



**Amélioration des teneurs et rendements en dérivés  
coumariniques et en coumarine libre du mélilot  
(*Melilotus officinalis* L. ; Fabaceae)**

Anne Poutaraud

► **To cite this version:**

Anne Poutaraud. Amélioration des teneurs et rendements en dérivés coumariniques et en coumarine libre du mélilot (*Melilotus officinalis* L. ; Fabaceae). Sciences du Vivant [q-bio]. Université Louis Pasteur (Strasbourg 1), 1996. Français. NNT: . tel-02842987

**HAL Id: tel-02842987**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02842987>**

Submitted on 7 Jun 2020

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

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

**UNIVERSITÉ Louis PASTEUR**  
**Faculté de Pharmacie de Strasbourg**

Mémoire de thèse présenté le 29 octobre 1996 en vue de l'obtention du grade de doctorat  
de l'Université Louis Pasteur  
(mention science) Domaine Pharmacognosie  
par  
**Anne POUTARAUD**

**Amélioration des teneurs et rendements  
en dérivés coumariniques et en coumarine libre du mélilot  
(*Melilotus officinalis* L. ; Fabaceae)**

**Membres du jury :**

|                        |                                   |
|------------------------|-----------------------------------|
| Monsieur le Professeur | <b>R. ANTON</b> (Président)       |
| Monsieur le Directeur  | <b>Ph. GIRARDIN</b> (Examineur)   |
| Monsieur le Professeur | <b>P. BENVENISTE</b> (Rapporteur) |
| Monsieur le Professeur | <b>Ph. LETERME</b> (Rapporteur)   |
| Monsieur le Docteur    | <b>Ch. DARBELLAY</b> (Rapporteur) |
| Monsieur le Docteur    | <b>F. BOURGAUD</b> (Examineur)    |

**UNIVERSITÉ Louis PASTEUR**  
**Faculté de Pharmacie de Strasbourg**

Mémoire de thèse présenté le 29 octobre 1996 en vue de l'obtention  
du grade de doctorat de l'Université Louis Pasteur  
(mention science) Domaine Pharmacognosie

par  
**Anne POUTARAUD**

Ce travail fait l'objet d'un contrat de recherche avec option de licence. Il est  
cofinancé par l'ANVAR. Les résultats présentés dans ce document sont sous  
clause de confidentialité et ne doivent donc pas être diffusés.

|                                                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Amélioration des teneurs et rendements<br/>en dérivés coumariniques et en coumarine libre du mélilot<br/>(<i>Melilotus officinalis</i> L. ; Fabaceae)</b></p> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**Membres du jury :**

**R. ANTON** : Directeur de thèse (Professeur de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie de Strasbourg, Université Louis Pasteur)

**Ph. GIRARDIN** : Codirecteur de thèse, Directeur de recherche, INRA Colmar

**P. BENVENISTE** : Rapporteur interne (Professeur de Physiologie Végétale, Institut de botanique de Strasbourg, Université Louis Pasteur)

**Ph. LETERME** : Rapporteur externe (Professeur d'agronomie, Ecole nationale d'Agronomie de Rennes)

**Ch. DARBELLAY** : Rapporteur externe (Docteur ès Sciences, Directeur d'un Centre de recherche sur les plantes médicinales et aromatiques, Suisse)

**F. BOURGAUD** : Examineur (Docteur ès Sciences, Maître de conférence, École nationale d'Agronomie et des Industries alimentaires de Nancy)

La compréhension et la tentative de maîtrise du métabolisme secondaire en vue de produire des molécules intéressant la thérapeutique est un domaine de recherche passionnant et je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont permis de développer ce sujet et de réaliser ce travail.

Je souhaite tout d'abord présenter mes remerciements à Monsieur le Professeur ANTON, Directeur du Laboratoire de Pharmacognosie de la faculté de Pharmacie de STRASBOURG qui a accepté de diriger ce travail et a soutenu cette démarche, notamment auprès des industries pharmaceutiques. Il m'a également permis de travailler avec Madame Annelise LOBSTEIN, Maître de conférences dans son laboratoire et qui s'est beaucoup investie dans cette thèse, suivant de très près l'avancée des recherches et la rédaction. Je souhaite vivement que ce travail en bonne entente puisse se développer également dans le cadre de futurs programmes de recherche. Mes remerciements vont également à Madame Micheline HAAG, ancien ingénieur de recherche de ce même laboratoire et qui m'a judicieusement conseillée au début de mes travaux sur les plantes médicinales.

Je suis aussi très reconnaissante à :

- Monsieur Philippe GIRARDIN, Directeur de recherches à l'INRA de COLMAR, de m'avoir permis de développer ce thème de recherche sur les plantes médicinales. Initiateur de ce projet et convaincu de l'intérêt de ce type démarche, il a su, par une écoute continuelle et son soutien moral, m'encourager et me diriger tout au long de ce travail ;
- Monsieur Frédérique BOURGAUD, Maître de conférence à l'ENSAIA de NANCY pour les nombreux échanges et conseils que nous avons eus sur ce sujet et avec qui nous pourrions prochainement développer une autre collaboration.
- toute l'équipe de l'INRA de COLMAR qui a participé activement aux expérimentations et sans qui l'ensemble de ce travail n'aurait pu être mené à bien :
  - Monsieur André WERREY, ancien technicien de terrain qui dès mon arrivée à l'INRA en 1990, m'a fait bénéficier de ses connaissances et de sa maîtrise des cultures de plantes médicinales, et avec lequel j'ai pris grand plaisir à travailler ;
  - Claude VONARX, actuel technicien de terrain sur les plantes médicinales.Tous deux ont mis en place et suivi les expérimentations sur le mélilot.
- les différents stagiaires et objecteurs de conscience (Laurent TENAILLON, Eric GSTALDER, ...) qui ont participé à cette étude et ont effectué de nombreuses extractions et dosages.

Mes remerciement vont également à :

- Monsieur TRENDÉL et à Chantal RABOLIN, responsable formation à l'INRA de Colmar pour leur disponibilité face aux problèmes informatiques,
- Christian ROUSSET, technicien efficace pour effectuer divers dépannages, améliorer l'aménagement du Laboratoire d'analyses ou faire des photographies,
- Pascale ZINDY, documentaliste à l'INRA de Colmar, pour son aide précieuse dans les recherches bibliographiques,
- et à tous mes proches qui m'ont aidée et soutenue dans ce travail.

|                                                                                         |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUCTION</b>                                                                  | <b>1</b>  |
| <b>2. BIBLIOGRAPHIE ET CHOIX DES OBJECTIFS DE TRAVAIL</b>                               | <b>4</b>  |
| <b>2.1 MÉTABOLITES PRIMAIRES ET SECONDAIRES DANS LA PLANTE</b>                          | <b>5</b>  |
| 2.1.1 GÉNÉRALITÉS                                                                       | 5         |
| 2.1.2 LE MÉTABOLISME PRIMAIRE                                                           | 6         |
| 2.1.2.1 MÉTABOLISME DU CARBONE                                                          | 7         |
| 2.1.2.2 MÉTABOLISME DE L'AZOTE                                                          | 8         |
| 2.1.3 LE MÉTABOLISME SECONDAIRE                                                         | 9         |
| 2.1.3.1 GÉNÉRALITÉS                                                                     | 9         |
| 2.1.3.1.1 Introduction                                                                  | 9         |
| 2.1.3.1.2 Rôles                                                                         | 10        |
| 2.1.3.1.3 Déterminisme et régulation de la synthèse                                     | 11        |
| 2.1.3.2 LOCALISATION DES MÉTABOLITES SECONDAIRES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DE LA PLANTE | 12        |
| 2.1.3.2.1 Influence de facteurs internes                                                | 12        |
| 2.1.3.2.2 Influence de facteurs externes                                                | 14        |
| 2.1.3.2.2.1 Facteurs biotiques et abiotiques : exemples des stress et de la lumière     | 15        |
| 2.1.3.2.2.2 Techniques culturales                                                       | 20        |
| <b>2.2 LE GENRE <i>MELILOTUS</i></b>                                                    | <b>23</b> |
| 2.2.1 SYSTÉMATIQUE                                                                      | 23        |
| 2.2.2 BIOLOGIE                                                                          | 25        |
| 2.2.2.1 CROISSANCE                                                                      | 25        |
| 2.2.2.1.1 Cycle de la plante                                                            | 25        |
| 2.2.2.1.2 Symbiose avec <i>Rhizobium</i>                                                | 25        |
| 2.2.2.2 REPRODUCTION                                                                    | 26        |
| 2.2.2.2.1 Induction de la floraison                                                     | 26        |
| 2.2.2.2.2 Production de graines                                                         | 26        |
| 2.2.3 AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE                                                            | 27        |
| 2.2.3.1 DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE DE LA TENEUR EN COUMARINES                               | 27        |
| 2.2.3.2 PROGRAMMES DE SÉLECTION                                                         | 29        |
| 2.2.3.3 TENEUR EN DÉRIVÉS COUMARINIQUES ET SENSIBILITÉ AUX AGENTS PATHOGÈNES            | 30        |
| 2.2.4 CULTURE                                                                           | 31        |
| 2.2.4.1 TECHNIQUES CULTURALES                                                           | 31        |
| 2.2.4.1.1 Types de sol et conditions climatiques                                        | 31        |
| 2.2.4.1.2 Dates de semis                                                                | 31        |
| 2.2.4.1.3 Densité                                                                       | 31        |
| 2.2.4.1.4 Récolte                                                                       | 31        |
| 2.2.4.2 AGENTS PATHOGÈNES                                                               | 32        |
| 2.2.4.2.1 Insectes                                                                      | 32        |
| 2.2.4.2.2 Champignons et virus                                                          | 32        |
| 2.2.5 COMPOSITION CHIMIQUE                                                              | 33        |
| 2.2.6 STABILISATION DU MATÉRIEL VÉGÉTAL                                                 | 34        |
| 2.2.7 UTILISATIONS                                                                      | 34        |

|                                                                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.7.1 PLANTE FOURRAGÈRE MELLIFÈRE ET AUTRES USAGES.....                                                                                                 | 34        |
| 2.2.7.2 PLANTE MÉDICINALE .....                                                                                                                           | 35        |
| <b>2.3 LES COUMARINES .....</b>                                                                                                                           | <b>37</b> |
| 2.3.1 GÉNÉRALITÉS .....                                                                                                                                   | 37        |
| 2.3.1.1 DÉFINITION .....                                                                                                                                  | 37        |
| 2.3.1.2 CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES .....                                                                                                          | 37        |
| 2.3.2 VOIE DE BIOSYNTHÈSE .....                                                                                                                           | 38        |
| 2.3.2.1 LA PHÉNYLALANINE AMMONIALYASE.....                                                                                                                | 39        |
| 2.3.2.1.1 Généralités.....                                                                                                                                | 39        |
| 2.3.2.1.2 Structure et localisation.....                                                                                                                  | 39        |
| 2.3.2.1.3 Régulation.....                                                                                                                                 | 40        |
| 2.3.2.1.3.1 Régulation interne.....                                                                                                                       | 40        |
| 2.3.2.1.3.2 Régulation externe.....                                                                                                                       | 40        |
| 2.3.2.2 L'ORTHO-HYDROXYLASE .....                                                                                                                         | 41        |
| 2.3.2.3 LA GLUCOSYL TRANSFÉRASE .....                                                                                                                     | 41        |
| 2.3.2.4 L'ISOMÉRISATION DU GOHCA TRANS EN CIS.....                                                                                                        | 41        |
| 2.3.2.5 LA $\beta$ GLUCOSIDASE .....                                                                                                                      | 42        |
| 2.3.3 LIEUX DE SYNTHÈSE ET DE STOCKAGE.....                                                                                                               | 43        |
| 2.3.3.1 DANS LA PLANTE .....                                                                                                                              | 43        |
| 2.3.3.2 DANS LES TISSUS ET LES CELLULES .....                                                                                                             | 44        |
| 2.3.4 EXTRACTION ET DOSAGE .....                                                                                                                          | 46        |
| 2.3.4.1 EXTRACTION .....                                                                                                                                  | 46        |
| 2.3.4.2 DOSAGE .....                                                                                                                                      | 46        |
| 2.3.5 ACTIVITÉS BIOLOGIQUES ET TOXICITÉ.....                                                                                                              | 47        |
| 2.3.6 UTILISATIONS ET ACTIVITÉS PHARMACOLOGIQUES.....                                                                                                     | 48        |
| <b>2.4 CHOIX DES OBJECTIFS DE TRAVAIL .....</b>                                                                                                           | <b>50</b> |
| <b>3. CONTRIBUTION A L'AMÉLIORATION DES TENEURS ET<br/>RENDEMENTS EN DÉRIVÉS COUMARINIQUES ET EN COUMARINE<br/>LIBRE DE MELILOTUS OFFICINALIS L. ....</b> | <b>51</b> |
| <b>3.1 ÉTUDES PRÉLIMINAIRES : MISES AU POINT TECHNIQUES ET CHOIX DU<br/>MATÉRIEL VÉGÉTAL .....</b>                                                        | <b>53</b> |
| 3.1.1 INFLUENCE DES TECHNIQUES POSTRÉCOLTE SUR LE RENDEMENT EN COUMARINES.....                                                                            | 53        |
| 3.1.1.1 EXTRACTION .....                                                                                                                                  | 54        |
| 3.1.1.1.1 Matériel et méthodes.....                                                                                                                       | 54        |
| 3.1.1.1.2 Résultats et discussion.....                                                                                                                    | 56        |
| 3.1.1.1.2.1 Comparaison de 7 techniques d'extraction .....                                                                                                | 56        |
| 3.1.1.1.2.2 Quantité minimale de matériel végétal nécessaire .....                                                                                        | 57        |
| 3.1.1.1.3 Conclusion.....                                                                                                                                 | 57        |
| 3.1.1.2 SÉCHAGE .....                                                                                                                                     | 58        |
| 3.1.1.2.1 Matériel et méthodes.....                                                                                                                       | 58        |
| 3.1.1.2.2 Résultats et discussion.....                                                                                                                    | 60        |
| 3.1.1.2.2.1 Cinétique de séchage .....                                                                                                                    | 60        |

|                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.1.2.2.2 Influence du séchage sur la teneur en coumarines                                              | 61        |
| 3.1.1.2.3 Conclusion                                                                                      | 64        |
| 3.1.1.3 ISOMÉRISATION DU GOHCA <i>TRANS</i> EN GOHCA <i>CIS</i>                                           | 65        |
| 3.1.1.3.1 Matériel et méthodes                                                                            | 65        |
| 3.1.1.3.2 Résultats et discussion                                                                         | 66        |
| 3.1.1.3.2.1 Dans la plante                                                                                | 66        |
| 3.1.1.3.2.2 Durant le séchage                                                                             | 66        |
| 3.1.1.3.2.3 Durant l'extraction                                                                           | 67        |
| 3.1.1.3.3 Conclusion                                                                                      | 67        |
| 3.1.2 CHOIX DU MATÉRIEL VÉGÉTAL                                                                           | 68        |
| 3.1.2.1 MATÉRIEL ET MÉTHODES                                                                              | 69        |
| 3.1.2.2 RÉSULTATS ET DISCUSSION                                                                           | 70        |
| 3.1.2.2.1 - Étude de la variabilité interorigine                                                          | 70        |
| 3.1.2.2.2 - Étude de la variabilité intra-origine                                                         | 71        |
| 3.1.2.3 CONCLUSION                                                                                        | 72        |
| <b>3.2 AMÉLIORATION PAR LA VOIE AGRONOMIQUE</b>                                                           | <b>73</b> |
| 3.2.1 SYNTHÈSE ET MIGRATION DES COUMARINES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DE <i>MELILOTUS OFFICINALIS</i>      | 73        |
| 3.2.1.1 RÉPARTITION DES COUMARINES DANS LA PLANTE                                                         | 73        |
| 3.2.1.1.1 Matériel et méthodes                                                                            | 73        |
| 3.2.1.1.2 Résultats                                                                                       | 74        |
| 3.2.1.1.3 Discussion                                                                                      | 75        |
| 3.2.1.2 SYNTHÈSE ET MIGRATION DES COUMARINES DANS LE MÉLILOT                                              | 76        |
| 3.2.1.2.1 Matériel et méthodes                                                                            | 76        |
| 3.2.1.2.2 Résultats et discussion                                                                         | 78        |
| 3.2.1.2.2.1 Rendement moyen en matière sèche                                                              | 78        |
| 3.2.1.2.2.2 Teneur en coumarines                                                                          | 79        |
| 3.2.1.2.2.3 Relation entre la teneur en azote et la teneur en coumarines                                  | 81        |
| 3.2.1.2.2.4 Teneurs et rendements en coumarines par organes et par dates de récolte                       | 82        |
| 3.2.1.2.3 Conclusion                                                                                      | 85        |
| 3.2.2 INFLUENCE DE LA DENSITÉ DE PEUPLEMENT SUR LA SYNTHÈSE DE COUMARINES                                 | 87        |
| 3.2.2.1 MATÉRIEL ET MÉTHODES                                                                              | 87        |
| 3.2.2.2 RÉSULTATS                                                                                         | 89        |
| 3.2.2.2.1 Influence de la densité en semis d'automne                                                      | 89        |
| 3.2.2.2.1.1 Stade et poids des plantes en fonction de la date de récolte et de la densité                 | 89        |
| 3.2.2.2.1.2 Teneur en coumarines en fonction de la date de récolte et de la densité                       | 90        |
| 3.2.2.2.1.3 Rendement en coumarines en fonction de la date de récolte et de la densité                    | 91        |
| 3.2.2.2.2 Influence de la densité en repiquage de printemps                                               | 93        |
| 3.2.2.2.2.1 Stade et poids des plantes en fonction de la date de récolte et de la densité                 | 93        |
| 3.2.2.2.2.2 Teneur en coumarines en fonction de la date de récolte et de la densité                       | 94        |
| 3.2.2.2.2.3 Rendement en coumarines par m <sup>2</sup> en fonction de la date de récolte et de la densité | 95        |
| 3.2.2.3 CONCLUSION                                                                                        | 95        |
| 3.2.3 INFLUENCE DE LA LUMIÈRE SUR LA SYNTHÈSE DE COUMARINES                                               | 96        |

|                                                            |            |
|------------------------------------------------------------|------------|
| 3.2.3.1 QUANTITÉ DE LUMIÈRE : OMBRAGE-----                 | 96         |
| 3.2.3.1.1 Matériel et méthodes-----                        | 96         |
| 3.2.3.1.2 Résultats et discussion-----                     | 97         |
| 3.2.3.2 QUALITÉ DE LUMIÈRE : FILTRES-----                  | 98         |
| 3.2.3.2.1 Matériel et méthodes-----                        | 98         |
| 3.2.3.2.2 Résultats et discussion-----                     | 99         |
| 3.2.3.3 CONCLUSION-----                                    | 100        |
| 3.2.4 CONSÉQUENCES AGRONOMIQUES-----                       | 101        |
| 3.2.4.1 TECHNIQUES DE RÉCOLTE-----                         | 101        |
| 3.2.4.1.1 Matériel et méthodes-----                        | 102        |
| 3.2.4.1.2 Résultats et discussion-----                     | 102        |
| 3.2.4.2 DATES ET HAUTEUR DE COUPE SUR SEMIS D'AUTOMNE----- | 103        |
| 3.2.4.2.1 Matériel et méthodes-----                        | 103        |
| 3.2.4.2.2 Résultats et discussion-----                     | 104        |
| 3.2.4.3 STADES DE COUPES SUR SEMIS DE PRINTEMPS-----       | 107        |
| 3.2.4.3.1 Matériel et méthodes-----                        | 107        |
| 3.2.4.3.2 Résultats et discussion-----                     | 107        |
| 3.2.4.4 CONCLUSION-----                                    | 108        |
| 3.3 CONCLUSION GÉNÉRALE-----                               | 110        |
| <b>4. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES-----</b>                 | <b>113</b> |
| <b>5. ANNEXES-----</b>                                     | <b>124</b> |

## LEXIQUE

**Abiotique** : Se dit d'un milieu où la vie est impossible. En écologie, l'expression "facteurs abiotiques" désigne des éléments du milieu (climat, sol, topographie...) qui influencent la vie des êtres vivants.

