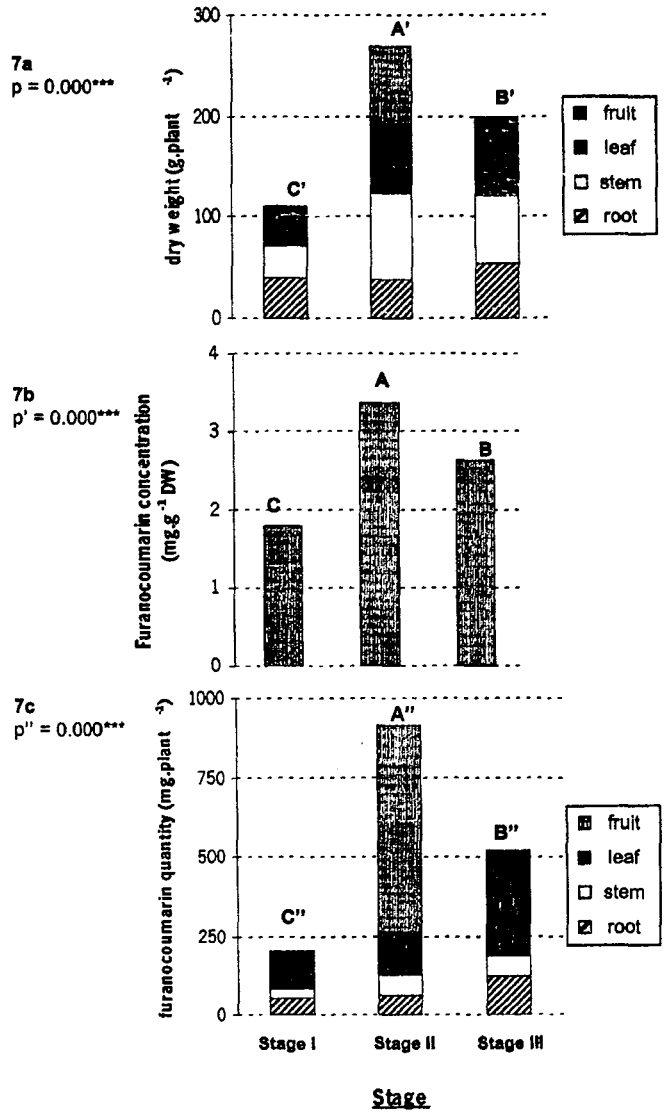


Fig. 7. Dry weight (a), furanocoumarin concentration (b) and quantity of furanocoumarins (c) produced in the plant, versus phenological stage. Contribution of organs in dry weight and quantity of furanocoumarins produced. *Stage I* (April — end of vegetative stage), *Stage II* (July — fructification stage), *Stage III* (October — stage after fall of fruits). Furanocoumarins concentration of the plant was calculated as the ratio: dry weight of the plant/total quantity of furanocoumarins.

of FCs, which was significantly higher than the root and stem, but lower than the fruit compartment.

In April and October, FCs were mainly localized in leaves (more than 60%). Roots and leaves were significantly richer in FCs in the most advanced phenological stage (Stage III) (respectively 2.3 and 4.3 mg g^{-1} DW, data not shown), while the stem compartment did not show any differences between the three phenological stages (about 1 mg g^{-1} DW). The leaf compartment showed a deficit in FCs during the fructification stage (2 mg g^{-1} DW) corresponding to the presence of fruits (data not shown).

Biomass and secondary metabolite production were strongly affected by the phenological stage of the plant. Resources were mainly allocated to the reproductive parts, as seen above, and so determine the date of harvesting (corresponding to the fructification stage).

4. Conclusions

These investigations on *Ruta* plants showed that *R. graveolens* is a good candidate for the bio-production of furanocoumarins considering the level of production and resistance to cold. Genetic improvement of *R. graveolens* plants and agronomic studies will lead to an enhanced FCs production.

Studies of field-grown plants showed that FCs storage is closely related to organs and phenological stages. Leaves, stems, roots and fruits do not have equal concentrations of FCs even if psoralen, xanthotoxin, bergapten and isopimpinellin were detected in all tissues. Fruits are highly concentrated in FCs (8 mg g^{-1} DW) and roots showed a larger amount of isopimpinellin (25% of total FCs). *R. graveolens* plants harvested during the fructification stage, produced a high amount of biomass and FCs. This is related to the presence of highly developed reproductive parts. Extrapolation of our results shows that the harvest of fruits and leaves could produce 2 tons of dry biomass and 12 kg of FCs per hectare, in our conditions (15 000 plants ha^{-1}, 2-year old plants, July). Yields of xanthotoxin and bergapten, both FCs of high pharmaceutical interest, would be 2.6 and 6.5 kg ha^{-1}, respectively.

On the basis of the present results, the effects of density, fertilization or cutting can now be efficiently studied as agronomic factors. More investigations will need to be conducted on biosynthesis sites and translocation of FCs in the plant.

Acknowledgements

This work was supported by a grant of the French Ministry of National Education, Research and Technology (MENRT) and by the Lorraine Region.

References

[1] K. Lagey, L. Duinslaeger, A. Vanderkelen, Burns induced by plants, Burns 21 (7) (1995) 542–543.

[2] E.J. Yurkow, J.D. Laskin, Mechanism of action of psoralens: isobologram analysis reveals that ultraviolet light potentiation of psoralen action is not additive but synergistic, Toxicology 65 (1-2) (1990) 33–47.

[3] F. Bordin, F. Carlassare, L. Busulini, F. Baccichetti, Furocoumarin sensitization induces DNA-protein cross-links, Photochem. Photobiol. 58 (1) (1993) 133–136.

[4] M. Berg, A.M. Ros, Treatment of psoriasis with psoralens and UVA. A double-blind comparison of 8-MOP and 5-MOP, Life Sci. 53 (22) (1993) 355–358.

[5] K.H. Bohuslavizki, W. Hansel, A. Kneip, E. Koppenhofer, E. Niemoller, K. Sanmann, Mode of action of psoralens, benzofurans, acridinons, and coumarins on the ionic currents in intact myelinated nerve fibres and its significance in demyelinating diseases, Eur. J. Pharmacol. 46 (4) (1994) 375–377.

[6] F. Bourgaud, N. Allard, A. Guckert, P. Forlot, Natural sources of furocoumarins (psoralens), in: T.B. Fitzpatrick, P. Forlot, M.A. Pathak, F.J. Urbach (Eds.), Psoralens: past, present and future of photochemoprotection and others biological activities, Libbey Eurotext, Paris, France, 1989, pp. 219–230.

[7] M.M. Diawara, J.T. Trumble, K.K. White, W.G. Carson, L.A. Martinez, Toxicity of linear furocoumarins to Spodoptera exigua: evidence for antagonistic interactions, J. Chem. Ecol. 19 (11) (1993) 2473–2484.

[8] W.L. Fowlks, D.G. Griffith, E.L. Oginski, Photosensitization of bacteria by furocoumarins and related compounds, Nature 181 (1958) 571–572.

[9] G.H.N. Towers, Comparative anti-bacteriophage activity of naturally occuring photosensitizers, Planta Med. 53 (1987) 536–539.

[10] J.M. Baskin, C.J. Ludlow, T.M. Harris, F.T. Wolf, Psoralen, an inhibitor in the seeds of Psoralea subacaulis (Leguminosae), Phytochemistry 6 (1967) 1209–1213.

[11] F. Bourgaud, A. Poutaraud, A. Guckert, Extraction of coumarins from plant material (Leguminosae), Phytochem. Anal. 5 (1994) 127–132.

[12] F. Bourgaud, C. Nguyen, A. Guckert, Psoralea species: in vitro culture and production of furanocoumarins and other secondary metabolites, in: Y.P.S. Bajaj (Ed.), Medicinal and aromatic plants, vol. VIII, Springer Verlag, Berlin, 1995, pp. 388–411.

[13] M.A. Pathak, D. Farrington, T.B. Fitzpatrick, The presently known distribution of furocoumarins (psoralens) in plants, J. Investig. Dermatol. 39 (1962) 225–299.

[14] G.N. Saqib, Y.-H. Hui, J.E. Anderson, J.L. McLaughin, Bioactive furanocoumarins from the Berries of Zanthoxylum americanum, Phytother. Res. 4 (6) (1990) 216–219.

[15] A.M. Zobel, S.A. Brown, Psoralen on the surface of seeds of Rutaceae and fruits of Umbelliferae and Leguminosae, Can. J. Botany 69 (1991) 485–488.

[16] L.A. Swain, K.R. Downum, Biologically active furanocoumarins of the Moraceae, In: P. Hedin (ed.), Naturally-occuring pest bioregulatores, 1991, ACS Symposium Series No. 449 ACS, Washington, DC. Chap. 25. Pp. 361–370.

[17] O. Ceska, S.K. Chaudhary, P.J. Warrington, M.J. Ashwood-Smith, Photoactive furocoumarins in fruits of some umbellifers, Phytochemistry 26 (1) (1987) 165–169.

[18] T. Masuda, M. Takasugi, M. Anetai, Psoralen and other linear furanocoumarins as phytoalexins in *Glehnia littoralis*, Phytochemistry 47 (1) (1998) 13–16.

[19] E. Pira, C. Romano, F. Sulotto, I. Pavan, E. Monaco, Heracleum mantegazzianum growth phases and furocoumarin content, Contact Dermat. 21 (1989) 300–303.

[20] A.M. Zobel, Psoralen in senescing leaves of *Ruta graveolens*, J. Chem. Ecol. 17 (9) (1991) 1801–1810.

[21] E. Jaeck, F. Martz, V. Stiefel, B. Fritig, M. Legrand, Expression of class I O-methyltransferase in healthy and TMV-infected tobacco, Mol. Plant Microbe Interact. 9 (8) (1996) 681–688.

[22] F. Martz, S. Maury, G. Pincon, M. Legrand, cDNA cloning, substrate specificity and expression study of tobacco caffeoyl-CoA 3-*O*-methyltransferase, a lignin biosynthetic enzyme, Plant Mol Biol 36 (3) (1998) 427–437.

[23] Y. Osakabe, K. Nanto, H. Kitamura, S. Kawai, Y. Kondo, T. Fujii, K. Takabe, Y. Katayama, N. Morohoshi, Immunocytochemical localization of phenylalanine ammonia-lyase in tissues of *Populus kitakamiensis*, Planta 200 (1) (1996) 13–19.

[24] R. Subramaniam, S. Reinold, E.K. Molitor, C.J. Douglas, Structure, inheritance, and expression of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *Populus deltoids*) phenylalanine ammonia-lyase genes, Plant Physiol. 102 (1) (1993) 71–83.

[25] Z.H. Ye, J.E. Varner, Differential expression of two O-methyltransferases in lignin biosynthesis in Zinnia elegans, Plant Physiol. 108 (2) (1995) 459–467.

[26] M.A. Schuler, Plant cytochrome P450 monooxygenases. Crit. Rev. Plant Sci. 15 (3) (1996) 235–284.

[27] G.W. Ivie, R.C. Beier, Isopimpinellin is not phototoxic in a chick skin assay, Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 11 (3) (1995) 131–133.

[28] A.R. Zangerl, M. Berenbaum, Furanocoumarins in wild parsnip: effects of photosynthetically active radiation, ultraviolet light, and nutrients, Ecology 68 (3) (1987) 516–520.

[29] RDH Murray, J Mendez, S.A. Brown, The Natural Coumarins: Occurrence Chemistry and Biochemistry, John Wiley and Sons, Chichester, 1982.

[30] D. McKey, The distribution of secondary compounds within plants, in: G.A. Rosenthal, D.H. Janzn (Eds.), Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites, Academic Press, New York, 1979, pp. 56–133.