**Allèles** : Formes possibles d'un même gène\*. Dans la cellule diploïde, chacun des deux allèles est porté par l'un des deux chromosomes appariés.

**Allélopathie** : Capacité de certains végétaux d'empêcher, par l'émission de substances toxiques, le développement d'espèces voisines.

**Annuelle** : Plante qui meurt après avoir fructifié au cours de l'année pendant laquelle elle a germé.

**Autochargeuse** : Machine de récolte mobile, tractée ou semi-portée, qui permet le ramassage de récoltes en vrac ou en balles, laissées au sol, puis le chargement de ces récoltes directement dans une remorque ou la benne d'un tracteur.

**Autocompatibilité** : Phénomène observé chez une plante dont le pollen est capable de féconder l'ovule.

**Biotique** : Relatif à la vie ou permettant le développement de la vie. En écologie, l'expression "facteur biotique" désigne le rapport entre les êtres vivants susceptibles d'influencer un milieu écologique donné.

**Bisannuelle** : Plante qui meurt, après avoir dispersé ses graines, au cours de l'année suivant celle pendant laquelle elle a germé.

**Chimiotype** : Lignée ou variété d'une espèce végétale donnée, caractérisée par une composition chimique particulière.

**Coumarines** : Somme des dérivés coumariniques\* et de la coumarine libre exprimée en coumarine libre.

**Démariage** : Opération d'éclaircissage consistant à enlever les jeunes plantules en surnombre.

**Dérivés coumariniques** : Somme des glucosides de l'acide ortho hydroxycinnamique formes *trans* et *cis* exprimée en coumarine libre.

**Dormance** : État physiologique d'un embryon ou d'une semence qui, bien que placé(e) dans des conditions favorables à sa germination, est incapable de germer.

**Écophysiologie** : Étude de la physiologie des plantes en peuplements.

**Effecteur** : Composé de faible poids moléculaire pouvant réguler des enzymes.

**Effet bordure** : Influence du milieu environnant sur les plantes situées au bord des parcelles.

**Éliciteur** : Substance activant le système de défense de la plante lors d'une infection ou d'un stress, c'est-à-dire induisant la synthèse de phytoalexines\*.

**Ensileuse** : Récolteuse, hacheuse, chargeuse.

**Épistasie** : Terme désignant la dominance d'un gène\* sur tout autre gène non allèle.

**F1** : Première génération.

**Génotype** : Ensemble des gènes\* et de leurs associations, c'est-à-dire ensemble des caractères héréditaires transmis de génération en génération.

**Gène** : Unité de matériel génétique située sur un chromosome et contenant l'information nécessaire à la réalisation d'un caractère génétique spécifique.

**Introgression** : Incorporation graduelle de caractères génétiques étrangers au génome d'une espèce, à la suite d'hybridations naturelles répétées avec une autre espèce.

**Itinéraire technique** : Suite logique et ordonnée des techniques culturales appliquées à une espèce végétale cultivée depuis le semis jusqu'à la récolte.

**Loci** (pluriel de **locus**) : Position d'un gène donné sur un chromosome.

**Morphogénèse** : Développement des formes et des structures des organismes.

**Ontogénèse** : Histoire du développement d'un individu.

**Panmixie** : Terme génétique désignant une population dont les individus échangent librement leurs gènes.

**Pharmacognosie** (de *gnosis* connaissance et *pharmacon* poison ou médicament suivant la dose) : Discipline scientifique étudiant les produits naturels comme source potentielle de médicaments.

**Phénotype** : Manifestation externe ou apparente des caractères héréditaires contrôlés par les gènes\*. Il ne faut pas confondre le phénotype avec le génotype\* qui correspond à l'ensemble des gènes du patrimoine héréditaire.

**Phloème** (de *phloios* : écorce d'un arbre) : Organe qui véhicule la sève élaborée constitué de *tubes criblés*\*.

**Photomorphogénèse** : Contrôle par la qualité de la lumière de la croissance et du développement des plantes indépendamment de la photosynthèse.

**Photopériode** : Alternance de périodes lumineuses et de périodes obscures.

**Phytochrome** : Pigment photorécepteur végétal contrôlant de nombreux phénomènes biologiques (germination de certaines semences, photopériodisme floral, synthèse d'enzymes...).

**Phytoalexine** (de *alexein* : défendre) : Substance produite par les plantes en réponse à un agent pathogène.

**Plantes en C<sub>3</sub>** : Métabolisme des végétaux fixant initialement le CO<sub>2</sub> à la lumière sur le ribulose-diphosphate, avec formation de phosphoglycérate.

**Plantes en C<sub>4</sub>** : Métabolisme des végétaux fixant initialement le CO<sub>2</sub> à la lumière par  $\beta$ -carboxylation du phosphoénolpyruvate, avec formation d'oxaloacétate.

**Pléiotropie** : Terme de génétique désignant la production d'effets multiples et apparemment sans relation d'un gène au niveau du phénotype. C'est une manifestation du métabolisme cellulaire.

**Polyploïde** : Plante dans laquelle les cellules contiennent plus de deux génomes homologues : elles peuvent contenir 3N chromosomes (triploïdes) ou 4N (tétraploïdes).

**Rétrocroisements** : Terme désignant l'introgression\* génétique à l'intérieur d'une espèce pour un ou quelques gène(s). Le caractère favorable recherché est introduit par croisement de la variété à améliorer par la variété donneuse, puis une série de croisements en retour permet de retrouver le génotype initial ayant incorporé le ou les gène(s) correcteur(s).

**Thylakoïdes** : Systèmes de membranes qui se trouvent libres dans le cytosol (dans les bactéries photomorphes, les cyanobactéries), ou sont arrangés à l'intérieur des chromatophores ou des chloroplastes (dans les algues, les plantes supérieures).

**Transcription** : Processus par lequel la séquence d'un gène est copiée en ARN.

**Transformé** : Se dit d'un être vivant ayant subi une transformation c'est-à-dire une modification du patrimoine génétique d'un individu par apport artificiel d'ADN d'un autre.

**Tubes criblés** : Éléments conducteurs de la sève élaborée situés au niveau du phloème et constitués de files de cellules vivantes, étroites, allongées, dont les parois contiguës sont percées d'ouvertures laissant passer le flux de sève.

**Turnover** : Processus de synthèse et de dégradation de molécules dans les cellules.

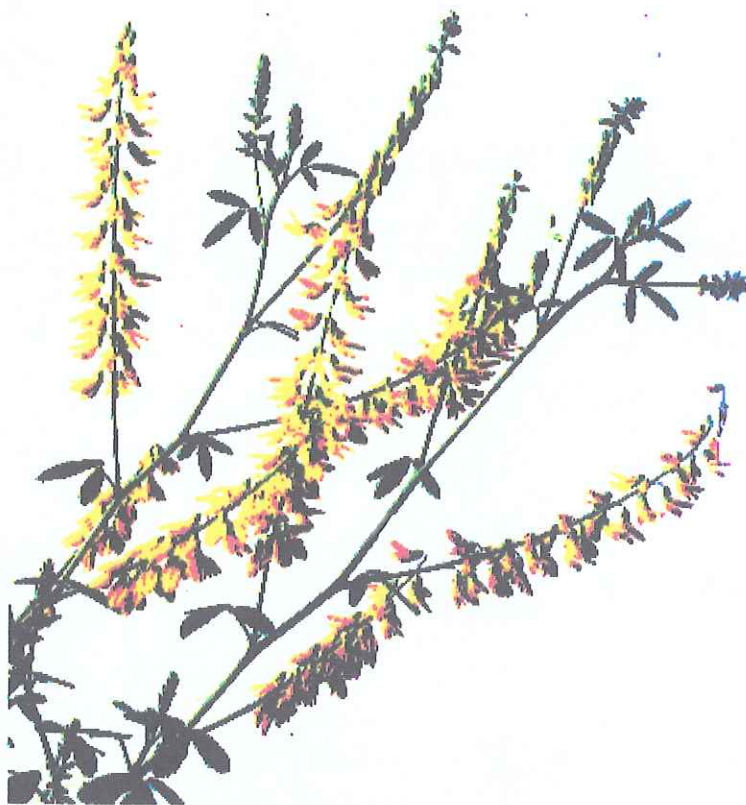
**Unité fertilisante** : Unité utilisée en fertilisation qui permet d'exprimer la quantité d'élément fertilisant (N, P, K, Mg,...) contenu dans un engrais Exemple 100 Kg d'ammonitrate contiennent 33 Kg d'azote ou 33 unités fertilisantes de N (33N).

**Zéro végétatif** : Température à laquelle une espèce ne se développe plus.

## ABREVIATIONS

|                |                                                                    |
|----------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>A.G. :</b>  | Acide gibbérélique                                                 |
| <b>ABA :</b>   | Acide abscissique                                                  |
| <b>ANOVA :</b> | Analyse de variance                                                |
| <b>AOC :</b>   | Acide ortho hydroxycinnamique                                      |
| <b>ARNm :</b>  | Acide ribo nucléique messenger                                     |
| <b>ATP :</b>   | Adénosine tri phosphate                                            |
| <b>CHS :</b>   | Chalcone synthase                                                  |
| <b>GOHCA :</b> | Glucoside de l'acide ortho hydroxycinnamique                       |
| <b>E.T. :</b>  | Écart type                                                         |
| <b>MS :</b>    | Matière sèche                                                      |
| <b>N :</b>     | Nombre de chromosomes constituant le génome de base d'un individu. |
| <b>NADPH :</b> | Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate                        |
| <b>PAL :</b>   | Phénylalanine ammonia lyase                                        |
| <b>PAR :</b>   | Rayonnement photosynthétiquement actif                             |
| <b>PS :</b>    | Poids sec                                                          |
| <b>Rdt :</b>   | Rendement                                                          |
| <b>UGDP :</b>  | Uridine diphosphate glucose                                        |

# Introduction



Près de 80 % de la population mondiale utilise uniquement des plantes médicinales pour se soigner (SEVENET, 1994). Actuellement, les substances naturelles d'origine végétale représentent près de 40 % des médicaments, les 60 % restants étant issus de synthèse. Ces derniers sont souvent nés de modifications chimiques de molécules naturelles ou de parties de ces molécules.

Ces constatations justifient les importants programmes nationaux et internationaux menés pour recenser les plantes et leurs usages médicaux dans différentes régions du monde (WJSEKERA, 1991). Par ailleurs, l'attrait des populations occidentales pour les produits dits "naturels" a eu pour conséquence un regain d'intérêt pour les *plantes médicinales* à partir du milieu des années 70. Le développement de leur production dans l'industrie pharmaceutique passe par une bonne connaissance et une bonne maîtrise de leur *qualité*. C'est pourquoi, le Ministère de la Santé français et les laboratoires pharmaceutiques font de gros efforts pour codifier et faire respecter :

- la *qualité de la matière première*,
- les *normes de qualité des produits utilisés en phytothérapie*.

L'efficacité thérapeutique d'une drogue végétale *dépend de ses principes actifs* dont la teneur dans la plante peut varier notamment selon :

- le *biotope*,
- le *choix de chimiotypes*\* <sup>1</sup>,
- les *techniques culturales*,
- les *techniques postrécolte*.

De plus, les potentialités pharmacologiques d'une drogue végétale peuvent plus ou moins s'exprimer suivant les techniques d'*extraction* utilisées (MORTIER, 1990).

Le travail engagé depuis 1990 par l'équipe "Plantes Médicinales" de l'INRA de Colmar vise :

- d'un point de vue *fondamental*,

- \* à rechercher et maîtriser les principaux facteurs influant sur la synthèse des métabolites secondaires correspondant aux principes actifs de plantes médicinales ;

- d'un point de vue *appliqué*,

- \* à permettre la production en France de plantes médicinales de qualité, c'est-à-dire ayant une forte teneur en principes actifs ;
- \* à contribuer ponctuellement à la diversification de la production agricole et à la valorisation des jachères.

---

<sup>1</sup> \* Voir la définition dans le lexique

## Etudes préliminaires

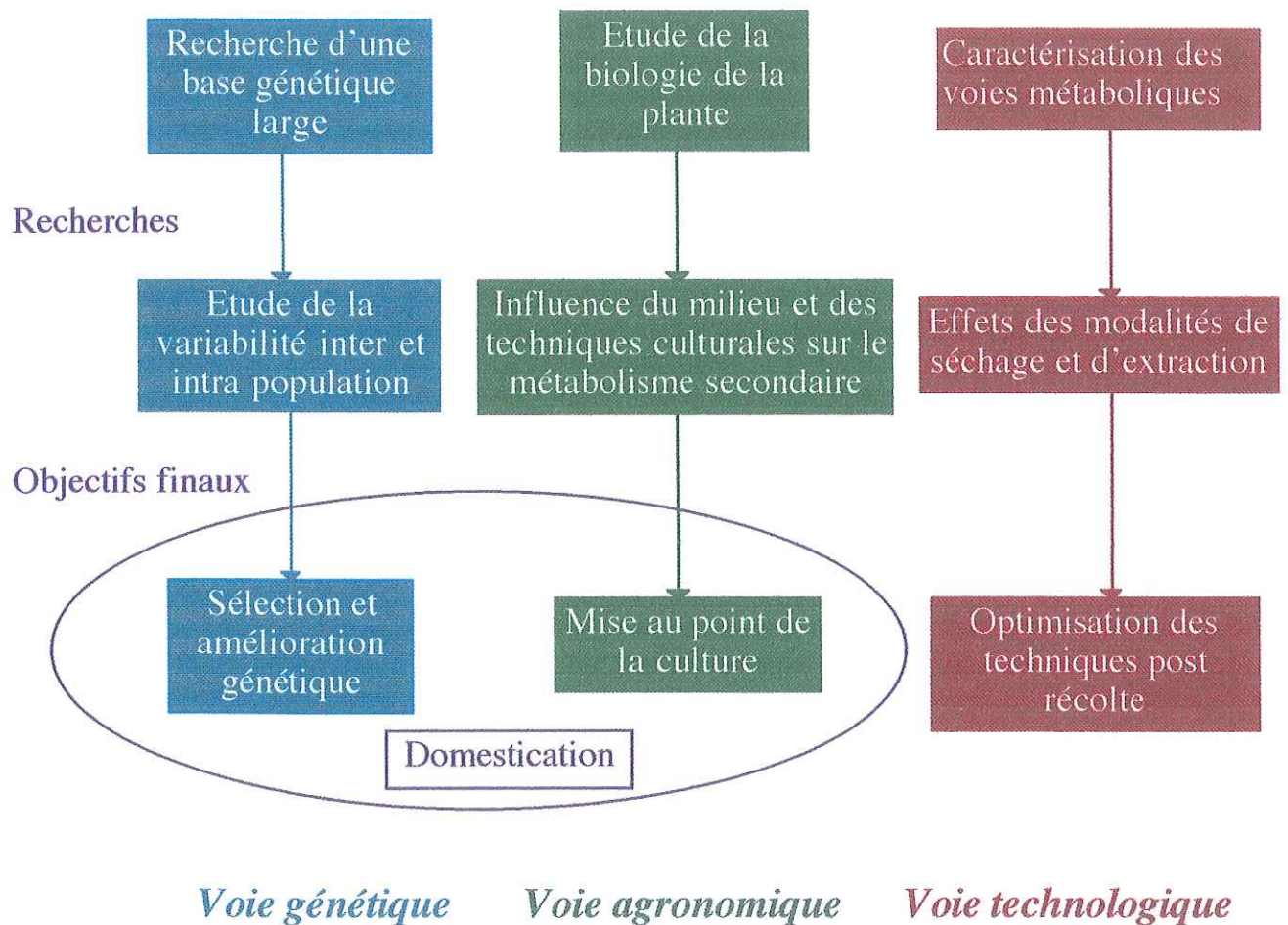


Figure 1 : Démarche générale entreprise en vue d'améliorer la qualité d'une plante médicinale

L'intérêt scientifique du travail développé par cette équipe réside dans la *mise au point d'une démarche de recherche*, éventuellement généralisable, visant à produire une drogue de qualité.

Plusieurs voies de recherche sont impliquées dans ce travail (**Figure 1**):

- la voie génétique,
- la voie agronomique,
- la voie technologique.

Le choix des plantes faisant l'objet de ces travaux est principalement lié :

- aux besoins des industriels,
- à la connaissance précise des molécules recherchées,
- aux possibilités de dosage des principes actifs,
- aux connaissances déjà acquises, notamment sur les voies de biosynthèse.

C'est dans ce cadre que le *programme de recherche sur le mélilot* a été mis en place en 1990. Il a pour objectif d'améliorer les teneurs et les rendements en dérivés coumariniques et en coumarine libre de *Melilotus officinalis* L., (Fabaceae) en vue d'une utilisation pharmaceutique.

Le principe actif du mélilot est la coumarine libre particulièrement utilisée en tant que *veinotonique*. Cependant, cette molécule n'existe pas en tant que telle dans le mélilot frais. Elle se trouve sous forme de *glucosides d'acide ortho hydroxycinnamique (GOHCA)* *trans* et *cis*. Nous désignerons, dans le cadre de ce travail et lorsqu'il s'agira du mélilot, les termes :

- *dérivés coumariniques* comme étant la somme de ces deux glucosides, exprimée en coumarine libre ;
- *coumarines* comme la somme des dérivés coumariniques et de la *coumarine libre*.

Le principal objectif a donc été d'améliorer la *qualité du matériel végétal produit*, à savoir sa teneur en coumarine libre. Bien qu'une monographie sur le mélilot existe dans la pharmacopée française de 1989, celle-ci ne définit pas la teneur minimale en coumarine libre contenue dans le matériel végétal (Annexe 1). Au vu d'études préalables, la teneur minimale a été fixée à 0,7% par l'industriel, qui a conclu un contrat de recherche, en accord avec l'INRA.

La "*filière du mélilot*" concerne essentiellement trois grands secteurs dans lesquels la notion de qualité s'exprime différemment :

- **le producteur** : il doit répondre au cahier des charges de la pharmacopée, c'est-à-dire produire du matériel végétal constitué uniquement des parties aériennes de *Melilotus officinalis* L. récolté à la floraison et séché.

Généralement payé au kilogramme de matériel sec, son objectif visera l'augmentation des rendements en matière sèche/hectare. Il n'avait jusqu'en 1994 aucune contrainte quant à la teneur en coumarine libre de la plante ;

- **l'industrie d'extraction** : elle se doit de produire un extrait (généralement hydro-alcoolique ou sec) de *Melilotus officinalis* L. à teneur définie en coumarine libre (jusqu'à 20%), indemne de composés toxiques comme les pesticides ou les métaux lourds ;

- **l'industrie pharmaceutique** qui produit un médicament ayant fait l'objet d'une autorisation de mise sur le marché (document confidentiel dans lequel sont définies la technique de production du médicament, la teneur en coumarine libre, la qualité bactériologique...).

Les contraintes techniques, les intérêts divergents et le manque de communication entre les différents partenaires de la filière expliquent la mauvaise maîtrise de la qualité du mélilot.

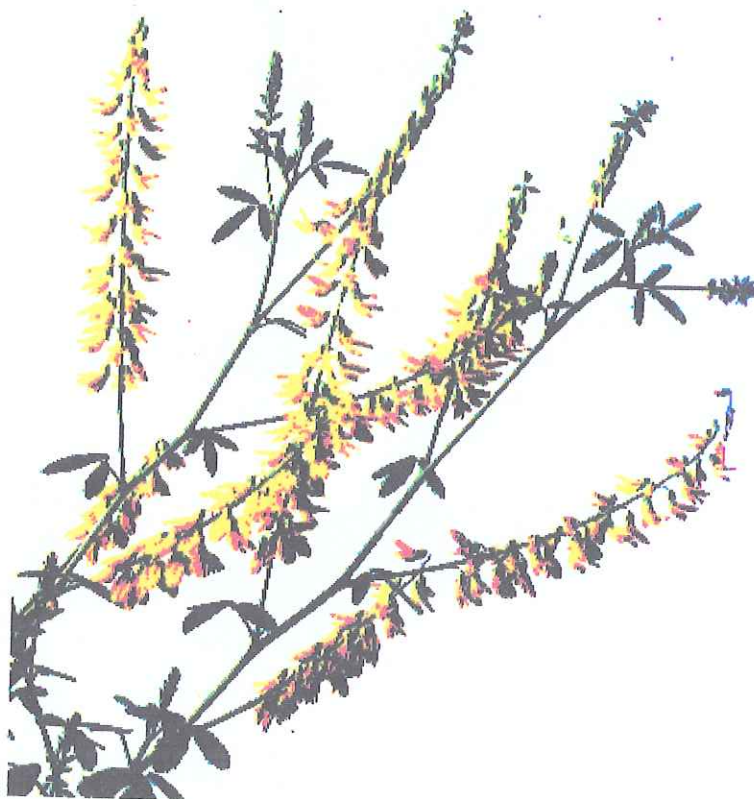
Devant l'hétérogénéité du matériel importé ou produit en France, l'industrie d'extraction recherche du mélilot de qualité homogène et définie. *Le matériel végétal actuellement fourni à l'industrie présente des teneurs variables et faibles, pratiquement toujours inférieures à 0,3% de coumarine libre.* Les fabricants d'extrait cherchent à obtenir des producteurs du matériel végétal à plus forte teneur en coumarine libre.

Aussi, cette étude vise-t-elle à intégrer les diverses contraintes imposées à chacun de ces secteurs de production tout en gardant pour principal objectif la production d'extrait à forte teneur en coumarine libre.

*L'objectif appliqué de cette étude est de définir un "itinéraire technique" permettant au producteur de maîtriser la production de matière sèche de mélilot contenant un minimum de 0,7% de coumarine libre.*

*Cet objectif ne pourra être atteint que s'il est possible d'avancer dans la compréhension des mécanismes de répartition des dérivés coumariniques dans le mélilot au cours de son cycle et de tester l'influence de facteurs externes sur leur synthèse. C'est l'objectif scientifique de ce programme de recherche.*

# Bibliographie et choix des objectifs de travail



L'étendue et la diversité des domaines de recherche abordés dans ce travail nous amènent dans un premier temps à faire le point sur certains aspects généraux du métabolisme primaire et secondaire des végétaux. Ceci afin de pouvoir disposer dans un second temps des éléments de connaissances nécessaires à une présentation détaillée de la plante étudiée et de son principe actif.

## 2.1 MÉTABOLITES PRIMAIRES ET SECONDAIRES DANS LA PLANTE

La plupart des principes actifs des plantes médicinales sont des métabolites secondaires. Le métabolisme secondaire est beaucoup moins bien connu que le métabolisme primaire. Cependant, une bonne maîtrise de la production de molécules naturelles d'intérêt pharmaceutique implique d'approfondir cette connaissance par des recherches faisant intervenir plusieurs disciplines scientifiques et différents niveaux d'organisation :

- le niveau *moléculaire*, lorsqu'il s'agit d'étudier les molécules mises en oeuvre dans les voies de biosynthèse des principes actifs ;
- le niveau *enzymatique*, afin d'étudier les étapes concernant la biosynthèse de ces composés ;
- le niveau *génomique*, dans le cas d'études fines sur le déterminisme de la synthèse et la régulation de la production de ces molécules ;
- les niveaux *cellulaire* et *histologique*, en ce qui concerne la recherche des lieux de synthèse et de répartition des métabolites secondaires dans la plante au cours de son développement ;
- la *plante* ou son *peuplement*, pour pouvoir étudier la production des métabolites secondaires et les interactions entre leur synthèse et les facteurs du milieu.

*Nous n'avons pas ici l'ambition de présenter de manière approfondie le métabolisme secondaire dans ses différents niveaux d'organisation mais de donner des éléments de réflexion permettant une meilleure compréhension de ce métabolisme, de façon "intégrée".*

### 2.1.1 GÉNÉRALITÉS

Les liens étroits existant entre le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire ainsi que le manque de connaissances sur la localisation des métabolites secondaires dans la plante au cours de son développement, nous ont conduits à présenter certaines caractéristiques de ces deux voies métaboliques, dans le but de pouvoir comparer ponctuellement leur fonctionnement.

Les *métabolites primaires* existent dans tous les organismes. Indispensables à la vie de la plante, ils sont présents dans chaque cellule pouvant se diviser.

Ce sont :

- les **glucides** et leurs dérivés, représentant principalement :
  - des éléments de soutien participant à la structure des organismes (cellulose, polysaccharides ...),
  - des réserves énergétiques (amidon) ;
- les **acides aminés, peptides et protéines**. Les acides aminés sont les éléments constitutifs des protéines structurales et enzymatiques. Ils donnent également naissance à une large gamme de métabolites secondaires ;
- les **acides nucléiques**. Ils sont constitués de nucléotides formés de l'union d'une base purique et pyrimidique avec un ose et de l'acide phosphorique ;
- les **lipides** qui sont les constituants des structures cellulaires comme les phospho- et les glyco-lipides membranaires ou des éléments de revêtement comme les cires ou des substances de réserve.

La distinction entre métabolites primaires et *métabolites secondaires* a été introduite par CZAPEK (1913-1921). Par la suite, plusieurs auteurs ont tenté de définir de façon plus fine cette notion (PAECH, 1950 ; ZENK, 1967 ; GEISSMAN et CROUT, 1969 ; LUCKNER, 1969).

Les métabolites secondaires sont ainsi qualifiés car ils *ne semblent pas rigoureusement indispensables à la croissance et au développement des individus qui les produisent*. Ils sont *définis par opposition aux métabolites primaires* et sont synthétisés à partir de molécules issues de ce métabolisme.

### 2.1.2 LE MÉTABOLISME PRIMAIRE

Durant tout le développement de la plante, les mécanismes de gestion du carbone et de l'azote sont des facteurs déterminants pour la productivité des végétaux. Les molécules issues de la photosynthèse sont véhiculées et distribuées aux différentes parties de la plante pour assurer leur croissance ou pour être stockées sous forme de réserves. Le transport de ces molécules sur de longues distances n'est encore pas totalement élucidé (KOMOR, 1983).

Les organes de la plante producteurs d'assimilats sont appelés *source* alors que les organes récepteurs sont appelés *puits*.

Les *relations source - puits* sont fondamentales en *écophysiologie* car elles déterminent à la fois la production en matière sèche d'un organe donné de la plante et la qualité de cette matière sèche, tout particulièrement lorsqu'il s'agit d'organes de réserve.

Nous présenterons ici succinctement des éléments de compréhension du métabolisme du carbone et de l'azote qui nous paraissent importants. Ce choix repose sur deux constatations :

- d'une part, ces deux grandes voies métaboliques offrent des caractéristiques spécifiques actuellement bien connues (contrairement aux mécanismes impliqués dans la gestion des métabolites secondaires) ;

- d'autre part, la synthèse des métabolites secondaires découle de ces deux voies métaboliques. Il pourrait donc exister des similitudes quant à leur mode de fonctionnement.

#### 2.1.2.1 MÉTABOLISME DU CARBONE

Chez les plantes supérieures, les dérivés photosynthétiques sont généralement *transportés* dans le phloème\* sous la forme de sucres *par des cellules spécialisées* (tubes criblés\*) vers les apex en croissance ou les organes de réserve. L'activité photosynthétique des plantes est sous l'influence de facteurs du milieu (lumière, température, vent, eau, etc.) mais elle est également régie par des facteurs internes liés à la physiologie de la plante.

De nombreuses études ont été menées sur ce sujet en général par apport et suivi de molécules marquées ou réduction ou suppression des puits. Elles ont mis en évidence que :

- *l'activité photosynthétique d'une feuille est en partie contrôlée par la demande des organes en croissance (puits)* ; cela se traduit par un appel d'assimilats en provenance de la source vers le puits. Ainsi, chez le maïs, les organes de la partie supérieure de la plante en croissance renouvelleront plus leur carbone que les organes de la base qui ont fini de se développer (CLIQUET, 1990), alors que chez le trèfle, c'est le stolon qui constitue l'organe *puits* le plus important (HARVEY, 1970). Il régit le flux d'assimilats vers l'apex et les nodosités (ROBIN, 1987) ;

- *la capacité photosynthétique des feuilles (source) change durant le développement de la plante*. Les feuilles les plus âgées contribuent moins au gain en carbone de l'ensemble de la plante en raison de la réduction de leurs capacités photosynthétiques et/ou à cause de leurs positions dans le couvert (pour le maïs GIRARDIN *et al.*, 1985 ; pour le trèfle, ROBIN, 1987) ;

- *la force d'un organe puits est variable durant la croissance de la plante* (SCHULZ, 1993) ; elle *est influencée par des facteurs environnementaux*. Chez le maïs, la vitesse de migration des assimilats double à la lumière et dépend de la durée de la période obscure précédente. Chez la tomate, la vitesse de migration est réduite de 15 à 30% lorsque les fruits sont enlevés ou lorsqu'il y a un refroidissement de 26°C à 10°C (MOORBY, 1974) ;

- *la vitesse de migration des métabolites primaires de la source vers le puits peut expliquer une partie des différences variétales* comme l'ont montré LIU (1973) chez le haricot, PONELEIT et EGLI (1979) et CAPITANIO *et al.* (1983) chez le maïs.

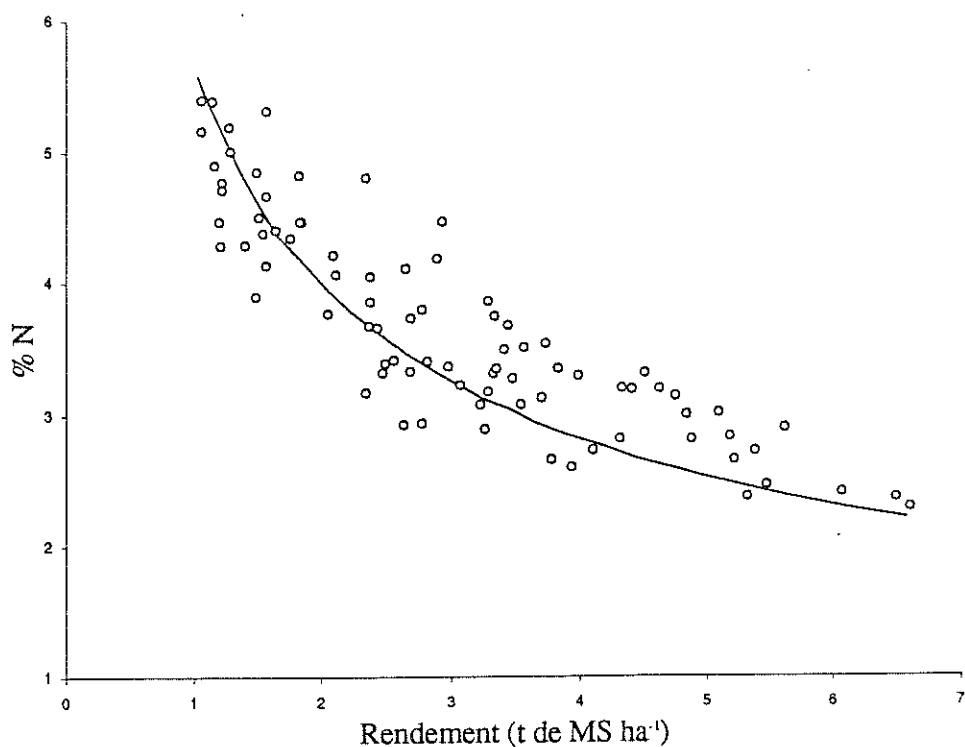


Figure 2 : Pourcentage d'azote dans les parties aériennes de luzerne en fonction du rendement (GREENWOOD, 1990)

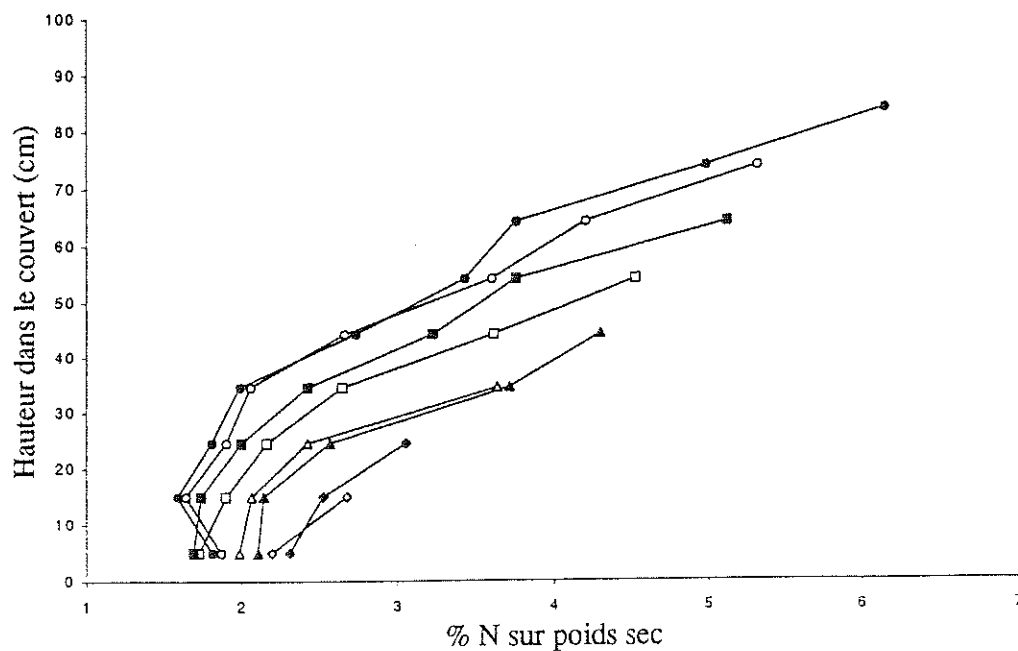


Figure 3 : Pourcentage d'azote dans les parties aériennes de luzerne en fonction de la hauteur dans le couvert (LEMAIRE, 1991)

### 2.1.2.2 MÉTABOLISME DE L'AZOTE

De nombreuses études ont également été menées sur la répartition et le stockage de l'azote dans la plante. L'accumulation d'azote est liée à la production de matière sèche (JULIER, 1993). En effet, la photosynthèse qui permet la formation de biomasse est aussi une source de pouvoir réducteur et de chaînes carbonées pour l'assimilation de l'azote minéral  $N_2$ ,  $NO_3^-$  et  $NH_4^+$  (CHAMPIGNY, 1982).

*Dans les premiers stades de développement des plantes, la répartition de l'azote est considérée comme homogène. Puis, elle n'est plus uniforme dans les parties aériennes mais en relation avec le niveau de l'organe dans le couvert végétal* (LEMAIRE, 1991).

De plus, le pourcentage d'azote diminue avec l'augmentation du poids sec (**Figure 2**) (pour le maïs GIRARDIN *et al.*, 1985 ; pour la luzerne, GREENWOOD, 1990). GREENWOOD (1990) montre que cette relation est différente pour les plantes en  $C_3^*$  et les plantes en  $C_4^*$ . LEMAIRE (1991) corrèle la diminution de teneur dans les feuilles avec l'intensité lumineuse (**Figure 3**). Elle est parallèle à la distribution verticale de la lumière au sein du couvert. L'azote est plus concentré dans les feuilles positionnées à la surface du couvert où l'intensité lumineuse est maximale et diminue avec celle-ci. La plante semble distribuer l'azote au sein du couvert de façon à maximiser l'efficacité de la photosynthèse.

Cependant, la *teneur en azote diminue aussi avec l'âge dans le cas de feuilles éclairées. Il est donc difficile de séparer "l'effet lumière" de "l'effet âge"* (GREENWOOD, 1990 ; LEMAIRE, 1991).