[31] A.R. Zangerl, J.K. Nitao, Optimal defence, kin conflict and the distribution of furanocoumarins among offspring of wild parsnip, Evol. Ecol. 12 (1998) 443–457.

001006

IJBC 5(4): 281 - 296.

IJBC, 2000, Vol. 5(1), pp. 1-16
Reprints available directly from the publisher
Photocopying permitted by license only

© 2000 OPA (Overseas Publishers Association)
Amsterdam N.V. Published by license under
the Harwood Academic Publishers imprint,
part of the Gordon and Breach Publishing Group.
Printed in Malaysia

Ruta Graveolens Cell Cultures for Psoralens Production: ~~*Culturdin*~~ *Bioreactor, Effect of Elicitation and Calcium-Alginateimmobilization*

S. MILESI[a*], B. MASSOT[a], S. PIUTTI[a], JL. GOERGEN[b], E. MURANO[c], R. TOFFANIN[d], F. BOURGAUD[a*], E. GONTIER[a] and A. GUCKERT[a]

[a]*Laboratoire Agronomie et Environnement, ENSAIA-INRA, BP 172, 54 505 Vandoeuvre-Lès-Nancy, FRANCE. e-mail: Sandrine,* [b]*Laboratoire des sciences du génie chimique, INPL-CNRS, BP 172, 54505 Vandoeuvre, France,* [c]*POLYtech, AREA Science Park, Padriciano 99, 34 012 Trieste, ITALY and* [d]*Protos research Institute, PO box 972, 34 100 Trieste, ITALY*

(In final form March 25, 2000)

Psoralen and its derivatives are used in dermatology for the treatment of skin diseases such as vitiligo and psoriasis. Such molecules are also very promising in the symptomatic treatment of multiple sclerosis. These secondary metabolites are naturally occurring in plants and *Ruta graveolens* L. (*Rutaceae*) produces them in relatively large amounts. As a consequence, *Ruta* cell suspensions have been established either in 250 mL Erlenmeyer flasks or in 2.5 L bioreactor, and furanocoumarins were detected as intracellular compounds (70–400 $\mu g.g^{-1}$). *Verticillium dahliae* homogenate was tested as biotic elicitor on *Ruta* cell cultures. Intracellular and extracellular furanocoumarin levels were drastically enhanced and total quantities per flask reached 18 fold those of the control. Effects of calcium alginate immobilization have also been tested on cell behavior and psoralens production. Cell viability is preserved within the alginate beads. H^1 NMR imaging has been used as a new non-invasive tool to study cell growth inside the beads. Immobilization induced a furanocoumarin release in the medium (1960 ± 870 µg.L-1). Immobilization also modified furanocoumarin biosynthetic pathway as suspended cell contained 95% of bergapten while immobilized cells produced about 50–50% bergapten-isopimpinellin.

Keywords: Ruta graveolens; cell suspension; elicitation; immobilization; H^1 NMR imaging; furanocoumarins; secondary metabolites production

* Corresponding author: Milesi@ensaia.inpl-nancy.fr

161

INTRODUCTION

Since historical period, photosensitizing plants have been used for their pigment-stimulating properties in the treatment of vitiligo. Furanocoumarins, also called psoralens, naturally occurring in these plants, have been shown to be responsible for these photoreactive properties, [1, 2, 3].

Furanocoumarins studied in this paper are psoralen, 8-methoxypsoralen (8-MOP) also called xanthotoxin, 5-methoxypsoralen (5-MOP) known as bergapten and 5,8-dimethoxypsoralen (5,8-MOP) called isopimpinellin.

Photochemotherapy and photomedicine established the therapeutic effectiveness of furanocoumarins PUVA therapy (psoralens + UVA) for the symptomatic treatment of severe psoriasis, mycosis fungoides, [4], since psoralens photoinduce defined adducts and interstrand crosslinks with DNA [5, 6, 7, 8]. PUVA therapy uses xanthotoxin (8-MOP) or bergapten (5-MOP). However, 5-MOP seems particularly interesting in that patients showed a higher tolerability (less secondary effects than 8-MOP) [9, 10, 11, 12].

New opportunities for these linear furanocoumarins have been found in neurology; Bergapten (5-MOP) was shown to be a large selective blocker of axolemmal potassium channels which is the characteristic required for the symptomatic treatment of demyelinating diseases, in particular multiple sclerosis [13]. Moreover, the pathogenesis of seasonal affective disorders, attributed to abnormal melatonin metabolism could find a treatment in the use of furanocoumarins [14]. Actually, bergapten stimulates the secretion of melatonin, known to plays an important role in circadian rhythm regulation [15, 16].

During the last 50 years, furanocoumarins have been mainly described in four plant families that are *Rutaceae, Moraceae, Apiaceae* and *Leguminosae* [17].

In the present paper, one *species, Ruta graveolens* from *Rutaceae* family, has been investigated for the production of furanocoumarins. Cell suspensions of *Ruta graveolens* have been established in order to evaluate growth and furanocoumarins production. In a first part, *Ruta* cell cultures have been studied in 2,5 L bioreactor. Then, in order to improve furanocoumarin production, *Ruta* cells have been treated with biotic elicitor. The effects of calcium alginate immobilization has also been investigated in terms of growth and secondary metabolism. H^1-NMR microimaging was tested in order to investigate the behavior of *Ruta* cells within calcium alginate beads.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Ruta graveolens plants were obtained from seeds, provided by Bertrand frères company (Orléans, France).

Callus have been established from leaves of entire plant as previously described [18].

In vitro cell culture

Ruta cell suspensions have been established from callus [18]. Cultures were performed in Gamborg's B_5 medium supplemented with 2,4 D 2 $mg.L^{-1}$and sucrose 30 $g.L^{-1}$, in 250 mL Erlenmeyer flasks or 2,5 L Biostat bioreactor.

In Biostat bioreactor, following parameters have been monitored: Temperature 27°C (+/- 1), oxygen saturation 45%, agitation 65 rpm. In 250 mL Erlenmeyer flask, monitoring consisted in: temperature 26°C and agitation on orbitary shaker at 100 rpm.

Sugars were quantified in culture medium with Boerhinger enzymatic kits (Boehringer Mannheim ref. 716260).

Elicitation

The elicitor agents for *Ruta* cultures were *Verticillium dahliae* homogenates prepared as follow. V. *dahliae* was cultivated on semi-solid PDA medium, for 6 days (elicitor 1 = E1) or 30 days (elicitor 2 = E2). After cultivation, *V. dahliae* mycelia were lyophilized for 24 hours. These homogenates were added to *Ruta* cell culture medium before autoclaving (10 mg of V. *dahliae* homogenate in 100 mL of plant culture medium). After autoclaving, the elicitor containing medium was inoculated with 7 g of *Ruta* cells. Growth and furanocoumarins were measured after 7 and 10 days of culture.

Immobilization

An autoclaved alginate solution containing *Ruta* cells was dropped on a sterile solution containing 100 mM $CaCl_2$. After 30 minutes, beads were rinsed 3 times in 100 mL Gamborg's B5 medium supplemented with 2,4 D 2 mg.L-1 and sucrose 30 g.L-1, and then cultivated on rotary shaker (100 rpm) in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL Gamborg's B5 medium supplemented with

2,4 D 2 mg.L-1 and sucrose 30 g.L-1, supplemented or not with 3 mM $CaCl_2$. Two types of alginate were used for beads: the first alginate called "Sigma" (extracted from *Macrocystis pyrifera*) was provided by Sigma chemicals company. The second one called "Sg300" was satialgine SG 300 provided by Sanofi Bio-industries (France). The viscosity of Sigma alginate is 3500 cps (2% alginate solution), while Satialgine alginate viscosity is lower (300 cps). Beads were shacked for 25, 66 and 75 days in standard conditions. Initial alginate solution was concentrated to 2% or 3% (w/v). Five grams of *Ruta* cells were mixed with 50 ml of alginate solution. After growing up, beads were delited in 50 mM disodic citrate until the separation of previously immobilized cells from alginate, and then the % of cells was obtained per gram of beads.

Cell viability was measured by hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA).

H^1 Nuclear Magnetic Resonance Imaging

H^1 NMR images were acquired at 24°C with a Bruker AM300 WB instrument equipped with a standard microimaging unit. The time echo was 15 ms and microimages resolution was 35 µm.

Furanocoumarin analysis

After harvest, cells or beads were dripped, frozen, lyophilized for 48 hours, and then ground. Twenty milligrams of lyophilized powder was resuspended with 1200 µL of extraction solvent (H_2O-Ethanol 1:1) for 30 minutes. After a 12000 rpm centrifugation (8 minutes), the supernatant was filtered with 0.45 µm millipore acetate filter and reserved for HPLC analysis. Culture media underwent only a 0.45 µm filtration before HPLC analysis.

Furanocoumarins analysis were performed with reverse-phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The cartridge was provided by Merck : LiChroCART 125–4 HPLC-cartridge. Two solvents were used to separate the four linear furanocoumarins; solvent A was ultrapure water and solvent B was constituted with methanol-acetonitrile 1:1. Methanol and acetonitrile were provided by Merck (Germany). The HPLC method used a non-linear gradient of A and B solvent. Starting from 0%, the solvent B reached 60% after 30 min. Psoralen, xanthotoxin, bergapten and isopimpinellin were detected at 300 nm wavelength with diode-array detector. Psoralen, xanthotoxin, bergapten and isopimpinellin concentrations were calculated with standard solutions (provided by Extrasynthese, France). The four concentrations were added up to obtain total furanocoumarin concentration.

Data analysis

Because many variables were studied for immobilization, the results were treated with principal components analysis, a multivariate statistical technique using Statbox (PCA, STATBOX software, Grimmer Logiciels, 1997, Paris FRANCE).

Differences between mean values were compared with analysis of variance (ANOVA, STATBOX software, Grimmer Logiciels, 1997, Paris FRANCE) followed by Newman-Keuls' Post Hoc test ($p<0.05$).

RESULTS

Ruta graveolens were cultivated in 250 mL Erlenmeyer flasks (Figure 1). Starting from 7g of fresh weight (FW), the growth occurred for 20 days, reaching a value of 23 g FW (growth index: 230). The highest furanocoumarin concentrations were measured within the cells (3.5–20 $mg.L^{-1}$ calculated on the basis of fresh cell volume) versus 0–1.4 $mg.L^{-1}$ in the medium. The maximum cell level was obtained at the end of the exponential phase for which 0.4 mg of furanocoumarins were stored within the biomass.

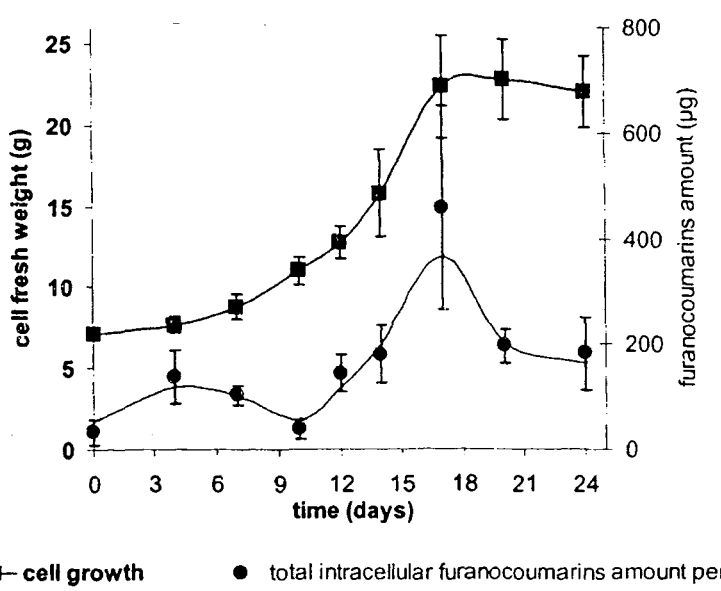


FIGURE 1 Ruta cells growth and furanocoumarin level in Erlenmeyer culture. *Ruta* cells was cultivated in 250 mL Erlenmeyer flask in 100 mL Gamborg's B_5 medium supplemented with 2,4 D 2 $mg.L^{-1}$. Total furanocoumarins amounts were calculated within cells, for each flask

Bioreactor experiments

In order to evaluate the growth and metabolite potentials of the *Ruta* strain, experiments were carried out in a 2.5 L Biostat bioreactor (Figure 2). In these conditions, 115 g FW were produced from 46 g FW in 26 days (growth index: 150). Most of the sucrose was hydrolyzed in 5 days but a relatively high concentration of glucose and fructose still remained after 20 days (Figure 3). This relatively high concentrations of glucose and fructose was also observed in Erlenmeyer flask after 20 days of cultures (Figure 3). Nevertheless, sucrose hydrolysis was slower in the case of Erlenmeyer cultures (12 days) as compared bioreactor culture (total hydrolysis in 5 days).