*L'activité du métabolisme primaire (carbone et azote) détermine la croissance de la plante. Sous l'influence de facteurs internes et externes, les différentes molécules produites par la photosynthèse ou assimilées sous forme minérale ou organique sont dégradées, véhiculées et/ou stockées. Le transport d'assimilats des organes source vers les organes puits dépend notamment de l'intensité lumineuse et de l'âge de la plante.*

Le métabolisme secondaire étant directement lié au métabolisme primaire, les paramètres régulant ou modifiant ce dernier peuvent se répercuter sur la production, le transport, le stockage des métabolites secondaires.

| Classes                        | Nombre de molécules connues (approx.) | Distribution<br>au sein<br>- du règne végétal<br>- dans la plante                       | Caractéristiques principales                        |
|--------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>COMPOSES AZOTÉS</b>         |                                       |                                                                                         |                                                     |
| Alcaloïdes                     | 7 000                                 | Courants chez les Angiospermes.<br>Surtout dans les racines, les feuilles et les fruits | La plupart toxiques, à goût amer                    |
| Amines                         | 100                                   | Courants chez les Angiospermes.<br>Souvent dans les fleurs                              | Odeur désagréable<br>Certains hallucinogènes        |
| Acides aminés (non protéiques) | 400                                   | Surtout dans les semences des Fabacées mais relativement répandus                       | La plupart toxiques                                 |
| Glucosides cyanogéniques       | 30                                    | Sporadiques, surtout dans les fruits et les feuilles                                    | Toxiques                                            |
| Glucosinates                   | 100                                   | Chez les Brassicacées (et dix autres familles)                                          | Acres et amers (comme les isothiocyanates)          |
| <b>TERPÈNES</b>                |                                       |                                                                                         |                                                     |
| Monoterpènes                   | 1000                                  | Courants dans les huiles essentielles                                                   | Odeur agréable                                      |
| Sesquiterpènes lactones        | 600                                   | Principalement dans les Astéracées mais aussi dans les Angiospermes                     | Certains amers et toxiques, également allergéniques |
| Diterpénoïdes                  | 1000                                  | Surtout dans le latex et les résines                                                    | Certains toxiques                                   |
| Saponines                      | 500                                   | Dans environ 70 familles végétales                                                      | Pouvoir hémolytique, tensioactif                    |
| Limonoïdes                     | 100                                   | Principalement dans les Rutacées, Méliacées et Simaroubacées                            | Goût amer                                           |
| Cucubitacines                  | 50                                    | Principalement chez les Cucurbitacées                                                   | Goût amer, toxiques                                 |
| Cardénolides                   | 150                                   | Surtout communs aux Apocynacées, Asclépiadacées et Scrophulariacées                     | Cardiotoniques                                      |
| <b>COMPOSÉS PHÉNOLIQUES</b>    |                                       |                                                                                         |                                                     |
| Phénols simples                | 200                                   | Toujours dans les feuilles, souvent dans les autres tissus                              | Antibactériens                                      |
| Flavonoïdes                    | 1000                                  | Toujours chez les Angiospermes, Gymnospermes et Fougères                                | Souvent colorants                                   |
| Quinones                       | 350                                   | Courants chez les Rhamnacées                                                            | Colorants                                           |
| <b>AUTRES</b>                  |                                       |                                                                                         |                                                     |
| Polyacétylènes                 | 650                                   | Principalement chez les Astéracées                                                      | Certains toxiques                                   |

Tableau 1 : Les principales classes de métabolites secondaires des végétaux (HARBORNE, 1982)

## 2.1.3 LE MÉTABOLISME SECONDAIRE

### 2.1.3.1 GÉNÉRALITÉS

#### 2.1.3.1.1 Introduction

L'étude du métabolisme secondaire des plantes supérieures a près de 200 ans d'histoire. Cependant, ce n'est que depuis 30 à 40 ans que sa connaissance a pu être approfondie du fait de l'apparition de nouvelles techniques d'analyse et d'identification (chromatographies en phase liquide, en phase gazeuse, de masse, résonance magnétique nucléaire, etc.).

Chaque jour, 5 à 7 nouveaux métabolites secondaires sont découverts dans le monde alors que le nombre d'espèces de plantes dont ils sont issus n'excède pas les 10 à 15 % du nombre total d'espèces connues (environ 30 000) (NOSOV, 1994).

Les principales classes de métabolites secondaires sont présentées **Tableau 1**.

Ces molécules peuvent avoir des structures très différentes et souvent complexes. La classification des métabolites secondaires s'effectue en général en fonction de leurs structures chimiques :

\* *les alcaloïdes*. Ce terme a été introduit par MEISNER au début du XIX<sup>e</sup> siècle pour désigner des substances naturelles agissant comme des bases, les *alcalis*. Il n'existe pas de définition simple et précise des alcaloïdes et il est parfois difficile de situer les frontières qui séparent les alcaloïdes des autres métabolites naturels. Initialement définis comme des *substances azotées basiques, d'origine naturelle* et de distribution restreinte, les alcaloïdes peuvent avoir une *structure complexe*. Leur atome d'azote est inclus dans une structure hétérocyclique. Ils existent à l'état de sels et sont *biosynthétiquement formés à partir d'un acide aminé*.

Ils possèdent souvent une *activité pharmacologique importante*. La connaissance de la toxicité et des propriétés des plantes et des drogues à alcaloïdes est très ancienne : opium, coca, aconit, belladone, colchique... aussi bien que quinquina, ipéca ou curares sont employés depuis plusieurs siècles voire pour certaines depuis des millénaires (BRUNETON, 1993).

\* *les terpénoïdes et les stéroïdes*. Ils sont tous formés par l'assemblage d'un nombre entier d'unités pentacarbonées, ramifiées, dérivées du 2-méthylbutadiène. La grande majorité des terpènes est spécifique du règne végétal mais il est possible d'en rencontrer chez les animaux : phéromones ou hormones juvéniles par exemple. Ce sont généralement des molécules colorantes ou ayant une forte odeur comme le camphre ou le géraniol. Les stéroïdes végétaux comme les triterpènes sont issus - via le squalène - du mévalonate. Leur structure "signe" souvent leur spécificité végétale : cardénolides cardiotoniques, alcamines stéroïdiques, saponosides, phytostérols... (BRUNETON, 1993).

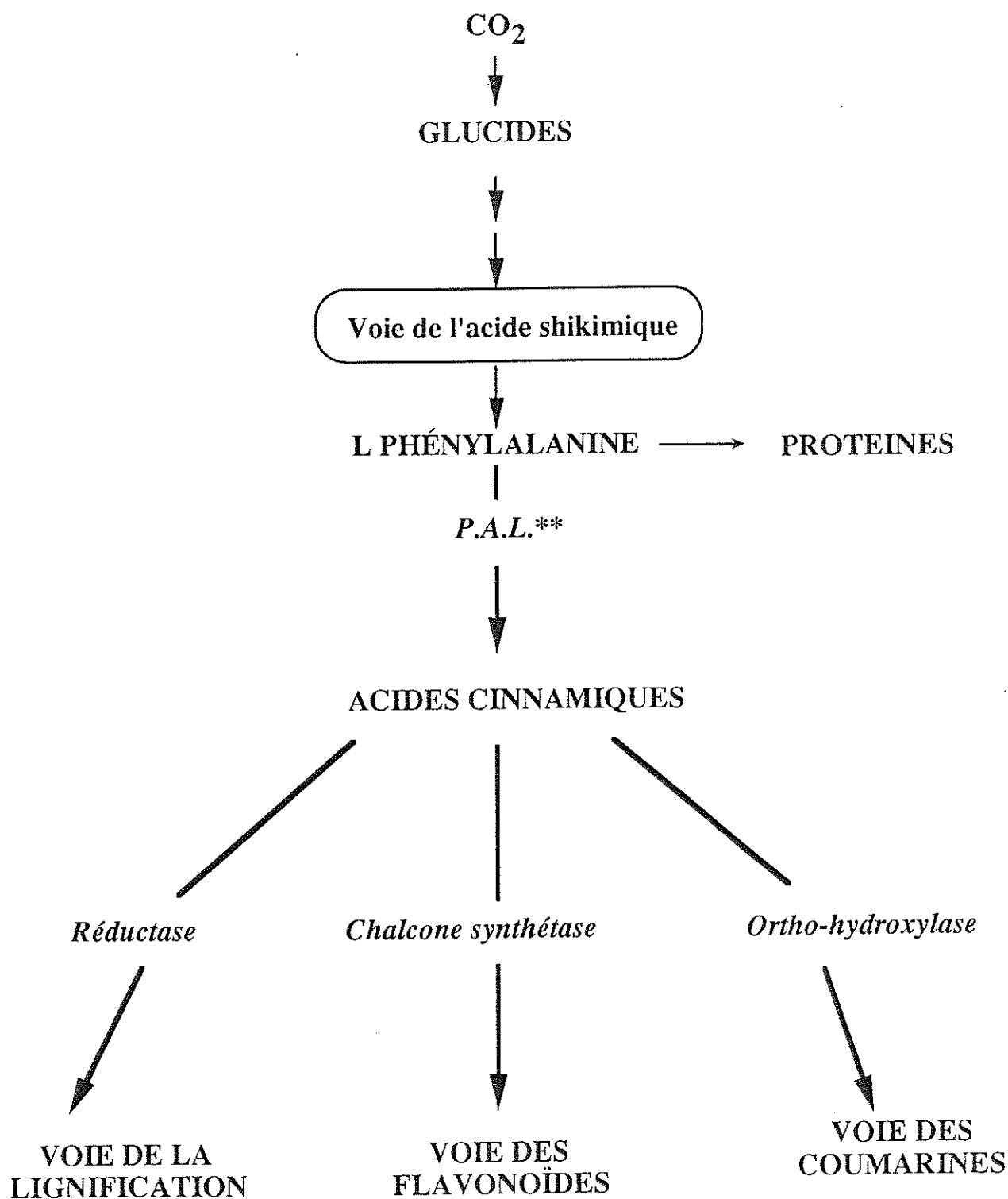


Figure 4 : Schéma simplifié du lien existant entre le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire (cas des phénylpropanoïdes)

\*\* Voir la définition dans les abréviations

\* *les composés phénoliques* ou *phénylpropanoïdes*. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside. Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagenèse :

- la plus courante conduit à partir de l'acide shikimique aux oses et aux acides aromatiques (phénylalanine, tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acides benzoïques, acétophénones, lignanes, coumarines.... (Figure 4)
- l'autre voie part de l'acétate et conduit à des poly- $\beta$ -cétoesters de longueur variable, les *polyacétates*, qui engendrent par cyclisation des composés à plusieurs cycles : chromones, isocoumarines, xanthones, quinones...

Les métabolites secondaires ont tendance à être synthétisés une fois la croissance active arrêtée, souvent au moment où les caractères morphologiques spécifiques deviennent apparents (phases de différenciation) (BENETT, 1995). La production de ces molécules peut être plus ou moins active suivant les conditions d'alimentation carbonée et l'état physiologique des plantes (WIERMANN, 1981).

Certains de ces métabolites secondaires sont toxiques, à forte concentration, pour la plante ou les cellules qui les synthétise(nt). C'est pourquoi ces plantes accumulent ces produits dans les vacuoles, des cavités cellulaires ou bien les excrètent dans des poils glandulaires et/ou à la surface de la cuticule des feuilles ou des jeunes tiges (SCHNEPF, 1969). Un autre moyen pour la plante de détoxifier ces molécules est de les lier à un métabolite primaire (sucre,...).

#### 2.1.3.1.2 Rôles

Les métabolites secondaires ne semblent pas jouer un rôle essentiel dans les végétaux qui les produisent. Plusieurs hypothèses ont cependant été émises :

- \* ces molécules seraient les *déchets* du métabolisme primaire et correspondraient à des molécules de fin de voies de biosynthèse. Ce concept est basé sur l'accumulation et le stockage de ces composés dans les vacuoles et leur excrétion par les plantes (MORITZ et FROHNE, 1967).
- \* les métabolites secondaires seraient produits en tant qu'*alternative au métabolisme primaire*. Cette hypothèse est liée au nombre important des voies métaboliques impliquées dans le cadre du métabolisme primaire (exemple la respiration) et explique la formation de métabolites secondaires par la faible efficacité de certaines de ces voies (MOTHES, 1980). Le métabolisme secondaire correspondrait alors en quelque sorte au prix à payer par la plante pour sa stabilité.

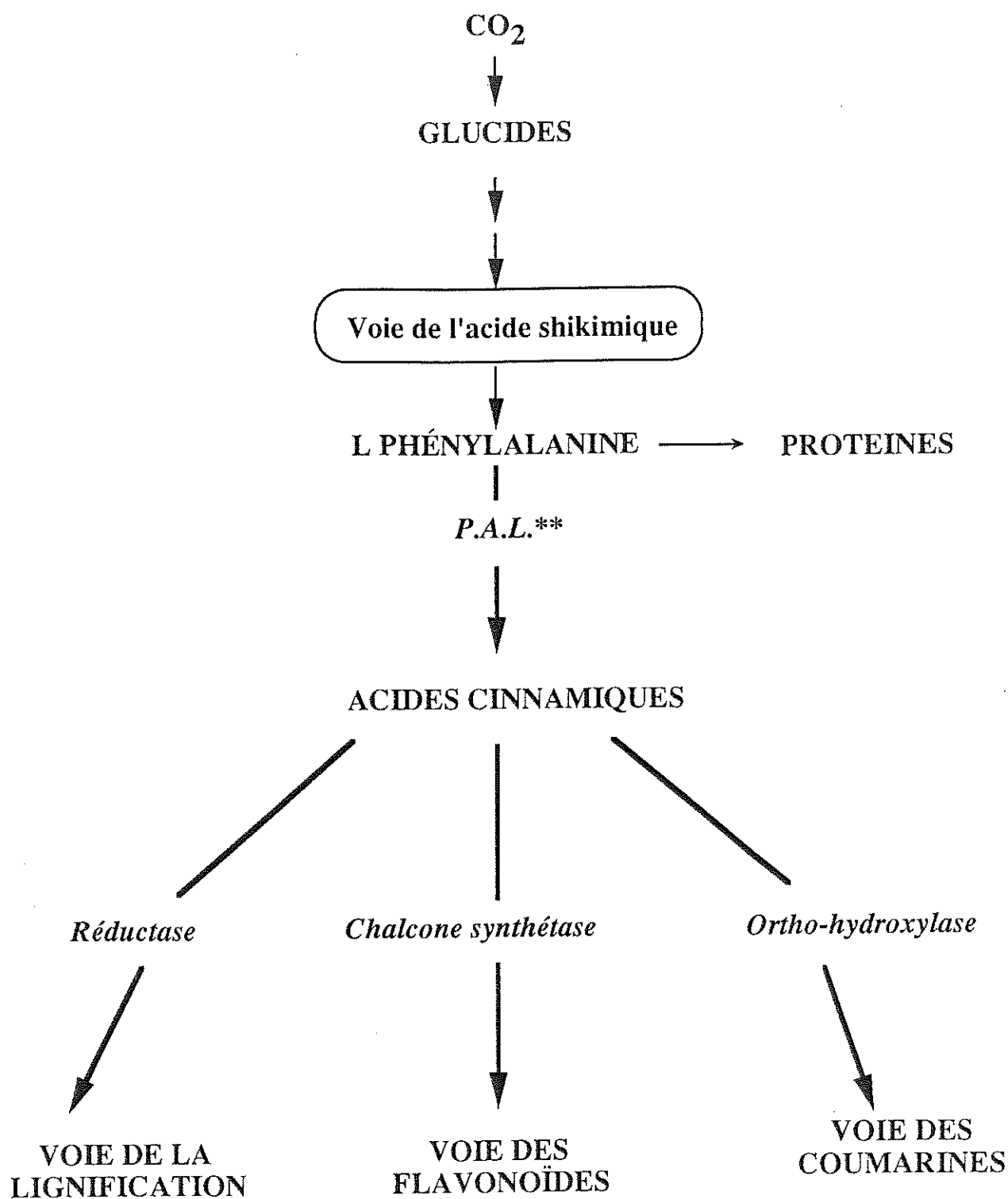


Figure 4 : Schéma simplifié du lien existant entre le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire (cas des phénylpropanoïdes)

\*\* Voir la définition dans les abréviations

- \* le métabolisme secondaire aurait pour objectif *de détoxifier les métabolites primaires*, par exemple détoxifier les acides aminés toxiques dans leurs premiers stades en alcaloïdes (LOVKOVA, 1981).
- \* les métabolites secondaires seraient impliqués dans le *stockage et/ou le transport de molécules*. Les alcaloïdes et les glucosides serviraient respectivement de stockage de l'azote et de sucres, ce qui implique une métabolisation ultérieure.
- \* les métabolites secondaires possèderaient une *signification biologique* et interviendraient dans *l'adaptation des plantes à leur environnement* (HARBORNE, 1977). C'est le cas par exemple des molécules responsables de la couleur des fleurs et/ou de leur parfum qui sont des agents pollinisateurs.
- \* les métabolites secondaires pourraient jouer un rôle dans la *protection des plantes contre les facteurs de stress biotiques\* ou abiotiques\**. Ainsi, certains alcaloïdes, composés phénoliques ou terpènes peuvent modifier le comportement alimentaire d'insectes, d'autres comme certains phénylpropanoïdes jouent un rôle dans la protection contre les U.V. (HAHLBROCK et SCHEEL, 1989), d'autres encore sont toxiques pour des herbivores...

Certaines de ces hypothèses n'assignent aucune fonction spécifique au métabolisme secondaire. D'un point de vue biologique, ceci est négatif car correspond à une perte importante d'énergie pour la plante.

Les hypothèses proposant un rôle effectif de ces molécules paraissent plus vraisemblables. En effet, il a été montré que l'accumulation de *phytoalexines\** est clairement impliquée dans les mécanismes de défense des plantes vis-à-vis des agressions extérieures (ALLEN, 1959 ; CRUICKANSHANK, 1963 ; HEGNAUER, 1975 ; HARBORNE, 1978). Il en est de même pour les tanins et les lignines. Dans quelques cas, ils peuvent être toxiques pour d'autres végétaux (phénomène d'allélopathie\*) comme la juglone du noyer qui, entraînée au sol par les pluies, limite la croissance des plantes à proximité de cet arbre (TOWERS et WAT, 1979).

#### 2.1.3.1.3 Déterminisme et régulation de la synthèse

La teneur en métabolites secondaires d'une plante est le résultat du bilan synthèse-dégradation. Il faut noter cependant que la synthèse de ces molécules est toujours beaucoup mieux connue que leur dégradation (RHODES, 1994).

La synthèse de métabolites secondaires par les plantes repose sur un *déterminisme génétique*. Les problèmes posés aux généticiens pour atteindre une meilleure connaissance et une meilleure maîtrise du métabolisme secondaire sont de trois types (ZRYD, 1992) :

- l'identification du locus ou des loci\* impliqués dans le codage des enzymes d'une voie de biosynthèse (gènes structuraux) ;
- l'identification des éléments régulateurs qui vont conditionner la production (gène\* de régulation) ;

- l'analyse des loci déterminants des caractères quantitatifs.

Contrairement au métabolisme primaire qui est régulé par voie enzymatique (régulation allostérique, phosphorylation...), *le métabolisme secondaire est régulé au moment de la transcription\**. *L'expression de ces voies métaboliques est affectée par des facteurs externes et internes* (ZRYD, 1992).

Les efforts du sélectionneur de plantes médicinales visent à augmenter le rendement final en principes actifs et à stimuler les fonctions métaboliques qui induisent leur accumulation.

La variabilité génétique des plantes médicinales est en général très importante (TETENYI, 1991) et la sélection débute toujours sur des populations. Il est aussi possible d'utiliser les techniques d'amélioration génétique *in vitro* en vue de produire ou de sélectionner des génotypes performants. Ainsi, les plantes de *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), régénérées à partir de cals haploïdes ou diploïdes, contiennent un taux en principes actifs plus élevé que leurs parents. Dans certains cas, des essais sont menés pour produire des principes actifs directement par culture de cellules bien que cette voie n'ait donné pour l'instant que peu de résultats applicables à l'industrie (TETENYI, 1991). Par contre, l'étude *in vitro* du métabolisme secondaire a permis d'acquérir une meilleure connaissance des enzymes impliquées et de leurs régulations par certains facteurs comme la lumière ou les éliciteurs (ZENK, 1991).

#### 2.1.3.2 LOCALISATION DES MÉTABOLITES SECONDAIRES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DE LA PLANTE

La teneur en principes actifs d'une plante peut varier, entre autres, en fonction :

- *de facteurs internes* :
  - \* nature de l'organe,
  - \* âge de la plante,
  - \* stade de développement de la plante ;
- *de facteurs externes* :
  - \* biotope,
  - \* saison,
  - \* heure de la journée.

De plus, le lieu de synthèse et de stockage de ces molécules diffère selon la plante, ce qui implique la mise en oeuvre de mécanismes de *transport* des métabolites secondaires d'un organe à un autre. Les données sur ce sujet sont assez ponctuelles. Nous allons présenter ci-après quelques exemples.

##### 2.1.3.2.1 Influence de facteurs internes

###### \* *Les plantes à composés phénoliques*

Dans le cas des Psoralées qui produisent des furocoumarines comme le psoralène (utilisé pour ses propriétés photosensibilisantes dans le traitement du psoriasis ou du vitiligo).

BOURGAUD (1990) montre que tous les échantillons végétaux analysés, y compris les organes végétatifs, contiennent des furocoumarines. Cependant, leur teneur est plus forte dans les organes reproducteurs que dans les feuilles ou les tiges. Il semble donc, conformément aux travaux sur les Apiacées (IVIE, 1978 ; ENRIQUEZ *et al.*, 1984 ; CESKA *et al.*, 1987) que l'essentiel de la synthèse des furocoumarines s'accomplit dans les organes reproducteurs et que, comme chez *Pastinaca sativa*, les furocoumarines synthétisées dans les fruits sont véhiculées dans d'autres organes (MURRAY, 1982).

Ce phénomène de migration pourrait aussi avoir lieu chez les Psoralées. Les furocoumarines trouvées dans les feuilles ou les tiges pourraient résulter d'une migration de ces molécules depuis les fruits vers les organes végétatifs (BOURGAUD, 1990). NGUYEN (1992), après une étude sur la synthèse de furocoumarines par le biais de racines transformées\*, émet l'hypothèse que la synthèse de furocoumarines a lieu dans les parties aériennes et fait l'objet d'une migration vers les racines.

#### \* *Les plantes à alcaloïdes*

Le phénomène de migration des alcaloïdes est actuellement assez clair pour certaines plantes, le site de synthèse de ces molécules se situant généralement dans la racine. Les trois exemples les plus connus sont :

- le tabac qui synthétise la nicotine au niveau racinaire puis l'accumule dans les feuilles ;
- le *Dubiosa* dont l'hyoscyamine synthétisée dans les racines est transportée dans les parties aériennes (RHODES, 1994) ;
- le *Datura* qui mobilise de la même manière l'hyoscyamine des racines vers les parties aériennes. Ce phénomène a pu être exploité dans le cadre de la culture de racines transformées. COSSON et KUNTMANN-COUGOUL (1979) et PAYNE (1987) montrent que la teneur en hyoscyamine dans *Datura stramonium* est élevée dans les racines transformées par *Agrobacterium rhizogenes*.

#### \* *Les plantes à stéroïdes*

Comme pour les composés phénoliques ou les alcaloïdes, le lieu d'accumulation de certains stéroïdes d'intérêt pharmaceutique a été étudié, notamment sur les espèces synthétisant de la diosgénine. En effet, cette molécule et son analogue, la solasodine, sont des sources importantes de stéroïdes. Ces substances sont produites dans les feuilles et les fruits de nombreuses espèces de *Solanum* mais leur localisation intracellulaire n'est pas connue. Les jeunes feuilles étalées ont une teneur élevée en solasodine, à l'inverse des feuilles âgées et FOLDESI et SVAB (1969), MURAVEVA *et al.* (1970), MOURSI et AHMED (1973) considèrent que ce phénomène est lié à la dilution des stéroïdes dans les nervures et dans d'autres parties "inertes" de la feuille. L'explication donnée classiquement est une synthèse dans les feuilles jeunes en croissance et une dégradation dans les feuilles âgées (MANN, 1978).

Chez *Discorea deltoidea*, la composition en principes actifs varie suivant les organes et le stade de la plante. Le pourcentage de sapogénines qui augmente dans les feuilles et dans les bulbes

durant la croissance de même que les composés phénoliques, reste stable dans les tiges. Enfin, le limbe foliaire, organe photosynthétique, possède généralement la plus forte teneur en sapogénines de la plante, sauf dans le cas des plantes âgées où ces composés se sont accumulés dans le bulbe (KARNICK, 1972).

*Contrairement au métabolisme primaire pour lequel le rôle et les mécanismes de synthèse, de migration et de stockage commencent à être bien connus, le métabolisme secondaire semble répondre à des règles beaucoup plus spécifiques. Toutefois, chaque famille de métabolites secondaires paraît se comporter de façon identique dans des espèces différentes. Ainsi, les composés phénoliques et les stéroïdes sont plutôt synthétisés dans les parties aériennes, à l'opposé des alcaloïdes produits dans les organes souterrains puis transportés dans les parties aériennes.*

*Les métabolites secondaires comme les métabolites primaires sont susceptibles d'être véhiculés dans la plante.*

#### 2.1.3.2.2 Influence de facteurs externes

Ce sont les facteurs :

- *pédoclimatiques* : la température, l'humidité relative, la durée totale de l'insolation, le régime des vents, le type de sol, etc.,
- *biotiques* : les infections fongiques, bactériennes ou virales, la présence d'insectes ou d'oeufs de parasites, etc.,
- *agronomiques* : la densité de peuplement ou la fertilisation.

Ceux-ci peuvent modifier radicalement la production de métabolites secondaires dans la plante dans la limite des potentialités génétiques. Il est actuellement difficile de définir précisément leur mécanisme d'action. En effet, *les facteurs externes peuvent agir de façon directe sur la régulation de la synthèse de métabolites secondaires (transcription) ou de façon indirecte (par le biais du métabolisme primaire)* (FRANZ, 1975 ; TETENYI, 1991). Certains sont assez bien connus, c'est le cas de la température ; d'autres le sont moins comme la quantité et la qualité de lumière. Nous verrons dans un second temps les facteurs extérieurs susceptibles d'être modifiés par des techniques d'ordre agronomique.

#### 2.1.3.2.2.1 Facteurs biotiques et abiotiques : exemples des stress et de la lumière

Il existe deux grandes catégories de facteurs extérieurs susceptibles d'intervenir sur le métabolisme secondaire :

- *les facteurs biotiques* (maladies, ravageurs, etc. ),
- *les facteurs abiotiques* (température, vent, eau, lumière, stress chimique, etc.).

#### \* *Les stress*

Les réactions des végétaux à l'action de stress (agents pathogènes, blessures....) ont été beaucoup étudiées afin d'avancer dans la compréhension et la maîtrise des mécanismes de défense des végétaux. Citons le cas du *Datura metel* pour lequel l'altitude peut intervenir sur la teneur en alcaloïdes de même que les stress hydriques (VANHAELEN, 1991). De la même façon, le pourcentage d'esters tropaniques dans *Datura innoxia* est très fortement sensible au stress à NaCl. Ceci s'explique par le fait que sous l'action du stress, les plantes synthétisent et accumulent de façon rapide et transitoire des métabolites secondaires appelés *phytoalexines*. Ce sont des molécules anti-microbiennes, de faible poids moléculaire, synthétisées autour du site d'infection. Les phytoalexines sont produites par la voie du shikimate, de l'acétate-polymalonate, du shikimate-polymalonate ou des terpénoïdes. L'accumulation de phytoalexines dans les plantes, en réponse à une infection ou à un traitement avec des éliciteurs\*, fournit un système modèle pour l'étude de la production et le "turnover"\* des métabolites secondaires. Ainsi, il a été montré que la synthèse des phytoalexines dans les plantes peut normalement être détectée entre 12 et 24 h avec un maximum entre 2 et 4 jours après élicitation (WHITEHEAD et THREFALL, 1992).

Dans le cas des Psoralées, il est possible de stimuler la synthèse de furocoumarines en provoquant une réaction de type phytoalexine par application d'éliciteurs chimiques comme le  $\text{CuSO}_4$ , le chitosane ou par inoculation de *Bradyrhizobium*. L'influence des stress est positive pour la teneur en furocoumarines alors qu'elle est négative pour la biomasse. Par ailleurs, le rendement en furocoumarines par plante ayant subi un stress est généralement supérieur au rendement des plantes témoins (BOURGAUD, 1990). De la même manière, la teneur en coumarines de *Pastinaca sativa* L. (Apiacées) augmente sous l'action d'une solution de  $\text{CuSO}_4$ , qui de plus stimule la croissance des plantes (WIERZCHOWSKA-RENKE *et al.*, 1995).

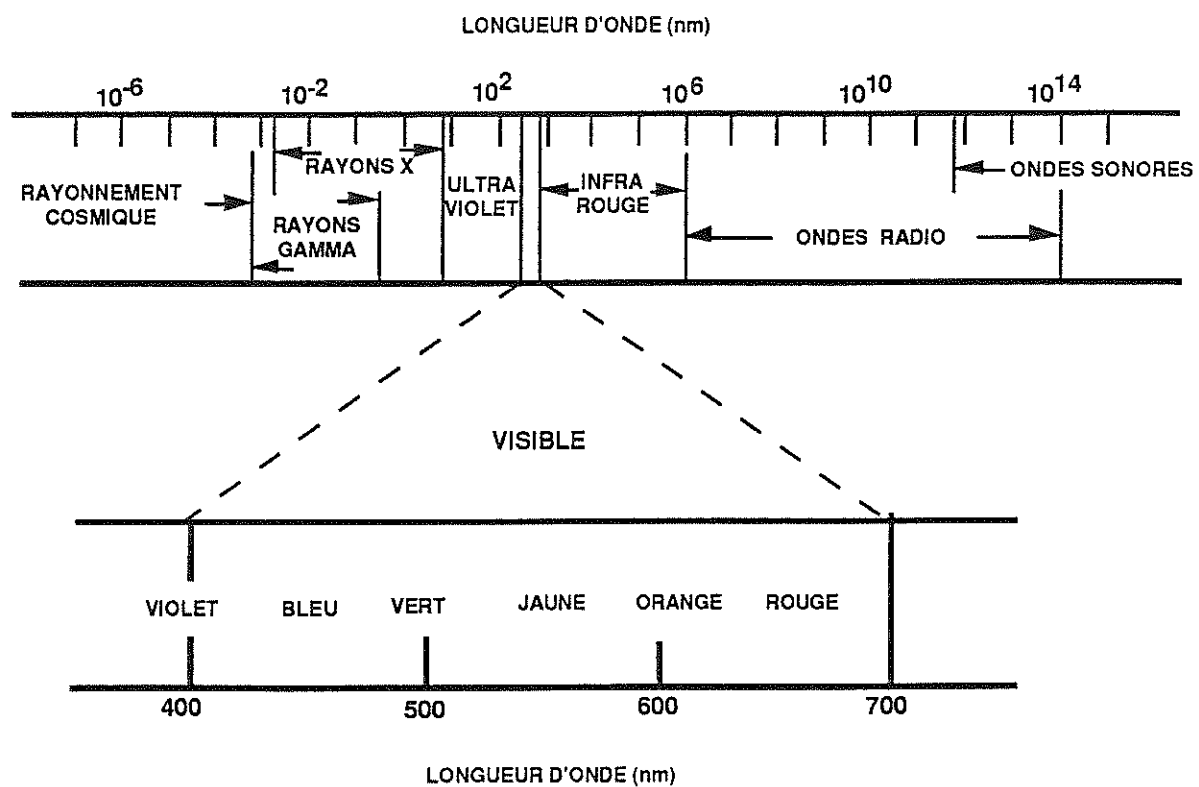


Figure 5 : Spectre de la lumière solaire

## **\* La lumière**

Le choix d'une présentation plus approfondie de ce facteur s'explique par l'existence de travaux mettant en évidence une relation entre la synthèse des métabolites secondaires et la lumière qui peut intervenir par voie directe sur le métabolisme secondaire (production d'énergie ou de sucres), ou de façon indirecte en régulant les voies de biosynthèse impliquées dans la production de ces composés.

### **A - Définition**

Tout éclairage peut être défini selon deux critères :

- la "**quantité**" que l'on caractérise chez les végétaux comme le rayonnement utile à la photosynthèse, le **PAR\*\*** selon la terminologie anglaise.

Alors que la quasi-totalité de l'énergie est émise dans une gamme allant de 300 à 3000 nm (**Figure 5**), le PAR possède une bande spectrale de 400 à 700 nm (CHARTIER *et al.*, 1992) ;

- la "**qualité**" liée à la composition spectrale du rayonnement.

La quantité et la qualité de la lumière interviennent de façon importante sur la productivité des végétaux. Ce sont aussi des éléments déterminants agissant sur :

- le cycle de la plante (germination, induction de la floraison...),
- le développement des organes,
- la composition chimique de la plante.

Quelques exemples liés essentiellement à ce dernier point illustrent les relations entre la production de métabolites secondaires et la qualité et la quantité du rayonnement reçues par la plante.

### **B- Quelques effets de la lumière sur les plantes**

Le déterminisme de la présence de métabolites secondaires est d'ordre génétique alors que les quantités produites dépendent de facteurs externes comme la lumière et la température.

Bien que difficile à gérer en culture si ce n'est via la densité de peuplement, l'influence de la lumière sur le métabolisme et la croissance des plantes a donné lieu à de nombreuses études. Certains résultats sont clairs et peuvent être généralisés à la plupart des espèces, d'autres sont très controversés et dépendent du genre voire de l'espèce étudiée.

## \* Quantité de lumière

*L'intensité* et la *durée* de l'éclairement agissent sur le métabolisme primaire mais aussi de manière plus ou moins liée sur le métabolisme secondaire.

### \* Les plantes à composés phénoliques

La lumière stimule l'activité de certaines enzymes impliquées dans la synthèse de composés phénoliques et participe à l'augmentation de leur concentration dans les plantes (McCLURE, 1977). Dès 1965, ZUCKER montre que l'exposition à la lumière de morceaux de tubercules de pomme de terre stimule l'activité de la PAL\*\* (phénylalanine ammonia lyase, enzyme clé entre le métabolisme primaire et secondaire), provoquant la synthèse d'acide chlorogénique. De même, chez la sauge (*Salvia officinalis* L.), la teneur en composés phénoliques (acides chlorogénique et isochlorogénique) augmente durant la période de jour mais diminue durant la période sombre (ENGELSMA, 1979). De plus, SCHRODER et BOHM (1995) trouvent que le taux d'ARN m de PAL est très faible dans les cellules de persil (*Petroselinum sativum* Hoffm.) cultivées *in vitro*, à l'obscurité et qu'il augmente lorsqu'elles sont irradiées.

### \* Les plantes à huiles essentielles

Les plantes à huiles essentielles sont souvent photodépendantes (VANHAELEN, 1991). La composition en huiles essentielles formées dépend de la durée de l'éclairage et de la température (FRANZ, 1975). Dans le cas de la sauge, le froid et un éclairage faible induisent l'augmentation de la taille des plantes et une diminution de la teneur en huiles essentielles (BERNATH, 1991). Chez la camomille (*Matricaria chamomilla* L.), l'augmentation de l'intensité lumineuse provoque une augmentation de la teneur totale en huiles essentielles et en chamazulène dans les fleurs (SALEH, 1973).

### \* Les plantes à alcaloïdes

L'influence de la durée et de l'intensité de l'éclairement sur l'évolution des teneurs en alcaloïdes durant l'ontogenèse\* de la plante a été mise en évidence notamment par COSSON (1966 et 1969) et GUPTA (1974) pour le *Datura metel* et le *D. tatula*, et par BERNATH et TETENYI (1979 et 1980) pour le *Papaver somniferum*. La lumière a un effet stimulant sur l'activité de certaines enzymes notamment la PAL (VANHAELEN, 1991).

Dans le cas de *Vinca minor*, il y a une augmentation de la teneur en principes actifs lorsque les plantes sont cultivées sous couvert ; pour le *Datura innoxia*, la synthèse de la scopolamine n'intervient que sous un éclairement supérieur à 500 W m<sup>-2</sup> (TETENYI, 1991).

Quant au pavot, la teneur en alcaloïdes augmente dans les régions continentales où l'éclairement est plus important. La biosynthèse des alcaloïdes est 2 à 3 fois supérieure

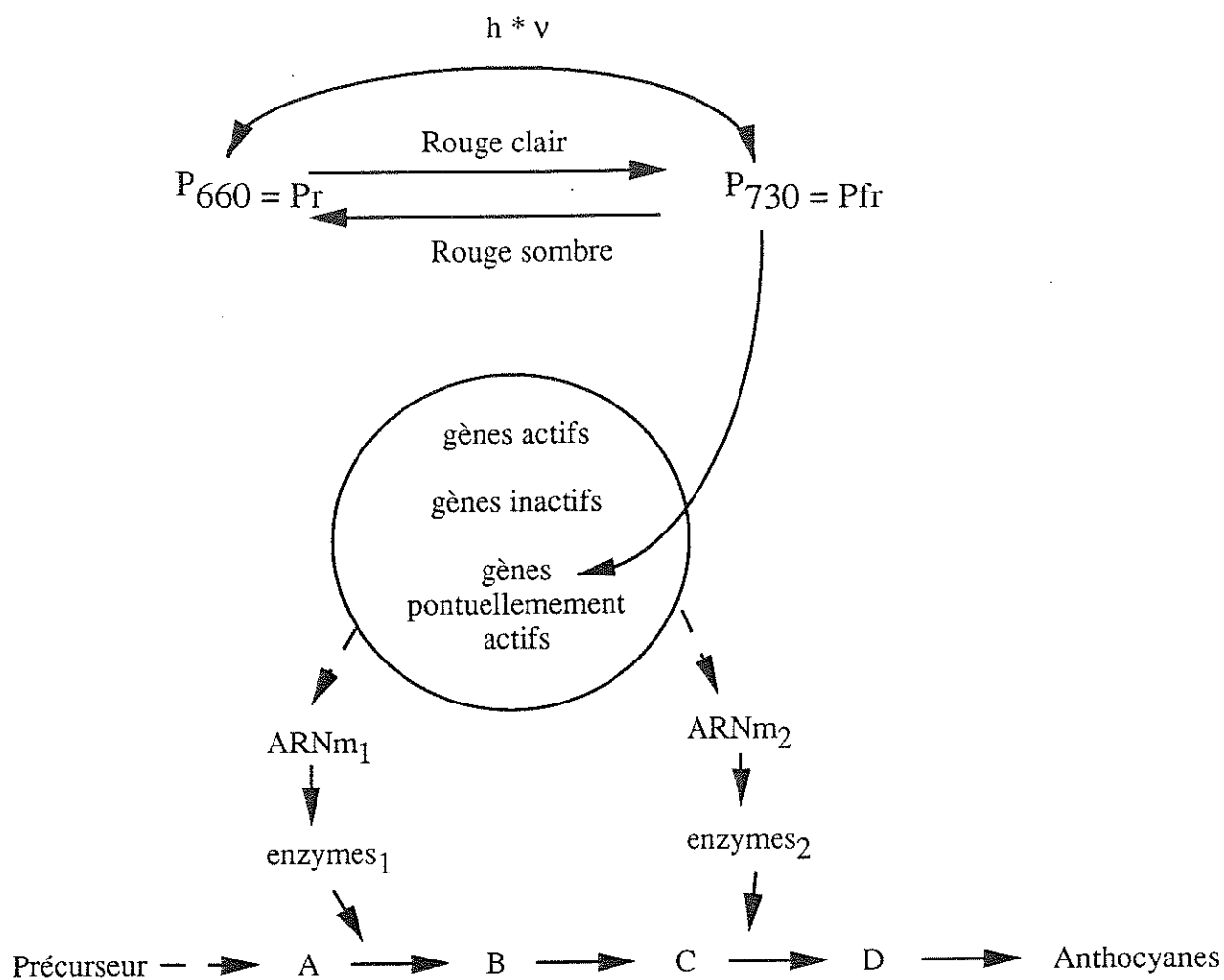


Figure 6 : Schéma théorique montrant l'intervention possible du phytochrome dans la synthèse d'anthocyanes (d'après MOHR, 1969 et HUAULT, 1969)

A, B, C, D : intermédiaires de synthèse  
 Pr : forme inactive du phytochrome  
 Pfr : forme active du phytochrome

lorsque la température est élevée (26°C) et l'intensité lumineuse forte (de l'ordre de 150 W m<sup>-2</sup>) (BERNATH et TETENYI, 1980). Ces auteurs montrent que le taux de morphine est important lorsque l'intensité lumineuse et la température sont faibles alors que la teneur en codéine augmente quand l'intensité lumineuse et la température sont élevées. Le froid induirait un retour des alcaloïdes dans le métabolisme général de la plante (BERNATH et TETENYI, 1981).