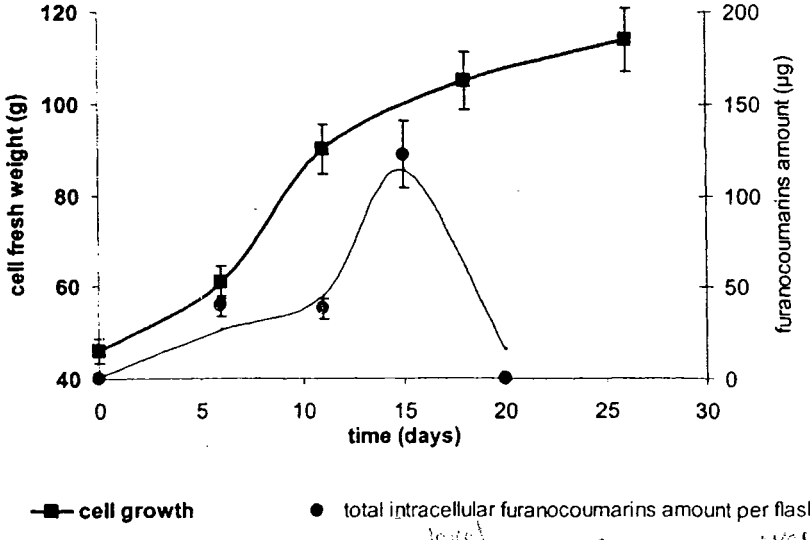


FIGURE 2 Ruta cells growth and furanocoumarin lebel in bioreactor culture *Ruta* cells was cultivated in 2.5 L bioreactor in 1.2 L Gamborg's B_5 medium supplemented with 2,4 D 2 $mg.L^{-1}$. Total furanocoumarins amounts were calculated within cells, for each sample

In the bioreactor conditions tested here, cell growth was not as high as that obtained in 250 mL Erlenmeyer flask. Nevertheless, the lag phase was shorter and the stationary phase was not really established at the end of the culture period in bioreactor. These observations indicate that the culture conditions within the bioreactor could be improved. In the conditions tested here, the bioreactor inoculum relative size was lower (40 mg FW per mL of medium) than the one of the control Erlenmeyer flask cultures (70 mg FW per mL of medium).

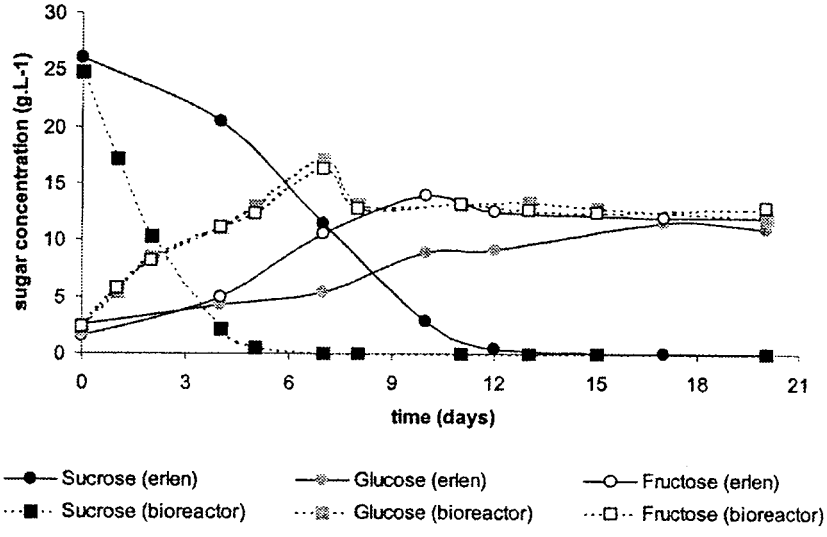


FIGURE 3 Sugar consumption by Ruta cells® Ruta cells were cultivated in 250 mL Erlenmeyer flask (○) or 2.5 L bioreactor (□). Sugars were quantified in the culture medium with Boerhinger enzymatic kits

In bioreactor, furanocoumarin levels were lower than those measured in the control Erlenmeyer culture (Figure 1 and 2). After 4 weeks, the stationary phase, corresponding to the maximum furanocoumarin concentration in Erlenmeyer, was not completely reached in the bioreactor cultures. As a consequence, the drastic increase of furanocoumarin production in the control (more than 400µg at the end of the exponential phase) could not be observed in the bioreactor (125µg).

These results may be attributed to differences occuring between inoculum size, difference of growth kinetic and thus differences of physiological status of the cells when comparing Erlenmeyer and bioreactor cultures. Further experiment will be conducted to improve bioreactor culture conditions.

Elicitation

In order to investigate a possible elicitation response, we tested the effects of fungal preparations on *Ruta* cell behavior. Among the different preparation tested, *Verticillium dahliae* lyophilisate was the most efficient (unpublished datas). The most effective result was obtained as follow : starting from *Ruta* biomass

obtained in the 2.5 L bioreactor (see above), 3 cultures were established in parallel in standard Erlenmeyer conditions. The first culture was the control; the second (E1) and the third (E2) ones consisted in a standard medium supplemented with 10 mg of respectively 6 and 30 days old lyophilized *Verticillium*. Biomass and furanocoumarin measurements were performed after 7 and 10 days of culture. In all cases, *Ruta* cell growth was not affected by the presence of elicitor (data not shown). On the opposite, a drastic enhancement of furanocoumarin level within the cells and the culture medium was induced by the presence of *V. dahliae* lyophylisate (Figure 4). The E1 elicitor improved the "total furanocoumarin content per flask" by 10 fold. The E2 eliciting preparation induced a much more drastic increase (18 fold) as compared to E1 increase. Moreover, no significant difference could be established as a function of treatment duration. If the cell content was improved by elicitation (Figure 4B), the furanocoumarin release was also highly increased. This very positive result demonstrates the high potentials of *Ruta* cell cultures. Moreover, because metabolites release is improved by elicitation, such a treatment opens up very interesting perspectives for furanocoumarins production by *Ruta* cells cultivated in bioreactor, as it is possible to recuperate the metabolites in the medium.

Immobilization of Ruta cells in calcium alginate beads

Calcium alginate immobilization has also been investigated in terms of cell viability, growth and metabolite production. For this purpose, suspended *Ruta* cells cultivated in standard conditions (250 mL Erlenmeyer flasks), were filtered, rinsed, and resuspended in 2 different types of alginate (one alginate with high viscosity and one with low viscosity). After gelification of the alginate, 10 g of beads (diameter 4–5mm) were placed in 250 mL Erlenmeyer flasks containing Gamborg's B5 medium supplemented with 2,4 D 2 mg.L-1 and sucrose 30 g.L-1 eventually supplemented or not with 3 mM $CaCl_2$ (see Table I). Medium supplementation in $CaCl_2$ could allow a better resistance of beads during the culture [19]. The culture was performed on a rotary shaker, and growth and furanocoumarin levels were studied as a function of time. In all conditions, immobilized cell viability was preserved and growth occurred at an average rate of 0.22 $g.g^{-1}FW.day^{-1}$. This growth consisted in the development of cell colony within the beads (Figure 5: CC). With time, the size of the colony increased, and, cell leakage occured (Figure 5: LC). With regard to furanocoumarin levels, two principal components analysis (PCA) have been performed. The different factors (4) and modalities tested (2 or 3 per factor) are summarized in Table I.

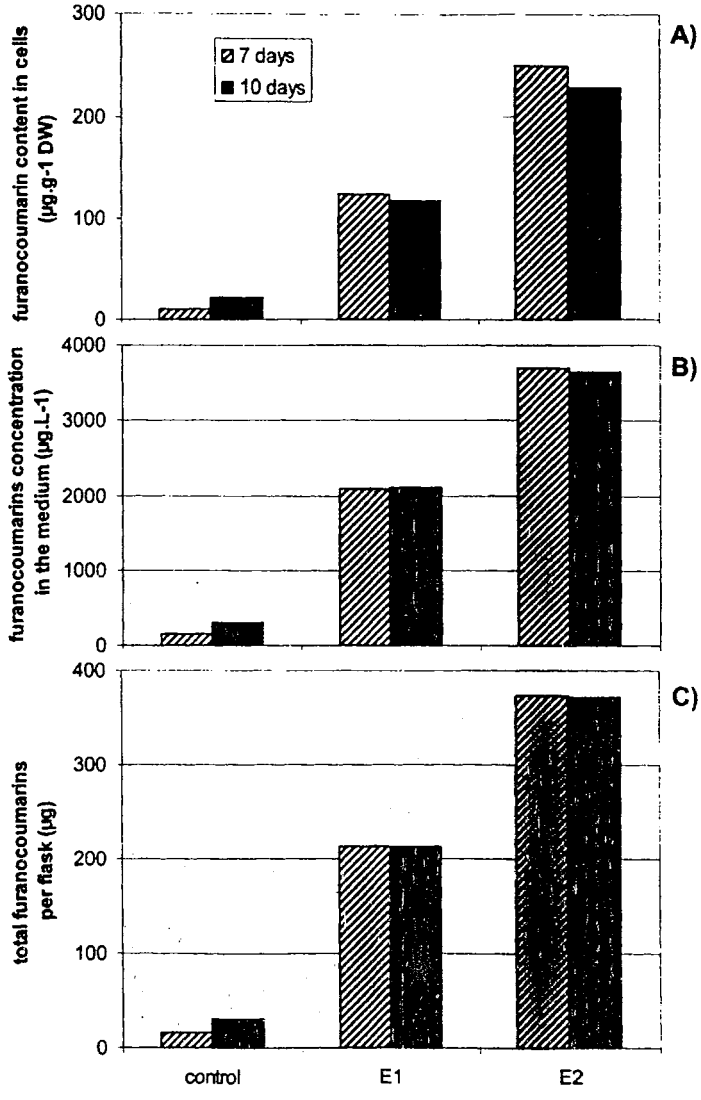


FIGURE 4 Elicitation of *Ruta* cells by *Verticillium*. *Ruta* cells were cultivated in 250 mL Erlenmeyer flasks in 100 mL Gamborg's B_5 medium supplemented with 2,4 D 2 $mg.L^{-1}$, for 7 days and 10 days. Cells were elicited with 2 elicitor agents, E1 = 6-days *Verticillium* and E2 = 30-days *Verticillium*. 10 mg of lyophilized mycelium was added to the medium before autoclaving. Furanocoumarin content has been measured in cells (**A**) and in the medium (**B**). Total synthesis per flask is represented in **C**

TABLE I Immobilization factors for each immobilized cell cultures

Immobilized cell	*Culture (days)*	*Alginate*	*% alginate*	*Calcium (mM)*[a]
IC1	25	Sg300	2	0
IC2	25	Sigma	2	0
IC3	66	Sigma	2	0
IC4	66	Sg300	2	0
IC5	66	Sigma	2	3
IC6	75	Sigma	2	0
IC7	66	Sg300	3	3
IC8	25	Sg300	2	3
IC9	66	Sg300	3	0
IC10	66	Sigma	3	3
IC11	25	Sigma	2	3
IC12	66	Sigma	3	0
IC13	75	Sg300	2	0
IC14	66	Sg300	2	3

a. Gamborg's B5 medium could be supplemented with 3 mM CaCl2.