Chez *Solanum laciniatum* et *S. dulcarama*, la forme et la surface des feuilles varient en fonction de l'intensité lumineuse : la surface foliaire et la production de matière sèche sont moindres à forte intensité pour les deux espèces (BERNATH, 1976 ; HONVATH, 1977).

### \* Qualité de lumière

Des travaux concernant l'effet de la qualité de la lumière sur les métabolismes primaire et secondaire nécessitent l'emploi de bandes de rayonnement plus étroites que celles du PAR.

Dans le cas d'études de la photomorphogénèse\* sur l'allocation des produits de la photosynthèse ou sur le métabolisme des plantes, les longueurs d'onde généralement étudiées sont :

- les *U.V. A* de 300 à 500 nm,
- le *bleu* de 420 à 480 nm,
- le *rouge clair* 660 nm,
- le *rouge sombre* 730 nm.

La qualité de la lumière pourrait avoir une action :

- sur la *perméabilité membranaire*. Le phytochrome\* est un photorécepteur présent dans plusieurs types de membranes subcellulaires. Le phytochrome activé par la lumière changerait la perméabilité membranaire et contrôlerait ainsi le flux de métabolites solubles dans les sites (ZAPROMETOV, 1988) ;

- sur *l'expression des gènes*. MOHR (1969) et HUAULT (1969) proposent (**Figure 6**) un schéma représentant le mode d'action de la lumière sur la régulation de la synthèse d'anthocyanes par le biais des phytochromes.

- sur la *photorégulation des enzymes*. Des exemples d'enzymes photorégulées ont été trouvés dans un grand nombre de voies métaboliques. Chez les végétaux supérieurs, la photorégulation n'implique pas la synthèse d'enzymes spécifiques mais plutôt une variation de la quantité ou de l'activité enzymatique existante (MOULIA, 1988). CASTANEDA et QUINTERO (1991) montrent que l'activité PAL est induite sous l'effet de la lumière bleue ou blanche dans des cultures de tissus de *Gomphrena globosa*. NEUMANN (1991), NEUMANN et SCHWEMMLE (1993) mettent en évidence que

| Médiateurs                   | Effet de la lumière sur le médiateur                                  | Effet du médiateur sur les phénols                                                  |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Sucre                        | Le Pfr augmente l'incorporation de sucre ( <i>Pisum</i> )             | Le sucre est nécessaire à l'augmentation de l'activité PAL ( <i>Fragaria</i> )      |
| Eau                          | Le Pfr contrôle la perméabilité à l'eau ( <i>Taraxacum</i> )          | La présence d'eau est nécessaire pour que le Pfr contrôle la PAL ( <i>Hordeum</i> ) |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> | Libéré par le Pfr, il augmente l'activité PAL ( <i>Brassica</i> )     | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> inhibe l'anthocyanine ( <i>Brassica</i> )              |
| Acide abscissique            | Le Pfr contrôle le taux endogène de ABA** ( <i>Hordeum</i> )          | L'ABA diminue le taux de PAL ( <i>Sinapis</i> )                                     |
| Gibbérélines                 | Le Pfr contrôle le relargage d'AG** des plastides ( <i>Triticum</i> ) | L'AG inhibe l'anthocyanine mais pas la PAL ( <i>Daucus</i> )                        |

Tableau 2 : Influence du photocontrôle sur le taux d'enzymes impliquées dans le métabolisme des composés phénoliques ou sur leur accumulation (McCLURE, 1977)

l'application de rouge sombre en continu sur des Oenothères provoque l'accumulation d'anthocyanes liée à une augmentation de la synthèse de PAL et de CHS\*. McCLURE (1977) présente des exemples de photocontrôle influençant le taux d'enzymes impliquées dans la synthèse de composés phénoliques (**Tableau 2**). Il semble donc que la PAL se comporte de façon différente suivant les espèces étudiées et les conditions testées.

***Le couvert végétal induit des changements d'intensité lumineuse mais modifie également la qualité de la lumière.*** En effet, il y a absorption sélective de certaines longueurs d'onde par les pigments, principalement la chlorophylle : les bandes bleue et rouge sont fortement absorbées, la bande verte l'est moins largement et la bande rouge sombre est quasi entièrement réfléchie ou transmise. Ainsi, les feuilles ombrées reçoivent relativement plus de rouge sombre que les feuilles non ombrées. ***L'ombrage provoque donc une augmentation du rouge sombre par rapport au rouge clair.*** Ce rapport est d'ailleurs un excellent indicateur du niveau d'ombrage (SMITH, 1982). L'ombrage favorise l'extension des entre-nœuds et l'expansion des feuilles. A PAR constant, les plantes cultivées en conditions d'ombrage présentent toujours un taux de photosynthèse plus élevé que les plantes soumises à la lumière solaire (HODDINOTT et HALL, 1982). De plus, un faible rapport rouge clair/rouge sombre est responsable de la sénescence (GUIAMET, 1989).

La "stratégie" du trèfle blanc en réponse à un traitement au rouge sombre est de réorienter son développement en modifiant les relations source - puits pour permettre aux jeunes feuilles d'éviter l'ombre. Le rapport pousses/racines est augmenté par le rouge sombre ; ainsi le phytochrome peut agir de façon indirecte sur la fixation de l'azote et la nutrition par une diminution de l'allocation des glucides dans les racines (ROBIN, 1992).

Des études ont montré que la qualité spectrale influence la ***nodulation*** chez le haricot : le rouge sombre inhibe la nodulation ; le rouge clair élimine partiellement cet effet. La qualité de la lumière peut également déterminer l'orientation des feuilles (GIRARDIN, 1992 ; GIRARDIN et TOLLENAAR, 1994).

***La qualité de la lumière joue aussi un rôle sur la composition chimique de la plante.*** PAVLOV et ILIEVA (1972) montrent chez *Salvia sclarea* qu'un apport de lumière rouge favorise la formation de composés azotés dans les feuilles et les racines mais que l'apport de lumière bleue ou verte est sans effet. CHAPPEL et HAHLBROCK (1984) mettent en évidence que l'application d'U.V. à des cultures de cellules de persil (*Petroselinum hortense*) provoque l'augmentation de la synthèse de flavonoïdes.

Le métabolisme des composés phénoliques est fortement influencé par l'application de lumière rouge ou de lumière bleue (ZAPROMETOV, 1988).

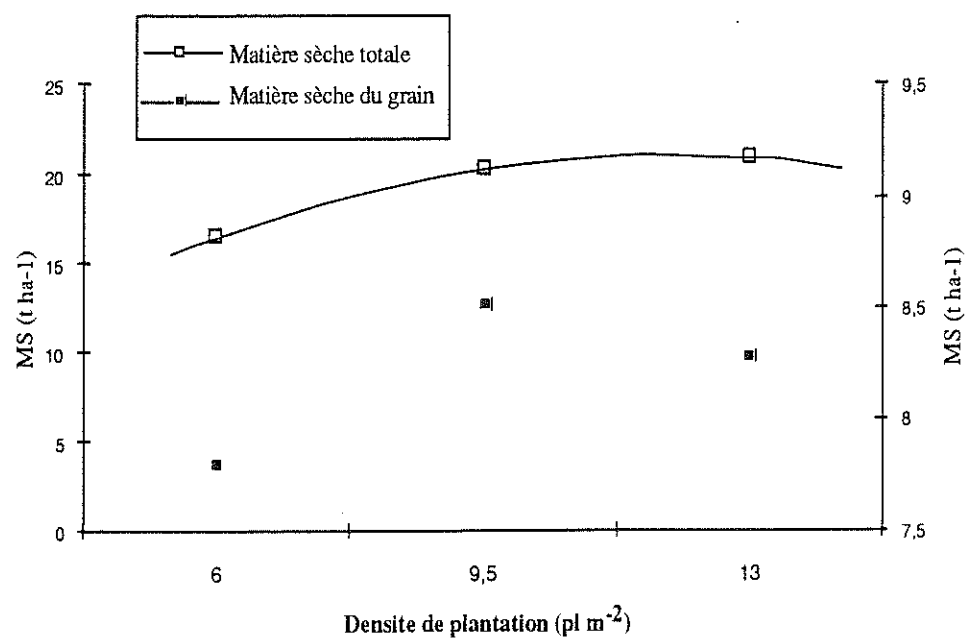


Figure 7 : Relation entre le rendement en matière sèche et la densité de peuplement dans le cas du maïs (BOYAT *et al.*, 1991)

***La photorégulation du métabolisme secondaire des plantes est un phénomène complexe et plurifactoriel.***

D'une part, les précurseurs, les sources d'énergie (ATP\*\*) et les agents réducteurs (NADPH<sub>2</sub>\*\*) sont formés à fortes doses dans les chloroplastes exposés à la lumière et de nombreuses enzymes spécifiques des chloroplastes, intervenant dans la biosynthèse des métabolites secondaires, passent en présence de lumière sous leurs formes actives.

D'autre part, les plantes possèdent un ***système de photocontrôle*** indépendant de l'accumulation d'énergie (phytochromes, cytochromes, photorécepteurs U.V.). La stimulation de la synthèse d'acides hydroxycinnamiques, de flavonoïdes, d'hormones... est contrôlée par le ***phytochrome***. Le phytochrome passe de sa forme inactive à sa forme active sous l'action de la lumière rouge et cette transformation est souvent associée à des phénomènes de morphogenèse\*.

#### ***2.1.3.2.2.2 Techniques culturales***

##### ***\* La densité***

La densité de plantation a une forte influence sur la production de matière sèche et la répartition de celle entre organes (**Figure 7**).

Ce facteur peut intervenir :

- en ***modifiant l'éclairement reçu au niveau des différents étages foliaires***, l'auto-ombrage étant d'autant plus important que la densité est élevée. Pour des densités croissantes de peuplement, les effets d'ombrage mutuels provoquent un allongement précoce et plus rapide des entre-noeuds (HAY et WALKER, 1989) d'où ***une augmentation de la hauteur à maturité avec la densité***. MERREIN (1983) montre sur le tournesol que le "vieillissement" des feuilles inférieures et la réduction de leur activité photosynthétique dépendent de l'éclairement reçu et de leur état physiologique. Lorsque l'auto-ombrage devient important, une diminution de la quantité d'azote contenue dans les limbes ombrés est observée (GIRARDIN, 1985, pour le maïs) ;
- sur la ***teneur en principes actifs***. Les quelques études menées sur le métabolisme secondaire montrent que la densité peut parfois influencer la teneur en principes actifs alors qu'elle intervient classiquement (jusqu'à un certain seuil) sur le rendement en métabolites secondaires par unité de surface. Dans le cas de la culture de *Solanum* sp., la densité n'a pas d'effet sur la teneur des feuilles en solasodine (MANN, 1978) mais dans le cas du pavot (*Papaver somniferum*) la teneur en morphine dans la partie supérieure de la plante diminue si la densité augmente. Le rendement maximum en morphine est obtenu pour une culture de 70 pieds m<sup>-2</sup> (CHUNG, 1990). Chez *Swertia japonica*, le rendement

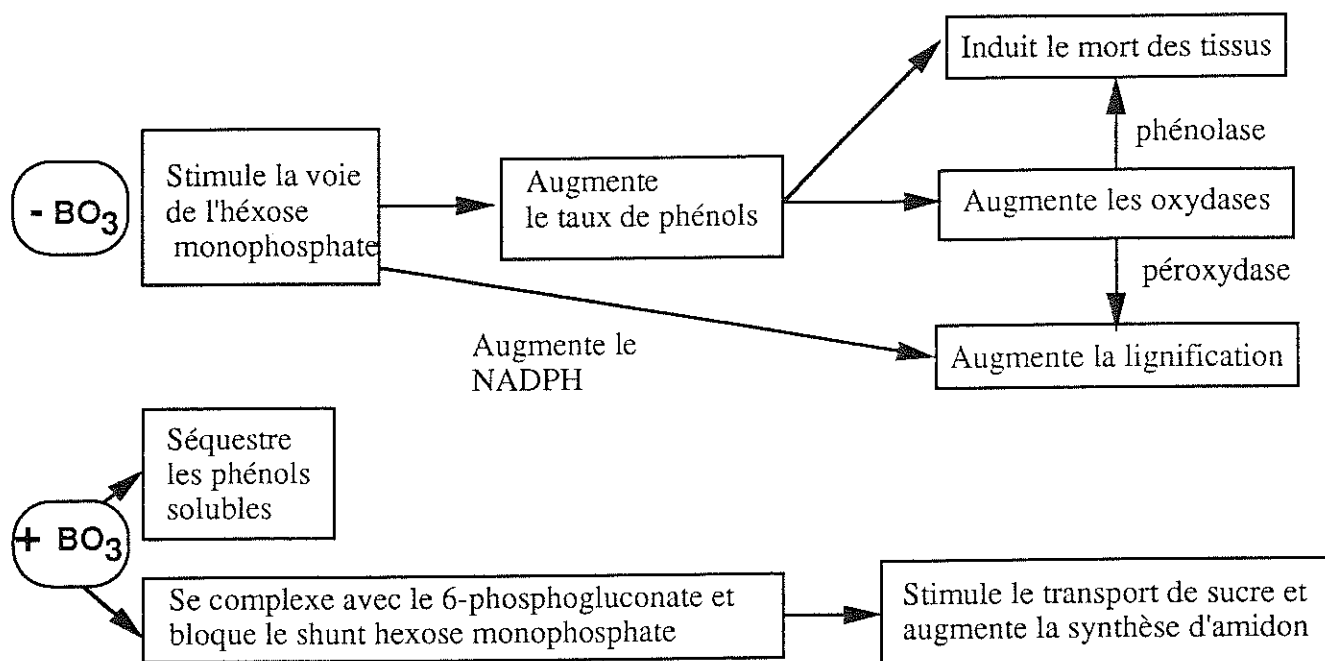


Figure 8 : Rôles possibles du bore dans la régulation du taux de composés phénoliques (McCLURE, 1977)

total en iridoïdes est plus important à forte densité qu'à faible densité (YAMADA, 1983 ; VANHAELEN, 1991).

### *\* La fertilisation et les régulateurs de croissance*

L'influence de la fertilisation sur la teneur en métabolites secondaires est controversée et dépend beaucoup des conditions de croissance de la plante. SLATENSEK (1947) ne trouve pas d'effet de la fertilisation azotée sur la teneur en dérivés coumariniques du mélilot alors qu'en 1990, BOURGAUD montre qu'il y a un effet de la nutrition azotée sur la teneur en furocoumarines des Psoralées : les teneurs les plus fortes ont été obtenues avec les plantes à meilleure croissance. Ce phénomène pourrait être la conséquence du bon fonctionnement du métabolisme primaire.

En ce qui concerne la nutrition minérale, plusieurs études ont porté sur le bore. Une carence en bore provoque chez le tabac une augmentation des composés phénoliques (LEE et ARONOFF, 1967) (**Figure 8**). Quant au manganèse, appliqué à faible concentration, il induit l'activité PAL chez le melon en complexant probablement les acides hydroxycinnamiques qui inhibent cette activité enzymatique (ENGELSMA, 1972).

Ainsi, la *fertilisation azotée* influence essentiellement le *rendement en matière sèche* et semble avoir peu d'importance sur le métabolisme secondaire contrairement à l'application de *micro-éléments* (bore, manganèse...) qui paraissent *intervenir sur le métabolisme secondaire par leur action sur les activités enzymatiques*.

Les régulateurs de croissance peuvent agir sur la synthèse des composés phénoliques. La kinétine pourrait, comme le phytochrome, changer la perméabilité membranaire chez *Brassica*, permettant aux substrats d'être déversés dans le compartiment cellulaire, site de la synthèse d'anthocyanes. Par contre, les gibbérelines sont normalement des inhibiteurs de l'accumulation de composés phénoliques (McCLURE, 1977). HAMDI *et al.* (1995) confirment le rôle des cytokinines dans l'accumulation de scopoline chez le tabac.

*Les régulateurs de croissance semblent jouer un rôle important dans l'accumulation de métabolites secondaires, vraisemblablement par le biais des phytochromes.*

*Cette approche de la plante à travers différents niveaux d'organisation met l'accent sur l'importance des facteurs écophysiologiques dans la production de métabolites secondaires. Leur présence dans une plante est sous contrôle génétique alors que la quantité produite est en grande partie dépendante de facteurs externes.*

*Ceux-ci peuvent intervenir d'une part au niveau génomique en régulant la transcription ou par le biais d'intermédiaires comme le phytochrome ou les hormones qui semblent jouer un rôle important dans ce mécanisme.*

*D'autre part, le métabolisme secondaire découlant du métabolisme primaire, les facteurs influençant ce dernier sont susceptibles d'intervenir de façon indirecte sur la production de métabolites secondaires.*



Figure 9 : Sommité fleurie et détail d'une fleur de *Melilotus officinalis* L.  
(GARNIER *et al.*, 1961)

## 2.2 LE GENRE *MELILOTUS*

### 2.2.1 SYSTÉMATIQUE

Étymologiquement, le mot mélilot provient du grec : *méli* = miel, *lotos* = lotier, par allusion à ses fleurs très mellifères.

Le genre *Melilotus* appartient à la famille des Fabacées, caractérisée par des fleurs irrégulières à 10 étamines. Il est proche du genre *Medicago* et *Trigonella* (STEVENSON, 1969) et comporte 22 espèces. Le mélilot est originaire de l'Europe centrale et orientale comme la luzerne et le trèfle rouge.

Les plantes de ce genre sont herbacées et possèdent des feuilles composées de trois folioles généralement dentés et de stipules relativement petites, soudées au pétiole. Les fruits ne s'ouvrent pas. Ils contiennent une ou deux graines par fruit.

Le genre *Melilotus* comprend des espèces à fleurs jaunes, jaunâtres, blanches ou parfois bleu clair, disposées en grappes, le plus souvent allongées, sur des pédoncules relativement courts.

Les mélilots sont des plantes annuelles, bisannuelles ou pérennes à vie courte. Ils sont diploïdes :  $2N^* = 16$  (TUTIN, 1968).