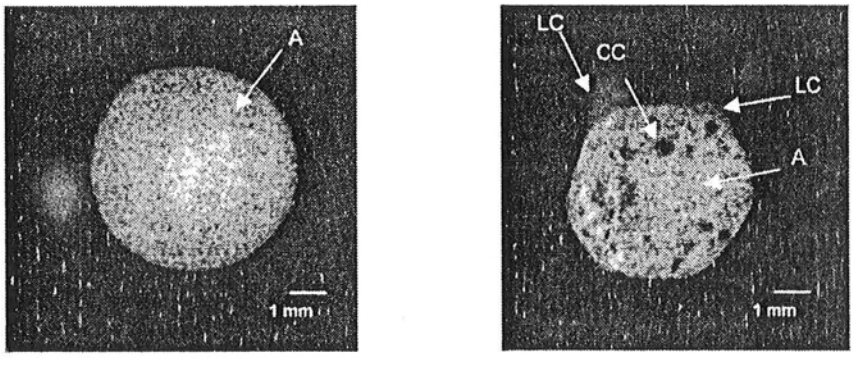


FIGURE 5 NMR images of alginate beads **A** : alginate; **CC** : cell colonies; **LC** : leaking cells Resolution of images is 35 µm. Images are T1 weighted Beads : 3% alginate bead cultivated for 66 days in Gamborg's B_5 medium supplemented with 2,4 D 2 $mg.L^{-1}$

Two PCA analysis have been performed on immobilization results : one on furanocoumarins content in cells (Figure 6-A and Figure 7) and one on furano-

coumarins concentration in the medium of culture (figure 6-B and Figure 8). Both PCA are highly significant as principal components 1 and 2 represent 87% of the variability measured for intracellular furanocoumarins (figure 6-A) and 85% of the variability measured for extracellular furanocoumarins (figure 6-B). The PCA analysis of intracellular cell content (Figure 7) discriminates suspended and immobilized cells, as they correspond to two distinct groups on the map. The variability affecting immobilized cells is higher than variability of control (suspended) cells. The total furanocoumarin and bergapten content are significantly higher in suspended cells than in immobilized ones (see analysis of variance in Table II). Immobilized cells do contain more isopimpinellin. In the culture medium, furanocoumarin concentration is higher for immobilized cells than for free cells. The groups corresponding to suspended or immobilized cells (Figure 8) are well discriminated onto the PCA. Moreover, the culture medium of immobilized cells (Table II) contains higher amounts of isopimpinellin and bergapten. In conclusion, whatever the immobilization condition, qualitative and quantitative modification of the furanocoumarin levels were observed. Immobilization modifies the metabolite profile and favors the release of these molecules.

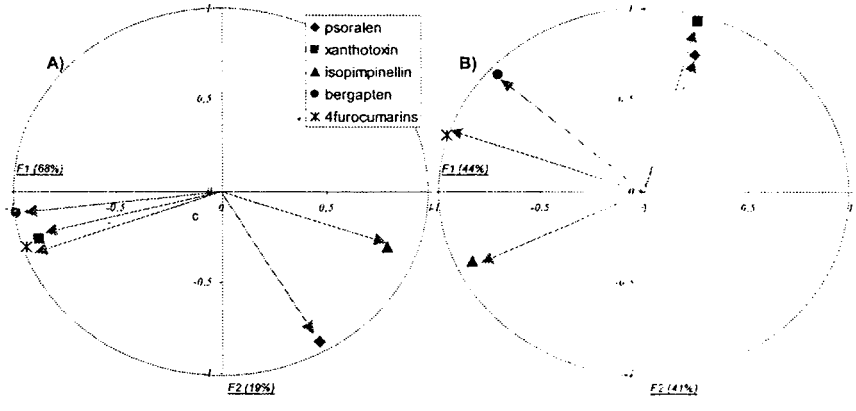


FIGURE 6 Principal component analysis of furanocoumarin profile. The results are displayed using components 1 and 2 and present individual scores (furanocoumarins intracellular (**A**) and extracellular (**B**) concentration) as plot

TABLE II Means (n=14) and standard deviations (stdev) of furanocoumarins concentrations (intra- and extracellular) in immobilized cell and control cell (suspended cell)

	Intracellular content ($\mu g.g^{-1}$ *DW*)			*concentration in the medium* ($\mu g.L^{-1}$)		
	isopimpinellin	*bergapten*	*furanocoumarins*	*isopimpinellin*	*bergapten*	*furanocoumarins*
Immobilized cells	664	806	1496	933	985	1958
(stdev)	*(394)*	*(555)*	*(515)*	*(468)*	*(826)*	*(865)*
Control cells	17	2996	3143	46	332	475
(stdev)	*(65)*	*(909)*	*(970)*	*(108)*	*(204)*	*(362)*
IC[a]	A	B	B	A	A	A
CC[a]	B	A	A	B	B	B
Factor effect[b]	***	***	***	***	*	**

a. IC (immobilized cells); CC (control cells).

b. Analysis of variance was performed for each furanocoumarin concentration, and the effect of immobilization was *significant $p<0.05$ **very significant $p<0.01$ or ***highly significant $p<0.001$. Different letters for each vertical column indicate significant differences between groups (determined by the Newman-Keuls Post Hoc test).

172

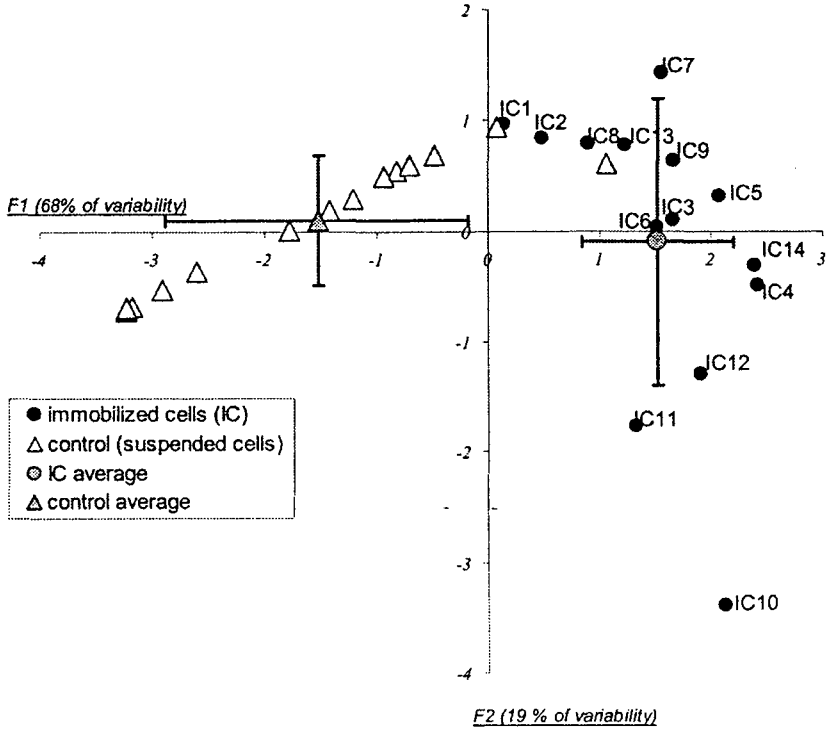


FIGURE 7 Principle components analysis of intracellular furanocoumarin profile. The results are displayed using principal components 1 and 2 and present individual scores (immobilized or suspended cells) as plot

DISCUSSION AND CONCLUSION

Ruta cells were grown either in 250 mL Erlenmeyer flasks or in 2.5 L bioreactor. As compared to literature [19], *Ruta* cells growth rate is not as high as model tobacco cells; but further improvement of cell lines, culture medium and culture conditions have not already been achieved. Especially, in the case of bioreactor cultures, the effects of inoculum size and oxygenation level will have to be studied more precisely. These 2 parameters are often considered as major points that affect growth but also secondary metabolite production [20].

In terms of furanocoumarin production, our cell lines synthesize psoralen and its methoxy-derivatives but they are essentially stored inside the cells and only low concentrations can be measured in the medium. Fortunately, elicitation is proved to solve a part of this problem. The choice of a good eliciting preparation

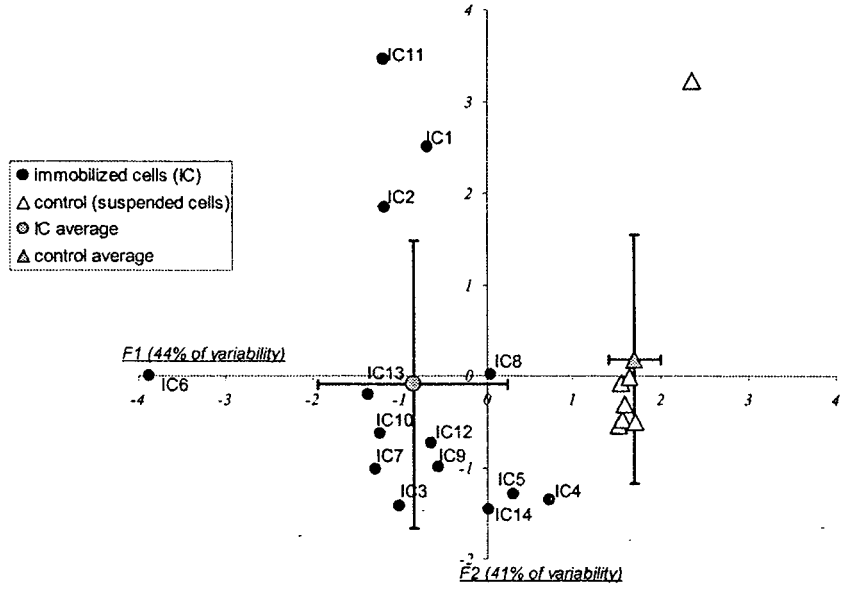


FIGURE 8 Principle components analysis of extracellular furanocoumarin profile. The results are displayed using principal components 1 and 2 and present individual scores (immobilized or suspended cells) as plot

could lead to a more than 20 fold increase of the furanocoumarin cell and medium levels (25 and 23 respectively). In terms of increase, these results are superior to those of Bohlmann *et al.* [21]. Regarding the present results, the eliciting preparation quality is of the highest importance. Among the different fungi species tested (*Verticillium, Aspergillus*), *Verticillium* was the most efficient (unpublished results). The physiological stage (i.e. the age) of the mycelium also greatly modulates the efficiency of the treatment. These results are in accordance with those generally described in literature, [22].

For the future, it will be necessary to test more finely the kinetic of elicitation and other elicitors. The understanding of the mechanisms by which *Ruta* cells synthesize and release more psoralens when exposed to elicitors will also be a priority. One approach could be to test the potential effects of jasmonate in order to determine if its pathway is involved [23] in the physiological response here described.