Dans sa flore, BONNIER (1990) décrit quelques-unes de ces espèces dont :  
- *M. officinalis* L. (**Figure 9**) (Annexe 2)

C'est une espèce très commune. Elle croît dans les champs, sur le bord des chemins, sur les talus, dans les endroits incultes et sablonneux. De 30 cm à 80 cm en général, elle peut atteindre 1 m 50. Cependant, TUTIN (1968) décrit des plantes de 2,5 m. C'est une plante dont les grappes minces et allongées sont formées de nombreuses petites fleurs jaunes (très rarement blanches), odorantes qui s'épanouissent depuis le mois de mai jusqu'au mois de septembre et se montrent encore parfois en hiver. L'étendard est plus long que les ailes qui sont elles-mêmes plus longues que la carène. Cette espèce se reconnaît surtout au fruit, ridé en travers par des nervures jointes çà et là les unes aux autres (**Figure 10**). Il est ovoïde, un peu pointu au sommet, vert ou vert noirâtre s'il est complètement mûr. C'est une espèce *bisannuelle*, presque glabre, à tige dressée ou redressée, à racine principale développée. Le poids de 1000 grains est de 1,5 g (FOURY, 1954). Utilisées pour leurs propriétés fourragère, mellifère ou médicinale, les principales variétés commercialisées cultivées sont : Madrid (d'Espagne), Goltop (du Wisconsin) et Yukon (du Canada) (SMITH, 1975).

- *M. albus* L. (**Figure 11**)

Cette espèce croît dans les prairies, les haies, au bord des bois, sur les talus des chemins de fer ou des routes, sur les berges des cours d'eau et dans les champs. C'est une plante de 30 cm à 1 m 30. Elle pourrait atteindre une hauteur de 2,6 m (TURKINGTON *et al.*, 1977). Les grappes de fleurs blanches qui sont assez odorantes, très longues et étroites, apparaissent du mois de mai jusqu'au mois de septembre. On reconnaît cette espèce au fruit dont les faces ont des nervures saillantes disposées en réseau ; ce fruit est ovoïde, glabre, assez arrondi au

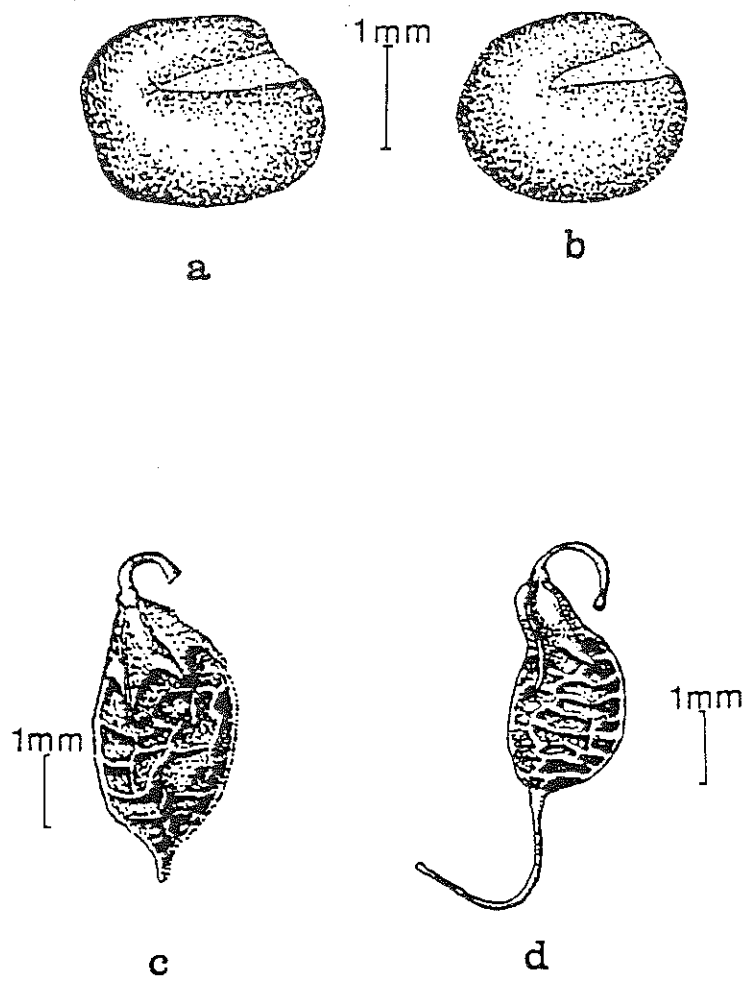


Figure 10 : Fruits et graines de *Melilotus albus* (a,c) et de *Melilotus officinalis* (b, d) (STEVENSON, 1969)

sommet sauf la très petite pointe qui le termine, il est brun quand il est complètement mûr (Figure 10). *M. albus* étend son habitat jusque dans la région nord du Canada et fait preuve d'une grande adaptabilité écologique. Cette espèce contient des populations annuelles et bisannuelles. Une seule paire de gènes les distingue (SMITH, 1927). Les principales variétés sont :

- \* pour les bisannuelles : Denta (du Wisconsin), Artic et Polara (du Canada) ;
- \* pour les annuelles : Hubam (de l'Iowa), Israël (du Texas) (SMITH, 1975).

Il existe une vingtaine d'autres espèces de mélilot : *M. caerulea* Pers. (mélilot bleu : fleurs d'un bleu clair, groupées en grappes courtes), *M. messanensis* All., *M. sulcata* Desf. (Annexe 3), *M. indica* L. (Annexe 4), *M. italicus* Lam., *M. altissima* Pers. (Annexe 5), *M. elegans* Salmz., *M. neapolitana*. Ten.

*M. officinalis* et *M. albus* sont deux espèces proches, qu'il est pratiquement impossible de distinguer, excepté par la couleur des fleurs (TURKINGTON *et al.*, 1977). Il existe cependant une technique de différenciation simple mais destructive des graines de *M. albus* et de *M. officinalis*. Elle consiste en la coloration de ces graines par le sulfate de cuivre tétramine (MAXON et HURST, 1983).

Les espèces du genre *Melilotus* peuvent également différer les unes des autres par leur morphologie mais aussi par la structure anatomique de leurs feuilles et de leurs tiges : nombre des stomates, taille et forme des cellules épidermiques, présence et nombre de poils, structure des feuilles du mésophylle, ... (PETROVA, 1983).

Le mélilot est une plante commune qui possède actuellement une très large distribution dans le monde (ISELY, 1954). Il est apparu aux États-Unis durant la période coloniale et provient sans doute d'impuretés de semences d'autres cultures. SMITH et GORZ (1965) et TURKINGTON *et al.* (1977) notent que le mélilot blanc et le mélilot jaune se rencontrent comme adventices le long des routes et des terrains vagues dans toute la partie du sud du Canada. En Russie, sa culture date des années 1820. L'intérêt des agriculteurs pour le mélilot a augmenté jusqu'aux années 1930 pour diminuer ensuite (SUVOROV, 1937), vraisemblablement supplanté par d'autres Fabacées plus performantes d'un point de vue agronomique (moins sensibles aux sitones et présentant un meilleur rendement en matière sèche).

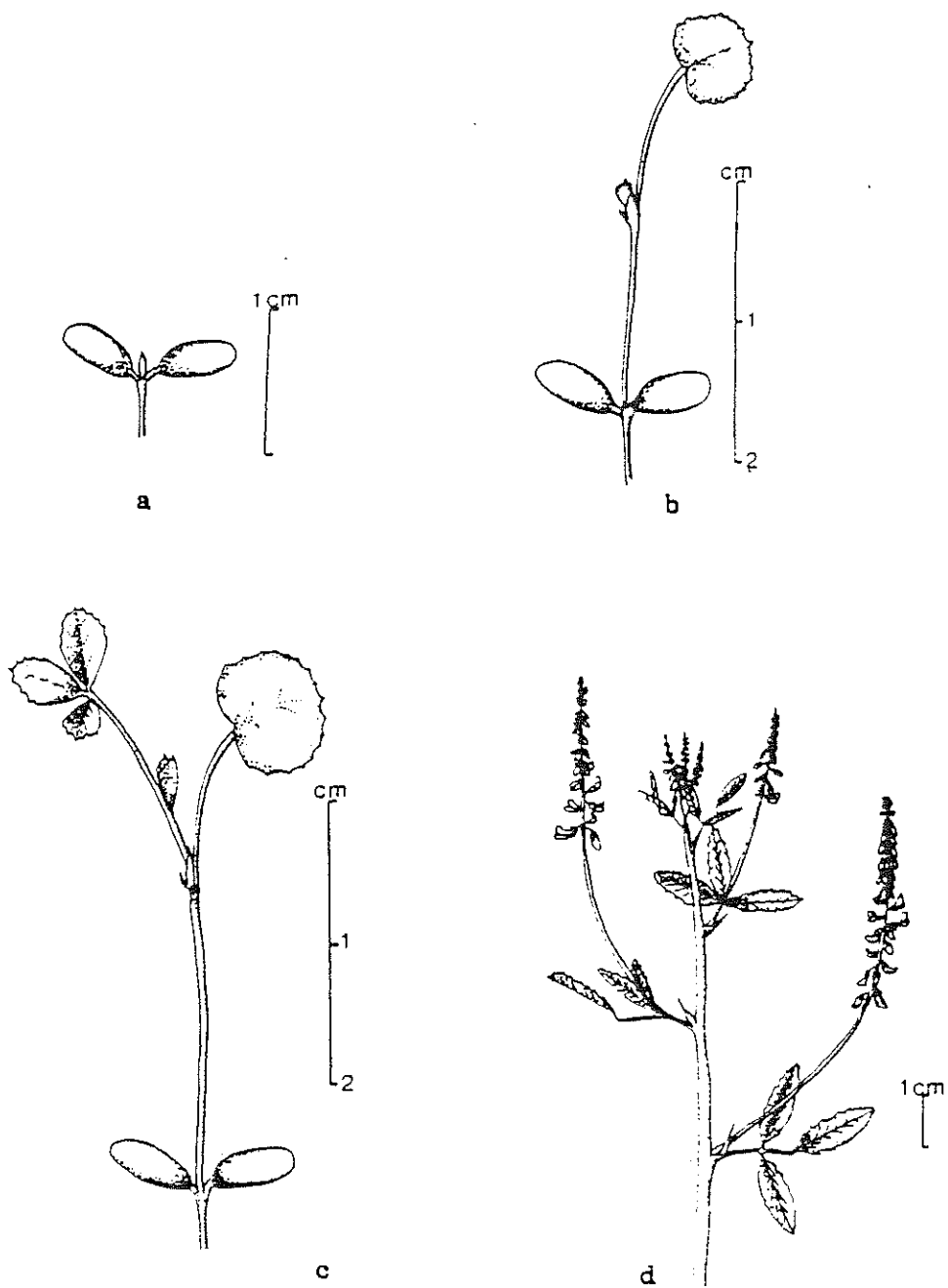


Figure 11 : Quatre stades de *M. alba* (a) 6 jours, (b) 17 jours, (c) 24 jours après émergence, (d) sommité fleurie d'une plante adulte (TURKINGTON, 1968)

## 2.2.2 BIOLOGIE

### 2.2.2.1 CROISSANCE

#### 2.2.2.1.1 Cycle de la plante

L'ontogenèse du mélilot n'a pas été étudiée de façon précise comme celle des espèces proches telles que le trèfle ou la luzerne. La croissance et le développement du mélilot bisannuel sont comparables à ceux des autres plantes de ce type.

De même que pour un grand nombre de Fabacées, une proportion importante de graines matures de mélilot sont très dures et imperméables à l'eau, à des températures favorables à la germination. La dureté de ces graines permet leur survie dans le sol pendant plus de 20 ans. Cependant, leur enveloppe peut être altérée par les fluctuations de température, par des traitements mécaniques ou chimiques. Ainsi, un traitement des semences à l'acide sulfurique concentré augmente le pourcentage de germination (SMITH et GORZ, 1965). La germination peut avoir lieu en mars, début avril ou en septembre (TURKINGTON *et al.*, 1977). Après germination, la première feuille qui apparaît est unilobée. Elle est déployée une dizaine de jours après sa levée. Les feuilles suivantes sont trilobées. (**Figure 11**)

Dans le cas des espèces bisannuelles, durant l'année du semis, la tige principale s'allonge et se ramifie. La croissance s'arrête généralement à la mi-septembre. Durant cette période, les racines augmentent en poids sec et stockent des glucides de réserve provenant des parties aériennes qui meurent à la fin de la première saison. Seule est maintenue vivante la racine d'où partent des bourgeons souterrains qui produisent les tiges fleuries à la saison suivante. Cependant, même pour les espèces bisannuelles, il est parfois possible que la floraison ait lieu la première année. En seconde année, les réserves contenues dans les racines sont utilisées durant les premières semaines de développement (SMITH et GORZ, 1965). La croissance en seconde année consiste en la production de parties aériennes suivie de la floraison, de la production de graines puis du dépérissement (BONNIER, 1990).

#### 2.2.2.1.2 Symbiose avec *Rhizobium*

Parmi les végétaux supérieurs, les Fabacées se caractérisent par une nutrition azotée bimodale. Comme toutes les espèces végétales, elles peuvent assimiler directement l'azote minéral en solution dans le sol grâce à l'activité de la nitratre réductase. Elles ont aussi la possibilité d'utiliser l'azote atmosphérique par l'intermédiaire de bactéries symbiotiques de la famille de Rhizobiacées. Ces bactéries, une fois installées dans les racines, sont capables de réduire l'azote minéral par l'intervention de la nitrogénase (ALLEN et ALLEN, 1981). Le *Rhizobium* le plus connu chez le mélilot est *Rhizobium meliloti* (UTRUP, 1993).

## 2.2.2.2 REPRODUCTION

### 2.2.2.2.1 Induction de la floraison

La photopériode\* est un facteur important de l'induction de la floraison. La variété annuelle Hubam se développe et fleurit sous toutes les photopériodes de 12 à 20 heures alors que les variétés bisannuelles (Madrid, Evergreen) ont besoin d'au moins 17 heures de jour pour fleurir. Soumises à des longueurs de jour de 18 heures, les variétés bisannuelles fleurissent en moins de 3 mois (à partir de la date de semis). Les variétés bisannuelles de *M. officinalis* fleurissent rarement la première année en plein champ. Soumises à des photopériodes de 20 heures, le délai de floraison est le même pour les plantes annuelles et bisannuelles (SMITH et GORZ, 1965).

### 2.2.2.2.2 Production de graines

La pollinisation entomophile est généralement réalisée par les abeilles. Il faut 3 ou 4 ruches pour assurer la bonne pollinisation d'un hectare de mélilot. Dans ces conditions, le rendement en graines varie entre 560 à 785 Kg ha<sup>-1</sup> (GOLPEN, 1979).

La fécondation a lieu de 18 à 21 heures après pollinisation (SMITH et GORZ, 1965).

Les populations de *M. albus* et *M. officinalis* sont plus ou moins *autocompatibles*\*. SANDAL et JOHNSON (1953) trouvent des taux d'autocompatibilité variant de 0 à 69% suivant les populations. SANO (1977) présente l'auto-incompatibilité comme un caractère hautement héritable pouvant être représenté de 2% à 99% selon les lignées. De plus, il trouve que les variétés annuelles sont plus autocompatibles (en moyenne 33%) que les variétés bisannuelles (en moyenne 20%).

GORZ et HASKINS (1971) mettent en évidence, à partir de l'étude de deux caractères simples, que l'aptitude naturelle au croisement paraît être suffisante pour restaurer la vigueur des variétés formées à partir de lignées. De fait, l'autofécondation, fréquemment utilisée dans les programmes d'amélioration du mélilot, provoque des baisses de vigueur.

Il est possible dans ce genre d'effectuer des *croisements interspécifiques*. Dans le cadre de la sélection de génotypes à faible teneur en dérivés coumariniques, le croisement de *M. albus* et *M. dentata* donne une F1\* déficiente en chlorophylle qui ne survit que quelques jours. Ces hybrides peuvent être menés à maturité en les greffant sur des plantes normales (SMITH, 1943). Une autre technique permettant d'obtenir des hybrides interspécifiques fertiles est la culture d'embryons. Des hybrides entre *M. albus* et *M. officinalis* ont ainsi été obtenus (WEBSTER, 1955).

| Symboles (allèles)                                      | Description                                                                  |
|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| A                                                       | Annuelle                                                                     |
| a                                                       | Bisannuelle                                                                  |
| B                                                       | Activité $\beta$ -Glucosidasique (formation de coumarine libre)              |
| b                                                       | Pas d'activité $\beta$ -glucosidasique (coumarines sous forme de glucosides) |
| Bd                                                      | Plante normale                                                               |
| bd                                                      | Plante naine (provient de la variété "Artic")                                |
| C                                                       | Feuilles normales                                                            |
| c                                                       | Feuilles incurvées                                                           |
| C                                                       | Enveloppe des semences colorée                                               |
| c                                                       | Pas de coloration de l'enveloppe des semences                                |
| Ch <sub>1</sub> , Ch <sub>2</sub> , Ch <sub>3</sub>     | Plante verte normale                                                         |
| ch <sub>1</sub> ou ch <sub>2</sub> , ou ch <sub>3</sub> | Plante déficiente en chlorophylle                                            |
| Cu                                                      | Forte teneur en coumarines                                                   |
| cu                                                      | Faible teneur en coumarines                                                  |
| D                                                       | Plante normale                                                               |
| d                                                       | Plante naine (provient de la variété "Common White")                         |
| E                                                       | Epistasique* à G, résistant ainsi au cancer de la tige                       |
| e                                                       | Aucune action sur G                                                          |
| G                                                       | Sensibilité au cancer de la tige                                             |
| g                                                       | Résistance au cancer de la tige                                              |
| Pg1, Pg2                                                | Plante normale verte                                                         |
| pg1 or pg2                                              | Plante vert pâle                                                             |
| Ru                                                      | Plante normale                                                               |
| ru                                                      | Feuilles rugueuses, effet pleïotropique*                                     |
| Sd                                                      | Plante normale                                                               |
| sd                                                      | Plante naine à port étalé (provient de la variété "Artic")                   |
| Y                                                       | Cotylédons jaunes ; enveloppe des semences colorée avec C                    |
| y                                                       | Cotylédons verts ; enveloppe des semences vertes avec C                      |
| —                                                       | Enveloppe des semences normale                                               |
| —                                                       | Taches brunes sur la membrane des semences, perméable (récessif)             |
| —                                                       | Marbrures sur l'enveloppe des semences (dominant)                            |
| —                                                       | Enveloppe des semences claire                                                |
| —                                                       | Feuilles normales                                                            |
| —                                                       | Feuilles coupées, effet pleïotropique (récessif)                             |

Figure 12 : Liste des gènes cités chez *M. albus* (SMITH et GORZ, 1965)

*Melilotus officinalis* est une plante très largement présente en Europe et aux États-Unis. Elle se rencontre à l'état spontané dans des endroits incultes, souvent sur des sols pauvres et drainants. C'est une plante fixatrice d'azote. Bisannuelle, elle fleurit rarement l'année du semis. A la fin de la première année de développement, elle stocke des réserves dans la racine dont elle se servira en seconde année.