In parallel to elicitation, immobilization appeared as another excellent way to enhance the release of furanocoumarins in the medium. This fact was already shown by Gontier *et al.* [19]. It is also demonstrated that such a technique induces great modifications of metabolic profile and partition between culture

medium and immobilized cells. The occurrence of increased amounts of 5.8-methoxypsoralen (isopimpinellin) indicates that both monooxygenases (5-methoxypsoralen 8 monooxygenase and 8-methoxypsoralen 5 monooxygenase) responsible for the synthesis of 5.8-methoxypsoralen [24] could be activated when immobilizing the cells. Obviously, in the present conditions, entrapped cell viability is preserved within the alginate beads. H^1 NMR imaging has been used in order to evaluate the potential of this technique for studying cell growth inside the bead. The present results show that it is possible to distinguish cell colonies from the alginate matrix but, this technique should not be compared to classical photonic microscopy. Further analysis of the results here obtained will allow to investigate more precisely cell colonization and water-substrates fluxes as a function of time. This should allow us to establish correlations between cell metabolic responses and the parameters listed above. According to literature, it is the first time that such a technique is employed to investigate what is happening within the beads.

Acknowledgements

This work was supported by a grant of the French ministry of national education, research and technology.

References

[1] Pira E, Romano C, Sulotto F, Pavan I, Monaco E. *Curr. Genet.* 1989, 16 (2): 75–80.
[2] Pathak MA., Fitzpatrick TB. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 1992, 9 (1): 33–35.
[3] Lagey K, Duinslaeger L, Vanderkelen A. *Farmaco.* 1995, 50 (6): 479–488.
[4] Yurkow EJ, Laskin JD. *Toxicology.* 1990, 65 (1–2): 33–47.
[5] Henriques JA, Andrade HH, Bankmann M, Brendel M. J. *Photochem. Photobiol* B. 1989, 3 (4): 497–507.
[6] Averbeck D, Dardalhon M, Magana-Schwencke N. *Mutat. Res.* 1990, 235 (1): 1–7.
[7] Gillardeaux O, Perin-Rousel O, Perin F. *Biochemistry.* 1992, 31 (47): 11818–11822.
[8] Bordin F, Carlassare F, Busulini L, Baccichetti F. IARC *Sci. Pub.* 1993, (124): 133–139.
[9] Calzavara-Pinton P., Ortel B., Carlino A., Honigsmann H., De Panfilis G. J. *Photochem. Photobiol.* 1992, 14 (1–4): 3–22.
[10] Berg M., Ros AM. *Life Sci.* 1993, 53 (22): 355–358.
[11] Calzavara-Pinton PG, Zane C., Carlino A., De Panfilis G. Photochem. *Photobiol.* 1997, 65 (3): 486–491.
[12] McNeely W, Goa KL. Exp. Toxicol. Pathol. 1998, 50 (4–6): 397–401.
[13] Bohuslavizki KH., Hansel W, Kneip A, Koppenhofer E, Niemoller E, Sanmann K. Eur. J., *Pharmacol.* 1994, 46 (4): 375–377.
[14] Souetre E, Salvati E, Belugou JL, Krebs B, Darcourt G. J. *Photochem. Photobiol.* 1990, 6 (1–2): 221–236.
[15] Candito M., Pringuey D., Lehert P., Drici M., Souetre E., Darcourt G. Skin *Pharmacol.* 1993, 6 (4): 282–291.
[16] Partonen T. *Contact Dermatitis.* 1998, 38 (5): 289–290.
[17] Bourgaud F, Allard N, Guckert A, Forlot P. In *Psoralens: past, present and future of photochemoprotection and others biological activities.* 1989, 219–230.
[18] Bouque V, Bourgaud F, Nguyen C, Guckert A. *Plant cell, tissue and organ culture.* 1998, 53 : 35–40.
[19] Gontier E, Sangwan BS, Barbotin JN. *Plant cell Reports.* 1994, 13 : 533–536.

[20] Payne GF, Bringi V, Prince" C, Shuler ML. In *Plant cell and tissue culture in liquid systems*. Ed. Payne GF, Bringi V, Prince" C, Shuler ML. 1992, pp 346.
[21] Bohlmann J, Gibraltarskaya E, Eilert U. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1995, 43: 155–161.
[22] Dornenburg H, Knorr D. *Enzyme and Microbial Technology*. 1995, 17 : 674–684.
[23] Grundlach H, Muller MJ, Kutchan TM, Zen MH. *Proc Natl. Acad. Sci*. 1992, 89 : 2389–2393.
[24] Brown SA, Sampathkumar S, 1977. *Canadian journal of Biochemistry*. 1977, 55 : 686–692.

Plant Cell, Tissue and Organ Culture 62: 11–19, 2000.
© 2000 *Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.*

Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*

B. Massot, S. Milesi, E. Gontier, F. Bourgaud* & A. Guckert
*Laboratoire Agronomie Environnement ENSAIA-INRA, 2 Avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre les Nancy, France (*requests for offprints; E-mail: bourgaud@ensaia.inpl-nancy.fr)*

Received 12 October 1999; accepted in revised form 20 June 2000

Key words: psoralen, *Ruta graveolens*, Rutaceae, secondary metabolism, shoot culture

Abstract

Ruta graveolens in vitro cultures are a potential source of secondary metabolites (furanocoumarins) of significant medical interest. Experiments led in our laboratory showed that micropropagated shoots were richer in furanocoumarins than any other plant material. In order to optimize the molecule production by such cultivation systems, several factors related to the culture medium were studied. Effects of medium composition on biomass growth and furanocoumarin content were analysed and optimal conditions were determined for phosphate (300 mg l^{-1} of NaH_2PO_4), nitrate (2527 mg l^{-1} of KNO_3), carbon source (10 g l^{-1} of sucrose) and phytohormones (2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 50 μM and benzylaminopurine (BAP) 50 μM). *Ruta* shoot growth and furanocoumarin production were compared for optimized and standard culture conditions. Specific medium gave better results in terms of growth (t_D equal to 6.9 days against 8.6 for standard conditions) but no significant differences appeared concerning metabolite concentrations. However, the present study opens the way to scale-up studies with bioreactor cultivation systems.

Introduction

Psoralen and its derivatives: 5-methoxypsoralen (bergapten), 8-methoxypsoralen (xanthotoxin), 5,8-dimethoxypsoralen (isopimpinellin) belong to the furanocoumarins family. They are currently used for the treatment of skin deseases (i.e. vitiligo and psoriasis) and against several cancers (Edelson, 1988; Tioly-Bensoussan et al., 1988). They are also studied with neurological affections like multiple sclerosis (Koppenhöfer, 1995).

Nowadays, pharmaceutical industry uses bergapten as a side product from *Citrus bergamia* (bergamot tree) essential oil. However this culture is declining and other sources need to be found. Plants belonging to the Rutaceae family are possible candidates for the production of such metabolites (Mc Cloud et al., 1992). In Rutaceae, these compounds are involved as phytoalexins (Aliotta et al., 1994). Investigators report the amount and the localization of these molecules in entire plants. The level of 720 μg g^{-1} FW of furanocoumarins was quantified by Zobel and Brown (1991) in entire plants of *Ruta graveolens* L. They also noted that furanocoumarins were localized on the leaf surface and in mature fruits. This large interest for furanocoumarins led us to investigate the possibility of a production by *in vitro* cultures of *Ruta graveolens*.

Several types of plant material can be used to produce furanocoumarins with *Ruta graveolens*. The first objective of this work was to determine the most interesting plant material for furanocoumarin production.

In a second step, different factors were studied with the objective to optimize both biomass production and furanocoumarin concentration in plant tissues. Various nitrate (NO_3^-), phosphate (PO_4^{3-}) and carbon sources (sugars) concentrations as well as different phytohormone balances were tested. The effect of light was also investigated by comparison with cultures under dark conditions. Experiments using autoclaved *Verticillium dahliae* were conducted with the objective to elicitate furanocoumarin synthesis.

A concluding experiment compared furanocoumarin production with shoots cultivated in optimized medium (result of the present studies) and standard B5 medium.

Materials and methods

Plant material cultures

Entire plant

Leaves were harvested from *Ruta graveolens* field-grown plants (seeds obtained from Etablissement Bertrand, Orléans, France) for furanocoumarin assessment in entire plants.

Standard conditions for micropropagated shoot culture

Micropropagated shoots were obtained from sterile seeds of *Ruta graveolens*. They were maintained in standard Gamborg's B5 (Gamborg et al., 1968) medium supplemented with 3% sucrose (w/v), kinetin (9 μM) and 2,4-D (9 μM). The 250 ml flasks were placed on an orbital shaker at 100 rpm. The culture took place in phytotron at 24 °C. The light intensity was 145 μmol m^{-2} s^{-1}.

For experiments, each flask contained 100 ml of culture medium.

Callus establishment

Calli of *Ruta graveolens* were obtained from leaves of entire plants cultivated in greenhouses. They were cultivated on semi solid Gamborg's medium supplemented with 3% sucrose (w/v) and 2,4-D (9 μM). Semi solid medium contained 0.3% (w/v) Phytagel (Sigma – St Louis, USA). Other culture conditions were the same as applied for shoot cultures in B5 standard medium.

Cell suspension culture

Cell suspensions were obtained from calli and cultured on Gamborg's B5 medium supplemented with 3% sucrose (w/v) and 2,4-D (9 μM). Other culture conditions were the same as applied for shoot cultures in B5 standard medium.

Analytical methods

Biomass analysis

Fresh weight for each treatment was measured after aseptically draining the culture medium out of the flask. The same culture medium was asepticly refilled in the flask after the measurement. Dry weight was measured after freeze-drying for 48 hours.

Extraction and high performance liquid chromatography (HPLC) analysis of furanocoumarin compounds

Micropropagated shoots were removed from flasks, frozen at −30 °C for 24 h, freeze-dried and ground. For each sample, 10 to 20 mg of powder was extracted using one ml of solvent (50/50 EtOH/H_2O). After 30 minutes, the extract was centrifuged 5 min at 1200 rpm. This extraction method is derived from studies led on *Psoralea cinerea* (Bourgaud et al., 1994). The supernatant was filtered (0.45 μM) and analyzed by HPLC. The column used was a Nucleosil 100 C18 reversed phase – 125*4 mm (Merck, Darmstadt, Germany) and the mobile phase was composed of acetonitrile, methanol and water. The gradient used for a run was: acetonitrile/methanol/water 30/30/40 (v/v/v) to 50/50/0 (v/v/v) in 30 min with a concave curve.

Furanocoumarins were determined by EI-MS and MS/MS methods (Bourgaud et al., 1994) by comparison with authentic spectra published by Drewes (1974). Routine identification was made with a diode array detector working between 190 and 400 nm by comparison with authentic samples. Psoralen, bergapten and isopimpinellin were purchased from Extrasynthese (Lyon, France). Xanthotoxin was purchased from Sigma (St Louis, USA).

Carbon sources analysis

The three sugars present in culture medium were analyzed using an enzymatic method from Boehringer Mannheim (Ref. 716260).

Experiments

Phosphate and nitrate experiments

Four concentrations of KNO_3 (N1=632, N2=1264, N3=2527 and N4=5055 mg l^{-1}) and four concentrations of NaH_2PO_4 (P1=37.5, P2=75, P3=150 and P4=300 mg l^{-1}) were used with Gamborg's medium. N3 and P3 are the concentrations of standard B5 culture medium. N1, N2, N4 and P1, P2, P4 are multiple of N3 and P3 respectively.

Phytohormone experiments

Eight culture media were prepared with Gamborg's medium supplemented with sucrose 3% (w/v) and

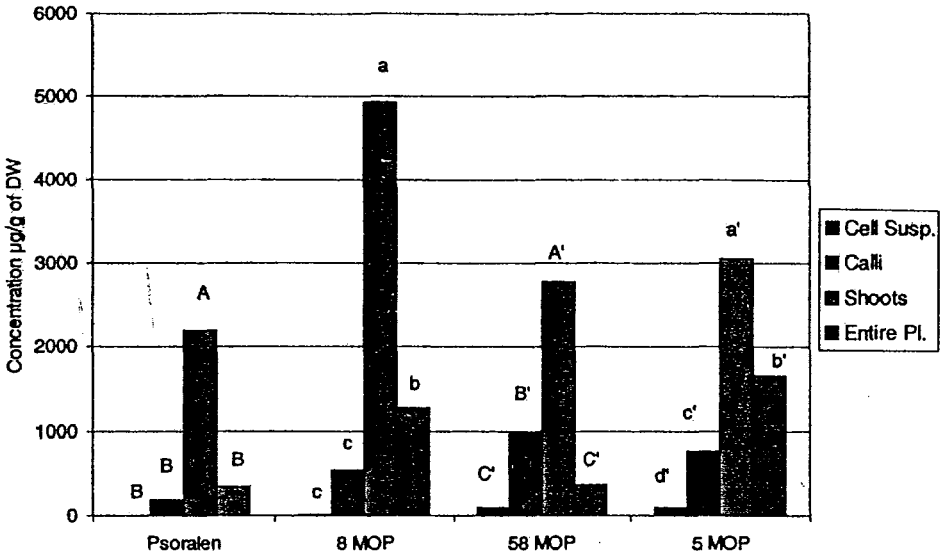


Figure 1. Effect of cellular organization level on furanocoumarins production.

phytohormones: Control (without hormone), D50 (50 μM of 2,4-D), B50 (50 μM of BAP), K50 (50 μM of kinetin), DB50 (50 μM of 2,4-D and 50 μM of BAP) and KD50 (50 μM of 2,4-D and 50 μM of kinetin). 2,4-D was purchased from Fluka Chemie AG (Switzerland), kinetin and BAP from Sigma (St Louis, USA).

Carbon source experiments

Micropropagated shoots were cultivated on Gamborg's B5 medium supplemented with kinetin (2 mg l^{-1}) and 2,4-D (2 mg l^{-1}). Three sugars (sucrose, glucose and fructose) were tested at the concentration of 30 g l^{-1} and the biomass productions were compared after 26 days.

A second assay was led with sucrose. The effects of four concentrations (5, 10, 30 and 50 g l^{-1}) on shoot growth and furanocoumarin production were studied during a growth cycle over 26 days period (biomass measurement every 3 days). For the two assays the other culture conditions were the same as applied for standard medium shoot culture.

Elicitation assay

Fungus culture. *Verticillium dahliae* culture was initiated on Potato Dextrose Agar medium (DIFCO Laboratories).

Elicitor preparation and elicitor experiments. Elicitor homogenization was performed with 7 days-old *Verticillium dahliae* cultures (6.2 g in 100 ml of ultra pure water). This solution was autoclaved (120 °C, 1 bars for 20 min) and added to micropropagation medium (2 ml per flask) after 14 days of culture.

Effect of light

Shoot cultures were grown on Gamborg's medium supplemented with sucrose 3% (w/v), 2,4-D (2 mg l^{-1}) and kinetin (2 mg l^{-1}). One treatment was cultivated on darkness and another under light (145 μmol m^{-2} s^{-1}).

Results and discussions

Choice of in vitro plant material

Four types of plant materials (entire plants, micropropagated shoots, calli and cell suspensions) were studied. Different cellular organizations were represented in this experiment. The undifferentiated cells corresponded to cell suspensions and calli. Differentiated tissues consisted of micropropagated shoots and entire plants. The concentrations of four linear furanocoumarins (psoralen, 5-methoxypsoralen, 8-methoxypsoralen and 5,8-dimethoxypsoralen) were studied (Figure 1).

For the four molecules, significantly higher concentrations were found in micropropagated shoots of *Ruta graveolens* (ANOVA, $p<0.05$). The entire plants gave the second highest content. Undifferentiated cells

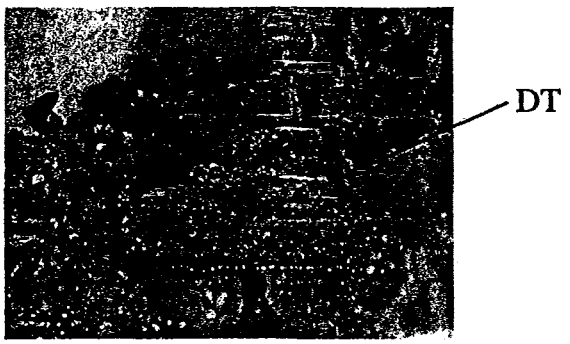


Figure 2. Micropropagated shoots cultivated with 2,4-D (50 μmol) showing dedifferentiated tissues (DT).

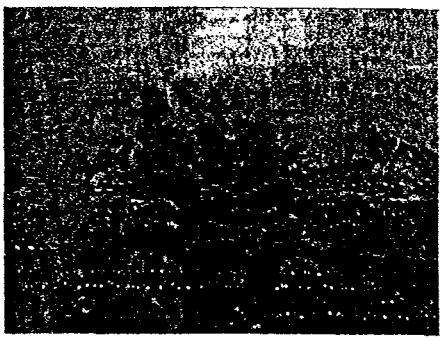


Figure 3. Micropropagated shoots cultivated with kinetin (50 μmol). No morphological change appears.

(calli and cell suspensions) showed the lowest concentrations.

As a consequence, the cellular organization level has an effect on the production of psoralen, 5 methoxypsoralen, 8 methoxypsoralen and 5,8-dimethoxypsoralen. There is also a relation between differentiation level and the relative composition in molecules. The proportion of 5,8 dimethoxypsoralen in calli and cell suspensions is higher than in the two other plant materials (micropropagated shoots and entire plants) and psoralen was not detected in cell suspensions. Among all the possible *in vitro* culture methods, shoot cultures of *Ruta graveolens* were chosen as the reference method.

Effect of nutritive and environmental factors on biomass growth and furanocoumarin production

Growth Index (GI), Specific Growth Rate (μ) and Biomass Doubling Time (t_D) were used to quantify biomass growth (Table 1).

Nitrate had a significant effect, as an increase of KNO_3 concentration in culture medium produced more biomass. The highest GI (ANOVA, $p<0.05$) was obtained for the KNO_3 concentrations of 2527 mg l^{-1} (N3) and 5055 mg l^{-1} (N4). The effect of phosphate was lower. For each nitrate concentration, the growth responses for phosphate concentrations were not significantly different.

Concerning hormone balance, statistical analysis showed that growth obtained for culture media supplemented with 50 μM of 2,4-D (D50) and 50 μM of 2,4-D and BAP (DB50) were favorable to a better biomass production. The other balances did not show any difference compared to control. Although as seen for the choice of *in vitro* plant material, cellular organization level had an effect on the biosynthesis of furanocoumarins (Figure 1). Therefore, production of furanocoumarins could be very affected by possible morphological changes during shoot cultivation. In the case of this hormonal balance experiment, drastic morphological changes could be noted for the medium supplemented with 2,4-D at 50 μM. The shoot number strongly decreased and dedifferentiated tissues (callus) appeared after 26 days of culture (Figure 2). The changes were less obvious with other culture media but the biomass cultivated in medium containing only cytokinins presented a large number of shoots and only this kind of tissue (Figure 3).

The mean growth index obtained for each sugar was significantly more important for sucrose (GI=192%) than for glucose (GI=142%) or fructose (GI=122%). This superiority of sucrose over other carbon sources for *in vitro* growth of a lot of species was reported by many authors (Koul and Koul, 1993). Moreover productivities with different sucrose concentrations were not significant. So, in order to decrease the culture medium cost, the concentration of 10 g l^{-1} was chosen instead of 30 g l^{-1}.

According to our study, light irradiance had no effect on shoot growth.

Concerning furanocoumarin production, each treatment (Table 1) was evaluated for the quantity of metabolites produced after 26 days of culture. Productivity was also calculated for each experiment except carbon source trial. Intracellular furanocoumarin levels were slightly affected by hormone (except for the medium supplemented with 2,4-D at 50 μM where furanocoumarin synthesis was very repressed) and sucrose composition of culture medium. Although, concerning hormone, best productivity (19.7 μg per gram of fresh weight and per day) was obtained with control medium (without hormone). For nitrate and phosphate assay, high concentrations of KNO_3

Table 1. Effect of nutritive and environmental factors on *Ruta graveolens* shoots growth and furanocoumarin (psoralen, bergapten, xanthotoxin and isopimpinellin) production

Treatment	Repetitions	GI (%)	μ (g d^{-1})	T_D (d)	Total furanocoumarins produced (μg)	Productivity (μg g^{-1} of fresh weight . day^{-1})
Nitrate and phosphate assay						
N_1P_1	5	205	0.043	16.5	2847	9.7 *A*
N_1P_2	5	175	0.038	18.7	1767	12.1 *A*
N_1P_3	5	174	0.038	19.5	1575	6.3 *A*
N_1P_4	5	56	0.014	73.3	1184	5.4 *A*
N_2P_1	5	251	0.048	14.5	2537	15.5 *A*
N_2P_2	5	191	0.040	18.8	2115	12.9 *A*
N_2P_3	5	185	0.040	17.7	1732	16.7 *A*
N_2P_4	5	161	0.036	20.5	898	5.0 *BCD*
N_3P_1	5	269	0.050	13.9	1941	17.4 *A*
N_3P_2	5	345	0.057	12.2	2866	21.6 *A*
N_3P_3 *	5	401	0.061	11.5	1229	4.3 *BCD*
N_3P_4	5	**411**	**0.061**	**11.7**	**3508**	**14.2 AB**
N_4P_1	5	277	0.051	13.8	304	1.4 *D*
N_4P_2	5	438	0.064	10.9	673	2.8 *CD*
N_4P_3	5	386	0.061	11.5	1825	7.7 *BCD*
N_4P_4	5	367	0.059	11.9	2730	12.5 *AB*
Hormone assay						
Control (without hormone)	4	471	0.066	10.8	12168	19.7 *A*
BAP 50 μmol l^{-1}	4	486	0.067	10.4	10843	14.4 *AB*
Kinetin 50 μmol l^{-1}	4	401	0.061	11.5	7167	12.0 *AB*
2,4-D 50 μmol l^{-1}	4	607	0.074	9.5	10098	11.6 *AB*
2,4-D 50 μmol l^{-1} + BAP 50 μmol l^{-1}	4	**678**	**0.079**	**8.9**	**9092**	**12.4 AB**
2,4-D 50 μmol l^{-1} + Kinetin 50 μmol l^{-1}	4	454	0.065	11.0	5602	8.4 *B*
Carbon source assay						
Carbon source (30 g l^{-1})						
Sucrose	12	192	0.026	29.5	N.D.	N.D.
Glucose	12	142	0.014	56.3	N.D.	N.D.
Fructose	12	122	0.007	159.8	N.D.	N.D.
Sucrose concentration						
Sucrose 5 g l^{-1}	3	110	0.028	24.4	3160	11.47 *ns*
Sucrose 10 g l^{-1}	3	**114**	**0.029**	**24.7**	**4485**	**11.53 ns**
Sucrose 30 g l^{-1}	3	101	0.026	27.9	3953	11.70 *ns*
Sucrose 50 g l^{-1}	3	111	0.028	25.2	4106	11.57 *ns*
Light irradiance assay						
Light	3	308	0.054	13.0	16108	17.84 *A*
Darkness	3	294	0.052	13.4	16353	16.69 *A*

Growth Index (GI), Specific Growth Rate (μ), Biomass Doubling Time (t_D). N1=632, N2=1264, N3=2527 and N4=5055 mg l^{-1} of KNO_3; P1=37.5, P2=75, P3=150 and P4=300 mg l^{-1} of NaH_2PO_4 (*) for standard Gamborg's culture medium composition; N.D.=Not determined. Statistic treatment for productivity (ANOVA, $p<0.05$); *ns*: non-significant effect of treatment. Optimized conditions chosen appear in bold.

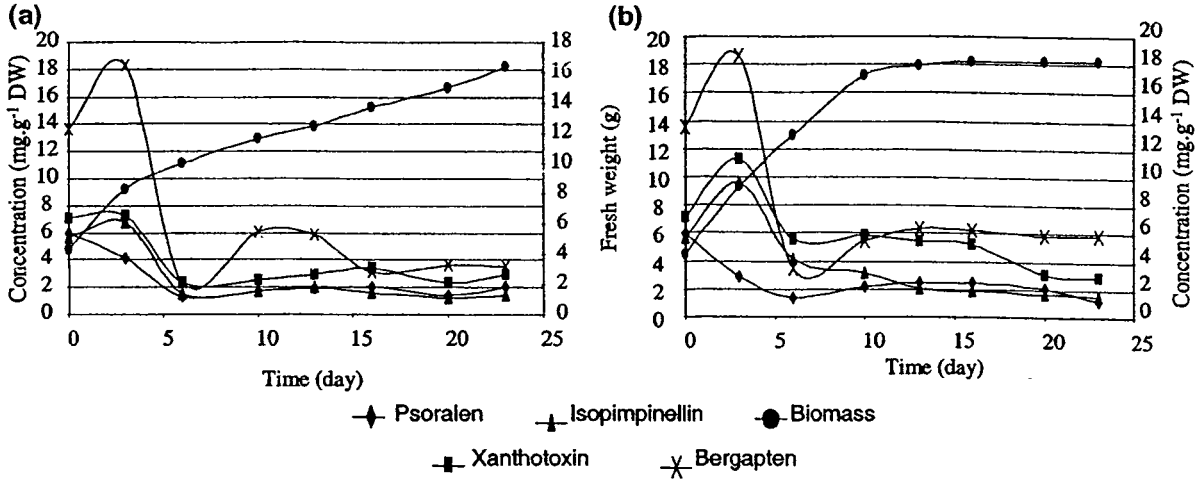


Figure 4. Furanocoumarin composition of *Ruta graveolens* shoots cultivated in standard (*a*) and optimized medium (*b*).

had negative effect on molecule production. The productivity of shoots cultivated in medium supplemented with 5055 mg l^{-1} of KNO_3 was significatively (ANOVA, $p<0.05$) less important than for other concentrations (5.1 against 9.4 μg per gram of fresh weight per day). Light had no effect except for xanthotoxin (the quantity produced after 26 days was increased by 61% when shoots were cultivated under light irradiance) (data not shown). Elicitation assay had no effect on intracellular furanocoumarin concentrations (data not shown).

The results obtained for nutritive and environmental factors led us to test a specific culture medium for the production of furanocoumarins by shoots. This specific medium was derived from Gamborg's medium with optimized concentrations of KNO_3 (2527 mg l^{-1}), NaH_2PO_4 (300 mg l^{-1}), sucrose (10 g l^{-1}) and phytohormone (BAP and 2,4-D at 50 μM).

Comparison between optimized and standard culture media for the production of furanocoumarin by Ruta graveolens shoots

Figure 4 represents the growth that was obtained during 24 days in case of optimized medium (4a) and standard B5 medium (4b).

The specific growth rate in optimized conditions was superior to standard's one (0.10 against 0.061 g d^{-1}). This corresponded to biomass doubling time of 6.93 and 11.50 days respectively. These result obtained for *Ruta* shoots cultivated in optimized conditions and shoots of other species cultivated *in vitro* were compared in Table 2. *Ruta graveolens* shoot growth was in the first half of the table close to *Digitalis lanata*. However, in optimized medium, the shoots died after 13 days of culture. The analysis of the sucrose content (about 2.5 grams per liter in standard and 0.4 grams per liter in optimized conditions) suggested that sucrose was probably a limiting factor for shoot growth in optimized conditions.

In order to keep the advantage of this culture medium (enhanced growth rate), continuous cultivation or perfusion operation has to be envisaged. The goal of such system is to obtain a high biomass production. It

Table 2. Comparision between growth obtained for *Ruta graveolens* shoot system and other shoot system cited in literature (Payne et al., 1991)

Species	Doubling (time days)	Average or maximum
Nicotiana tabacum	3	Max
Withania somnifera	3	Ave
Digitalis purpurea	3.2	Max
Artemisia annua	4.3	Max
Begonia spp.	5.4	Ave
Digitalis lanata	6.6	Ave
Ruta graveolens	**6.93**	**Ave**
Rauwolfia serpentina	8.5	Ave
Perlargonium tomentosum	10	Max
Cinchona spp.	10	Ave
Atropa belladonna	10	Ave
Catharanthus roseus	11.2	Ave

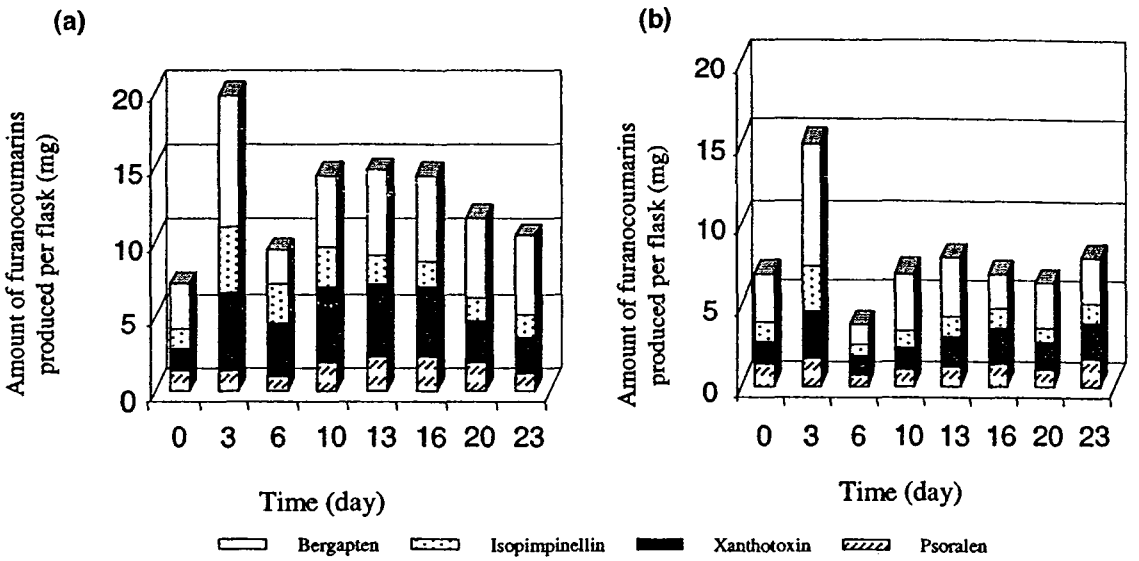


Figure 5. Quantity of furanocoumarins produced per flask of *Ruta graveolens* shoots cultivated in optimized (*a*) and standard medium (*b*).

could be appropriate in the case of the furanocoumarin production by *Ruta* shoots.

Concerning furanocoumarin production, the intracellular concentrations of psoralen, bergapten, xanthotoxin and isopimpinellin had the same profiles and levels whatever the culture conditions (Figure 4). For the four molecules, maximal contents were analyzed three days after the starting of the culture. After this date, molecule concentration decreased during the growth phase. This is in agreement with the general rule linking primary and secondary metabolisms. However, the increase of secondary metabolism, occurring traditionally during the stationary phase, did not appear in standard conditions probably because stationary phase was still not reached after 23 days of culture (Figure 4). Concerning optimized medium, secondary metabolism stopped with the shoot necrosis occurring at day 13.

Optimized culture medium and standard B5 medium were also compared for total furanocoumarin quantities produced during a growth cycle (Figure 5). This study showed that production in optimized conditions was significantly more important (ANOVA $p<0.05$) than in standard B5 medium. This increase was due to the difference in biomass production between the two cultures, because intracellular furanocoumarin concentrations were not significantly different.

Intracellular furanocoumarin levels obtained for *Ruta graveolens* shoots cultivated in optimized and standard conditions were compared with those cited in literature for Ruta tissues cultivated in other systems (Table 3). For psoralen and bergapten, the best concentrations (about 6000 $\mu g\ g^{-1}$ and 18000 $\mu g\ g^{-1}$ of dry weight for psoralen and bergapten, respectively) were found in shoots cultivated in standard B5 medium and optimized B5 medium. Concerning xanthotoxin, shoots cultivated in optimized B5 medium and hydroponic plants were close (11240 $\mu g\ g^{-1}$ of dry weight for shoots against 10000 for the second plant material). Hydroponic plants gave better results than shoots cultivated in standard B5 medium for this furanocoumarin.

Best levels were obtained with our *in vitro* systems. But the results reported in Table 3 showed that optimized medium had no effect on furanocoumarin synthesis (except for xanthotoxin). So the enhancement of molecule production was due, in a major part, to biomass growth optimization.

Conclusion

Ruta graveolens shoot cultures represent an interesting material for *in vitro* production of furanocoumarins compared to cell suspension systems. It was possible to determine a modified B5 medium with the objective to enhance biomass growth as well as furanocoumarin production with shoot cultures. Many authors in literature propose a two-steps culture system as the one developed for the industrial process that produced

Table 3. Maximal intracellular furanocoumarin concentrations ($\mu g\ g^{-1}$ dry weight) obtained for different plant materials of *Ruta graveolens* cultivated *in vitro*

Ruta graveolens in vitro system	Maximal intracellular furanocoumarin concentrations ($\mu g\ g^{-1}$ dry wt.)		
	Psoralen	Xanthotoxin	Bergapten
Shoots in optimized medium	**5990**	**11240**	**18600**
Shoots in standard medium	5990	7310	18320
Long established cell suspension (Eilert, 1989)	400	100	150
Newly established cell suspension (Eilert, 1989)	700*	600	1000
Shoot teratoma culture (Eilert, 1989)	1000*	6000	8000
Hydroponic plants (Eilert, 1989)	3000	10000	2000

*Corresponds to maximal concentrations obtained after elicitation.

shikonin (Tabata and Fujita, 1985). In the case of *Ruta graveolens*, this type of culture may be appropriate because best conditions for growth and production are different (see hormones and mineral nutrient experiments). The morphological and biochemical changes occurring during the first step thoroughly limit the secondary metabolism enhancement. As a consequence, for *Ruta graveolens in vitro* cultures, the incidences of first step conditions on furanocoumarin production during the second step have to be studied. A possible negative remanence could exist. Further experiments will be led in order to precise this effect and the two models (one-step or two-steps) will be compared using bioreactor assays.

With optimized B5 medium, a mean of 12 mg per flask of the four furanocoumarins (psoralen, bergapten, xanthotoxin and isopimpinellin) was obtained against 7 mg per flask in standard B5 medium. However, this increase was only based on growth improvement (intracellular furanocoumarin levels appeared to be not affected by new conditions). The biomass necrosis after only 13 days of culture was never observed during preliminary works. Elicitation or the addition of metabolic precursor in the culture medium were useless for the optimization of furanocoumarin synthesis.

The strategy required for producing furanocoumarin with *Ruta graveolens* shoots can be precised. The optimized culture medium studied here can be a good candidate for biomass production in a first step. Continuous system (perfusion) would allow the rapid development of a large quantity of shoots. Because furanocoumarins synthesis could not be induced by external treatment (i.e. elicitation assay), a second culture medium increasing the molecule excretion instead of the intracellular furanocoumarin production will be used in a second step. The next step of this work will consist in the scale-up studies with the objective to optimize, again, biomass production in larger scale systems.

References

Aliotta G, Cafiero G, DeFeo V & Sacchi R (1994) Potential allelochemicals from *Ruta graveolens* and their action on radish seeds. J. Chem. Ecol. 20(11): 2761–2775

Bourgaud F, Poutaraud A & Guckert A (1994) Extraction of coumarins from plant material (*Leguminosae*). Phytochem. Analysis 5: 127–132

Drewes SE (1974) Chroman and related compounds. Progress in Mass Spectrometry II. Verlag Chemie, Weinheim

Edelson R (1988) Les médicaments photoactivés. Pour la science, (132) 64–72

Eilert U (1989) Elicitation induction of secondary metabolism in dedifferentiated and differentiated *in vitro* systems of *Ruta graveolens*. In: Kurz WGW (ed) Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures (pp 119–128). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

Gamborg OL, Miller RA & Ojima V (1968) Nutrient requirements of suspensions cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151–158

Koppenhöfer E (1995) Kaliumkanalblocker in der Neurologie: 5MOP zur behandlung MS-bedingter Funktions de fizite. TW Neurologie Psychiatrie: 585–591

Koul S & Koul AK (1993) Development of media for growth and furanocoumarin production of *Ammi majus* cells. Fitoterapia LXIV (5): 415–422

McCloud ES, Berenbaum MR & Tuveson RW (1992) Furanocomarin content and phototoxicity of rough lemon (*Citrus jambhiri*) foliage exposed to enhanced utraviolet – B (UVB) irridiation. J. Chem. Ecol. 18 (7) 1125–1137

Payne GF, Bringi V, Prince C & Shuler M (1991) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems. Hanser Series. John Wiley & Sons, New York

Tabata M & Fujita Y (1985) Production of shikonin by plant cell cultures. In: Zaitlin M, Day P & Hollandaer (eds) Biotechnology in Plant Science: Relevance to Agriculture in the Eighties (pp 207–218). Academic Press, New York

Tioly-Bensoussan D, Berreti B & Grupper C (1988) PUVA and rePUVA in the treatment of mycosis fungoides: 58 cases of mycosis with 710, 10 years follow up. In: Fitzpatrick TB, Forlot P, Pathak MA & Urbach F (eds) Psoralens: Past, Present and Future of Photochemoprotection and other biological activities. (pp. 293–300). John Libbey, Paris

Zobel AM & Brown SA (1991) Psoralen in senescing leaves of *Ruta graveolens*. J. Chem. Ecol. 17(9): 1801–1810

Etude de la production de furocoumarines par la Rue officinale (*Ruta graveolens* L.) : cultures de plantes au champ et cultures *in vitro*

Les furocoumarines, métabolites secondaires de plantes, présentent un intérêt économique pour leur utilisation en dermatologie. La synthèse chimique des furocoumarines étant trop onéreuse, leur approvisionnement doit être assuré par des végétaux. Nos études ont été conduites afin d'évaluer la possibilité de produire les furocoumarines à partir de *Ruta*. Deux types de cultures ont été étudiés : des plantes entières et des suspensions cellulaires. La production et le profil de 4 furocoumarines (psoralène, xanthotoxine, isopimpinelline et bergaptène) ont été déterminés dans diverses conditions de cultures.

Nous avons étudié la teneur en furocoumarines chez 4 espèces du genre *Ruta*. Agronomiquement, *Ruta graveolens* est la plus intéressante: elle produit beaucoup de matière sèche, a une bonne résistance au froid et une forte teneur en furocoumarines (de 4 à 17 $mg.g^{-1}$ MS dans les feuilles). Les fruits et les feuilles contiennent de 60 à 70% des furocoumarines de la plante.

L'effet de plusieurs facteurs (stade de développement, coupes annuelles, densité, fertilisation azotée) ont été testés sur la productivité en furocoumarines. Les plantes produisent un maximum de furocoumarines au stade fructification. Les coupes annuelles améliorent la productivité. La fertilisation azotée et la densité n'ont pas eu d'effet significatif dans nos conditions. Ces essais au champ ont été conduits sur plusieurs sites et ont mis en évidence un fort effet terroir.

Enfin, des suspensions cellulaires de *Ruta graveolens* ont été cultivées en erlen et en bioréacteur. Leur teneur en furocoumarines est comprise entre 0,3 et 19 $mg.g^{-1}$ MS. L'élicitation par *Verticillium dahliae* a augmenté la production de furocoumarines. L'immobilisation des cellules a favorisé le relargage des métabolites dans le milieu. Le profil des furocoumarines est fortement modifié par ces facteurs.

Les suspensions ont une meilleure productivité que les plantes entières, mais elles ne sont pas économiquement rentables.

Mots-clefs : furocoumarine ; psoralène ; métabolites secondaires végétaux ; intérêt pharmaceutique ; *Ruta* ; *Ruta graveolens* ; plante médicinale ; plante entière ; culture au champ ; fertilisation ; coupe ; densité ; stade phénologique ; culture *in vitro* ; suspension cellulaire ; bioréacteur ; élicitation ; immobilisation.

Study of furocoumarins production by *Ruta graveolens* L.: plant cultures in field and *in vitro* cultures

Furocoumarins, plant secondary metabolites, have an economic interest for their use in dermatology. These molecules must be supplied by plants as their chemical synthesis is too expansive. Our studies were led to evaluate the possibility to produce furocoumarins from *Ruta*. Two types of cultures have been studied : whole plants and suspensions. The production and the profile of the 4 furocoumarins (psoralen, xanthotoxin, isopimpinellin and bergapten) have been determined in different culture conditions.

Furocoumarins content has been studied in 4 *Ruta* species. Agronomically, *Ruta graveolens* was the most interesting : it produced high amount of dry biomass, was cold-resistant an is highly concentrated in furocoumarins (from 4 to 17 $mg.g^{-1}$ DW). In these plants, fruits and leaves showed to contain 60 to 70% of plant furocoumarins.

Effect of several factors (phenological stages, annual cuttings, density, nitrogen fertilization) have been studied on furocoumarins productivity. Plants produced a maximum of furocoumarins at fructification stage. Annual cutting increased productivity. Nitrogen fertilization and density did not have significant effect in our conditions. These field trials had been conducted on several sites and had shown o strong effect of region and soil.

Ruta graveolens suspensions have been cultivated in Erlenmeyer and bioreactor. Intracellular furocoumarins content ranged from 0,3 to 19 $mg.g^{-1}$ DW. Elicitation with *Verticillium dahliae* enhanced furocoumarin production. Cells immobilization increased metabolites release in the medium. Furocoumarins profile were strongly modified by these factors. Suspensions are more productive than plants in field but they are not economically profitable.

Key words: furocoumarin; psoralen, plant secondary metabolite; pharmaceutical interest; *Ruta* ; *Ruta graveolens*; medicinal plant; whole plant; field culture; fertilization; cutting; density; phenological stage; *in vitro* culture; suspension; bioreactor; elicitation; immobilization.

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Monsieur AGNIOT-CARLIN Marie-Joséph, Directeur de Recherche, INRA-Avignon

Monsieur LABERCHE Jean-Claude, Professeur, IUT-Amiens

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Mademoiselle MILESI Sandrine

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

" Etude de la production de furocoumarines par la Rue officinale (Ruta graveolens L.) : cultures de plantes au champ et cultures in vitro ".

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : **«Sciences Agronomiques»**

Fait à Vandoeuvre, le 16 mars 2001

Le Président de l'I.N.P.L.,

J. HARDY

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE - NANCY -

TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55

Etude de la production de furocoumarines par la Rue officinale (*Ruta graveolens* L.) : cultures de plantes au champ et cultures *in vitro*

Les furocoumarines, métabolites secondaires de plantes, présentent un intérêt économique pour leur utilisation en dermatologie. La synthèse chimique des furocoumarines étant trop onéreuse, leur approvisionnement doit être assuré par des végétaux. Nos études ont été conduites afin d'évaluer la possibilité de produire les furocoumarines à partir de *Ruta*. Deux types de cultures ont été étudiés : des plantes entières et des suspensions cellulaires. La production et le profil de 4 furocoumarines (psoralène, xanthotoxine, isopimpinelline et bergaptène) ont été déterminés dans diverses conditions de cultures.

Nous avons étudié la teneur en furocoumarines chez 4 espèces du genre *Ruta*. Agronomiquement, *Ruta graveolens* est la plus intéressante: elle produit beaucoup de matière sèche, a une bonne résistance au froid et une forte teneur en furocoumarines (de 4 à 17 $mg.g^{-1}$ MS dans les feuilles). Les fruits et les feuilles contiennent de 60 à 70% des furocoumarines de la plante.

L'effet de plusieurs facteurs (stade de développement, coupes annuelles, densité, fertilisation azotée) ont été testés sur la productivité en furocoumarines. Les plantes produisent un maximum de furocoumarines au stade fructification. Les coupes annuelles améliorent la productivité. La fertilisation azotée et la densité n'ont pas eu d'effet significatif dans nos conditions. Ces essais au champ ont été conduits sur plusieurs sites et ont mis en évidence un fort effet terroir.

Enfin, des suspensions cellulaires de *Ruta graveolens* ont été cultivées en erlen et en bioréacteur. Leur teneur en furocoumarines est comprise entre 0,3 et 19 $mg.g^{-1}$ MS. L'élicitation par *Verticillium dahliae* a augmenté la production de furocoumarines. L'immobilisation des cellules a favorisé le relargage des métabolites dans le milieu. Le profil des furocoumarines est fortement modifié par ces facteurs.

Les suspensions ont une meilleure productivité que les plantes entières, mais elles ne sont pas économiquement rentables.

Mots-clefs : furocoumarine ; psoralène ; métabolites secondaires végétaux ; intérêt pharmaceutique ; *Ruta* ; *Ruta graveolens* ; plante médicinale ; plante entière ; culture au champ ; fertilisation ; coupe ; densité ; stade phénologique ; culture *in vitro* ; suspension cellulaire ; bioréacteur ; élicitation ; immobilisation.

Study of furocoumarins production by *Ruta graveolens* L.: plant cultures in field and *in vitro* cultures

Furocoumarins, plant secondary metabolites, have an economic interest for their use in dermatology. These molecules must be supplied by plants as their chemical synthesis is too expansive. Our studies were led to evaluate the possibility to produce furocoumarins from *Ruta*. Two types of cultures have been studied : whole plants and suspensions. The production and the profile of the 4 furocoumarins (psoralen, xanthotoxin, isopimpinellin and bergapten) have been determined in different culture conditions.

Furocoumarins content has been studied in 4 *Ruta* species. Agronomically, *Ruta graveolens* was the most interesting : it produced high amount of dry biomass, was cold-resistant an is highly concentrated in furocoumarins (from 4 to 17 $mg.g^{-1}$ DW). In these plants, fruits and leaves showed to contain 60 to 70% of plant furocoumarins.

Effect of several factors (phenological stages, annual cuttings, density, nitrogen fertilization) have been studied on furocoumarins productivity. Plants produced a maximum of furocoumarins at fructification stage. Annual cutting increased productivity. Nitrogen fertilization and density did not have significant effect in our conditions. These field trials had been conducted on several sites and had shown o strong effect of region and soil.

Ruta graveolens suspensions have been cultivated in Erlenmeyer and bioreactor. Intracellular furocoumarins content ranged from 0,3 to 19 $mg.g^{-1}$ DW. Elicitation with *Verticillium dahliae* enhanced furocoumarin production. Cells immobilization increased metabolites release in the medium. Furocoumarins profile were strongly modified by these factors. Suspensions are more productive than plants in field but they are not economically profitable.

Key words: furocoumarin; psoralen, plant secondary metabolite; pharmaceutical interest; *Ruta* ; *Ruta graveolens*; medicinal plant; whole plant; field culture; fertilization; cutting; density; phenological stage; *in vitro* culture; suspension; bioreactor; elicitation; immobilization.