### 2.2.3 AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE

Le défaut du mélilot en tant que plante fourragère est lié à la présence de coumarine libre induisant un manque d'appétence (BRINK, 1934) et au risque de formation de dicoumarol (molécule anticoagulante provoquant des hémorragies chez le bétail) en cas de mauvais séchage. (cf. 2.3.2. Voies de biosynthèse des coumarines). *Le caractère "faible teneur en coumarines" fut donc l'un des premiers à avoir été sélectionné.* (Figure 12 )

#### 2.2.3.1 DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE DE LA TENEUR EN COUMARINES

En 1937, SUVOROV montre que *M. dentata* possède une très faible teneur en coumarines. SMITH (1943) arrive par hybridation interspécifique à transférer dans *M. albus* le caractère "faible teneur en coumarines" de *M. dentata*. Bien que transmissible, ce caractère est fortement influencé par les facteurs du milieu, ce qui a pour conséquence de rendre la sélection difficile (SLATENSEK, 1947). Par la suite, GOLPEN *et al.* (1957) effectuent des croisements entre des plantes à coumarines libre et liées d'une part, et entre des plantes à forte et à faible teneur en coumarines d'autre part, puis étudient leurs descendance. Ils concluent que :

- le caractère "teneur en coumarines" est gouverné par **un gène** possédant **2 allèles\*** *Cu/cu*. L'allèle *cu* gouverne le caractère "faible teneur en coumarines" et provient de *M. dentata* ;
- un autre gène possédant aussi **2 formes alléliques** *B/b* gère l'**activité  $\beta$  glucosidasique**. Cette enzyme permet l'hydrolyse de la forme glucosylée de la coumarine, présente dans le mélilot frais, en coumarine libre ;
- le gène gouvernant la teneur en coumarines est indépendant du gène déterminant l'activité  $\beta$  glucosidasique.

Par la suite, GOLPEN *et al.* (1957) ; RUDORF et SCHWARZE (1958) ; KOSUGE (1961) ; HASKINS et GORZ (1961) et STOKER et BELLIS (1962) mettent en évidence qu'il *n'existe pas de coumarine libre dans le mélilot frais. Les plantes contiennent des  $\beta$  GOHCA\*\* sous forme cis et trans.* C'est lors de la rupture des tissus de la plante (récolte, séchage...) que GOHCA *cis* peut être hydrolysé par une  $\beta$  glucosidase spécifique (cf. 2.3.2. Voie de biosynthèse). En 1965, HASKINS et GORZ montrent que l'activité  $\beta$  glucosidasique des génotypes\* BB est 2,5 fois plus élevée que celle des génotypes Bb alors

| Genres et espèces                      | Plantes cultivées en chambre de culture |                     |                           |                 |                              |
|----------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------|------------------------------|
|                                        | Age,<br>(en jours)                      | Hauteur,<br>(en cm) | Total<br>% OHCA<br>± E.T. | % OHCA<br>trans | Activité<br>β-glucosidasique |
| <b>Melilotus - (Eumelilotus)</b>       |                                         |                     |                           |                 |                              |
| <i>M. alba</i> Desr.                   | 36                                      | 39                  | 6.67 ± .498               | 96              | +                            |
| <i>M. alba</i> Desr.                   | 29                                      | 34                  | 5.32 ± .338               | 96              | +                            |
| <i>M. altissima</i> Thuill.            | 36                                      | 34                  | 6.28 ± .367               | 93              | +                            |
| <i>M. altissima</i> Thuill.            | 34                                      | 33                  | 5.69 ± .919               | 93              | +                            |
| <i>M. dentata</i> (Waldst.&Kit.) Pers. | 38                                      | 41                  | 0                         |                 | -                            |
| <i>M. dentata</i> (Waldst.&Kit.) Pers. | 48                                      | 53                  | 0                         |                 | -                            |
| <i>M. hirsuta</i> Lipsky               | 42                                      | 30                  | 6.04 ± .751               | 94              | +                            |
| <i>M. hirsuta</i> Lipsky               | 38                                      | 23                  | 6.20 ± .555               | 94              | +                            |
| <i>M. officinalis</i> (L.) Lam.        | 31                                      | 33                  | 5.38 ± .521               | 97              | +                            |
| <i>M. officinalis</i> (L.) Lam.        | 34                                      | 33                  | 5.30 ± .397               | 98              | +                            |
| <i>M. polonica</i> (L.) Desr.          | 48                                      | 42                  | 7.30 ± .489               | 97              | +                            |
| <i>M. polonica</i> (L.) Desr.          | 48                                      | 44                  | 8.31 ± .502               | 97              | +                            |
| <i>M. suaveolens</i> Ledeb.            | 42                                      | 44                  | 4.71 ± .512               | 95              | +                            |
| <i>M. suaveolens</i> Ledeb.            | 36                                      | 27                  | 3.99 ± .716               | 97              | +                            |
| <i>M. taurica</i> (Bieb.) Seringe      | 62                                      | 33                  | 7.54 ± .505               | 95              | +                            |
| <i>M. taurica</i> (Bieb.) Seringe      | 62                                      | 39                  | 5.74 ± .789               | 95              | +                            |
| <i>M. wolgica</i> Poir.                | 41                                      | 55                  | 7.45 ± .386               | 96              | +                            |
| <i>M. wolgica</i> Poir.                | 41                                      | 68                  | 7.76 ± .774               | 95              | +                            |
| <b>Melilotus - (Micromelilotus)</b>    |                                         |                     |                           |                 |                              |
| <i>M. elegans</i> Salzm.               | 52                                      | 79                  | 6.02 ± .244               | 100             | +                            |
| <i>M. indica</i> (L.) All.             | 38                                      | 42                  | 4.32 ± .319               | 97              | +                            |
| <i>M. indica</i> (L.) All.             | 45                                      | 52                  | 6.29 ± .285               | 93              | +                            |
| <i>M. infesta</i> Guss.                | 43                                      | 36                  | 2.35 ± .107               | 100             | +                            |
| <i>M. italica</i> (L.) Lam.            | 42                                      | 39                  | 6.00 ± .157               | 98              | +                            |
| <i>M. italica</i> (L.) Lam.            | 42                                      | 39                  | 5.98 ± .138               | 100             | +                            |
| <i>M. macrocarpa</i> Coss.&Durieu      | 57                                      | 26                  | 6.17 ± .412               | 100             | +                            |
| <i>M. messanensis</i> (L.) All.        | 48                                      | 30                  | 0                         |                 | -                            |
| <i>M. messanensis</i> (L.) All.        | 48                                      | 37                  | 0                         |                 | -                            |
| <i>M. neapolitana</i> Ten.             | 43                                      | 40                  | 6.99 ± .322               | 100             | +                            |
| <i>M. segetalis</i> (Brot.) Seringe    | 60                                      | 28                  | 0                         |                 | -                            |
| <i>M. segetalis</i> (Brot.) Seringe    | 66                                      | 21                  | 0                         |                 | -                            |
| <i>M. speciosa</i> Durieu              | 38                                      | 51                  | 3.90 ± .170               | 100             | +                            |
| <i>M. speciosa</i> Durieu              | 31                                      | 39                  | 5.71 ± .348               | 95              | +                            |
| <i>M. sulcata</i> Desf.                | 31                                      | 29                  | 0                         |                 | -                            |
| <i>M. sulcata</i> Desf.                | 43                                      | 38                  | 0                         |                 | -                            |
| <b>Trigonella</b>                      |                                         |                     |                           |                 |                              |
| <i>T. anguina</i> Delile               | 28                                      | 6                   | 1.17 ± .103               | 99              | +                            |
| <i>T. arabica</i> Delile               | 28                                      | 23                  | 2.36 ± .121               | 97              | +                            |
| <i>T. arcuata</i> Meyer                | 54                                      | 11                  | 0                         |                 | -                            |
| <i>T. Balansae</i> Boiss. and Reut.    | 25                                      | 14                  | 0.68 ± .068               | 100             | +                            |
| <i>T. Brachycarpa</i> (Fisch.) Moris   | 49                                      | 5                   | 0                         |                 | -                            |
| <i>T. calliceras</i> Fisch.            | 49                                      | 29                  | 5.45 ± .216               |                 | +                            |
| <i>T. caerulea</i> (L.) Seringe        | 33                                      | 26                  | 0                         |                 | -                            |
| <i>T. corniculata</i> L.               | 35                                      | 18                  | 0                         |                 | -                            |
| <i>T. cretica</i> (L.) Boiss.          | 35                                      | 10                  | 4.63 ± .189               | 91              | +                            |
| <i>T. foenum-graecum</i> L.            | 40                                      | 20                  | 0                         |                 | -                            |
| <i>T. gladiata</i> Stev.               | 63                                      | 3                   | 0                         |                 | -                            |
| <i>T. kotschyl</i> Boiss.              | 45                                      | 22                  | 0                         |                 | -                            |
| <i>T. monantha</i> C.A. Mey.           | 45                                      | 14                  | 0                         |                 | -                            |
| <i>T. monspeliaca</i> L.               | 45                                      | 7                   | 0                         |                 | -                            |
| <i>T. noeana</i> Boiss.                | 45                                      | 15                  | 0                         |                 | -                            |
| <i>T. polycerata</i> L.                | 54                                      | 12                  | 0                         |                 | -                            |
| <i>T. raiata</i> (L.) Boiss.           | 49                                      | 4                   | 0                         |                 | -                            |
| <i>T. spicata</i> Sibth. and Sm.       | 54                                      | 19                  | 0                         |                 | -                            |
| <i>T. uncinata</i> Soland.             | 25                                      | 12                  | 0.95 ± .127               | 97              | +                            |
| <i>T. sp.</i>                          | 63                                      | 38                  | 6.07 ± .510               | 98              | +                            |

Tableau 3 : Teneur en acides hydroxycinnamiques (OHCA) et présence d'activité β glucosidasique chez 19 espèces du genre *Melilotus* et 20 espèces du genre *Trigonella* (GORZ et HASKINS, 1964)

que celle des bb est nulle. GORZ et HASKINS (1964) déterminent les teneurs en GOHCA de différentes espèces de *Melilotus* et de *Trigonella*.

Ces auteurs évaluent leur activité  $\beta$  glucosidasique (**Tableau 3**) en vue :

- d'obtenir des informations concernant les relations taxonomiques entre ces espèces ;
- de rechercher des gènes différents de "cu" pour le caractère "faible teneur en coumarines".

GORZ et HASKINS (1969) montrent que malgré sa notation, "*cu*" est *partiellement dominant sur "Cu"*. En effet, ils trouvent que les plantes Cucu contiennent 36% de la teneur en OHCA de CuCu. En F1\*, la teneur est plus proche de cucu. Le degré de dominance de cu sur Cu est de 0,299. Cette semi-dominance explique la difficulté rencontrée lors du classement des plantes d'une population en ségrégation. De plus, GORZ et HASKINS (1969) remarquent que les génotypes cucu sont plus grands et ont un développement plus rapide que les génotypes CuCu. Ils émettent donc *l'hypothèse d'une liaison entre les gènes du rendement en matière sèche par plante et du développement avec les allèles Cucu*.

*La fonction du gène Cu/cu n'est pas claire*. Elle pourrait se situer (cf. 2.3.2.) :

- soit au niveau de la PAL ;
- soit au niveau de l'ortho hydroxylase

KLEINHOF (1966) étudie l'activité de la PAL dans différents organes du mélilot de génotypes CuCu et cucu. Les très jeunes feuilles de CuCu ont une activité PAL environ 3 fois plus importante que celles des cucu et une teneur en OHCA 10 fois supérieure. Cependant, les autres expériences cherchant à mettre en évidence le contrôle de l'activité PAL par le gène Cu/cu ont échoué. HASKINS et KOSUGE (1965) incorporent dans des mélilots de génotypes cucu et CuCu de la phénylalanine, des acides cinnamiques *trans* et *cis*. Ils montrent qu'une plus grande transformation de la phénylalanine (32 fois supérieure) et de l'acide *trans* cinnamique (7 fois) en son glucoside a lieu dans les génotypes CuCu. La formation de  $\beta$  GOHCA dans les génotypes cucu à partir de AOC\*\* prouve que la faible teneur en  $\beta$  GOHCA est liée à un blocage d'une voie de biosynthèse et non à une destruction élevée de l'AOC ou du  $\beta$  GOHCA. Ils en concluent que le gène "cu" contrôlerait l'ortho hydroxylation de l'acide *trans* cinnamique. Cependant, GESTNER et CONN (1974) isolent l'ortho-hydroxylase chloroplastique permettant cette hydroxylation mais ne trouvent aucune différence d'activité entre les différents génotypes. Les données obtenues sont donc contradictoires. Ils posent alors l'hypothèse que dans les génotypes cucu l'acide *trans* cinnamique n'a pas accès au "canal" permettant l'hydroxylation, bien que l'enzyme soit présente dans le chloroplaste.

*Le déterminisme de la teneur en coumarine libre peut se résumer de la façon suivante :*

*- un gène possédant 2 formes alléliques gouverne la synthèse des glucosides ;*

*- l'activité  $\beta$  glucosidasique possède le même déterminisme génétique (un gène, deux allèles). Elle est spécifique du GOHCA cis et permet son hydrolyse en coumarine libre.*

*Le rôle du gène Cu dans la voie de biosynthèse des dérivés coumariniques n'est, à l'heure actuelle, toujours pas connu.*

### 2.2.3.2 PROGRAMMES DE SÉLECTION

Le mode de sélection le plus souvent appliqué au mélilot est la *sélection récurrente*. Ce type de sélection regroupe un ensemble de méthodes d'amélioration des populations qui reposent sur :

- l'identification des meilleurs individus dans les populations initiales hétérogènes ;
- l'interfécondation, généralement en panmixie\*, de ces génotypes sélectionnés pour former des populations améliorées.

La sélection récurrente procède par cycles successifs et selon un processus cumulatif : le résultat d'un cycle sert immédiatement de matériel de départ pour le cycle suivant, d'où le qualificatif de récurrente. Lorsque le mode de repérage des génotypes supérieurs s'effectue sur l'observation de leur seul phénotype\*, c'est de la sélection "massale". Il est ainsi possible d'introduire par une série de rétrocroisements\* (back cross) un caractère favorable apporté par une variété donneuse dans une variété à améliorer (variété récurrente). Dès 1952, JOHNSON arrive à améliorer le rendement du mélilot jaune bisannuel par cette méthode. GOLPEN (1971) crée la variété **Polara** (*M. albus*) en effectuant 3 rétrocroisements successifs de mélilot à faible teneur en coumarines (de 0 à 0,05 %) sur la variété récurrente **Artic** à forte teneur (de 3 à 5%). Les plantes en ségrégation à faible teneur en coumarines sont intercroisées. Les graines issues de ce poly-cross sont récoltées plante à plante. Cette variété Polara ne contient plus que des traces de coumarines, son rendement est de 10% inférieur à celle d'**Artic**. Ce phénomène est attribué au gène "faible teneur en coumarines".

Comme Polara, la variété **Yukon** (*M. officinalis*) est issue de la station canadienne de recherche agricole de Saskatoon. Elle a été créée à partir de la variété **Madrid** bien adaptée dans l'Ouest du Canada. Yukon présente un fort rendement en fourrage et graines, une bonne vigueur au semis, un haut degré de résistance au froid et une forte teneur en coumarines (GOLPEN, 1971).

**Norgold** est la première variété de *M. officinalis* à faible teneur en coumarines obtenue par rétrocroisements de **Yukon** sur une variété à faible teneur en coumarines. Elle a été créée à Saskatoon après 22 ans de recherche. Norgold produit 16% de fourrage de plus que Polara (GOLPEN, 1981).

D'autres techniques d'amélioration génétique ont été testées mais sont restées à l'échelle expérimentale. C'est le cas :

- du ***doublément chromosomique***. La polyploïdie\* n'existe pas naturellement chez le mélilot. Des polyploïdes ont cependant été obtenus à l'aide de colchicine. Une augmentation de la vigueur durant le développement par rapport aux plantes diploïdes est observée, mais la polyploïdie induit une diminution de la fertilité (SMITH, 1975) ;
- de ***l'obtention de variabilité génétique*** par exposition des graines à des ***agents mutagènes*** comme les neutrons (GENGENBACH *et al.*, 1969). Par cette dernière méthode, il a été possible d'obtenir des mélilots à faible teneur en dérivés coumariniques (SMITH et GORZ, 1965).

#### 2.2.3.3 TENEUR EN DÉRIVÉS COUMARINIQUES ET SENSIBILITÉ AUX AGENTS PATHOGÈNES

Certains métabolites secondaires de la famille des coumarines jouent le rôle de ***phytoalexines***. *In vitro*, la coumarine libre pure inhibe la croissance de champignons. Des études ont donc été mises en place en vue de montrer l'influence de la teneur en dérivés coumariniques sur la sensibilité du mélilot aux agents pathogènes. BERKENKAMP (1971) n'a pu montrer aucun effet de la teneur en coumarine libre sur la sensibilité du mélilot à l'infection par *Aschochyta imperfecta*, ni sur l'infection par le virus en mosaïque jaune du pois.

INGHAM (1978) a montré que la réaction du mélilot à une inoculation avec un champignon (*Helminthosporium carbonum*) provoque la synthèse non pas de dérivés coumariniques mais d'une ***phytoalexine isoflavonique : la medicarpine***. Cette molécule s'accumule dans les folioles de plants cultivés de *M. albus* et *M. officinalis* à faible et à forte teneur en dérivés coumariniques après une inoculation. Il y a aussi production de medicarpine lorsque les folioles sont irradiées en lumière U.V. de courte longueur d'onde. ***L'élimination du caractère "forte teneur en dérivés coumariniques" des mélilots cultivés ne paraît donc pas affecter la production de phytoalexines.*** En conséquence, les variétés à faible teneur en dérivés coumariniques ne devraient pas être plus sensibles à la colonisation fongique que les variétés à forte teneur.

## 2.2.4 CULTURE

### 2.2.4.1 TECHNIQUES CULTURALES

#### 2.2.4.1.1 Types de sol et conditions climatiques

Le mélilot est adapté à une large gamme de sols et de climats. Il est résistant à la sécheresse et au froid. Il peut être cultivé sur des sols salés ne convenant pas à la culture de céréales. Son système racinaire fort et profond et sa capacité à fixer l'azote assurent un bon développement sur des sols peu fertiles. Une bonne croissance est obtenue en sol drainé, humide, à pH compris entre 6,5 et 7,5 (SMITH, 1975).

#### 2.2.4.1.2 Dates de semis

Il est recommandé de semer les espèces bisannuelles en automne alors que les espèces annuelles doivent être semées au printemps.

La profondeur de semis joue un rôle important sur la levée. Une profondeur de l'ordre de 1,3 cm permet une levée régulière après environ 4 jours (GOLPEN, 1979).

Des *dormances\* exogènes physiques* existent chez le mélilot comme chez les Fabacées. Elles sont en général liées à la présence de tissus imperméables (ROBERTS et BODDRELL, 1985). C'est pourquoi les graines doivent être *scarifiées* afin de pouvoir germer correctement.

#### 2.2.4.1.3 Densité

Utilisé comme fourrage, ensilage ou engrais vert, le mélilot est généralement semé à raison de 9 à 11 kg ha<sup>-1</sup>, les lignes de semis étant espacées de 15 à 20 cm. Pour la production de graines, la densité préconisée est plus faible de 3,4 à 4,5 kg ha<sup>-1</sup> avec un espacement entre lignes de 61 à 91 cm (GOLPEN, 1979).

#### 2.2.4.1.4 Récolte

Suivant son utilisation, plusieurs dates et modalités de récolte du mélilot peuvent être appliquées. Dans le cas d'une utilisation médicinale, les sommités fleuries sont généralement récoltées mi-juin. Le rendement en matière sèche est de l'ordre de *7 tonnes par hectare* (SMITH, 1975).

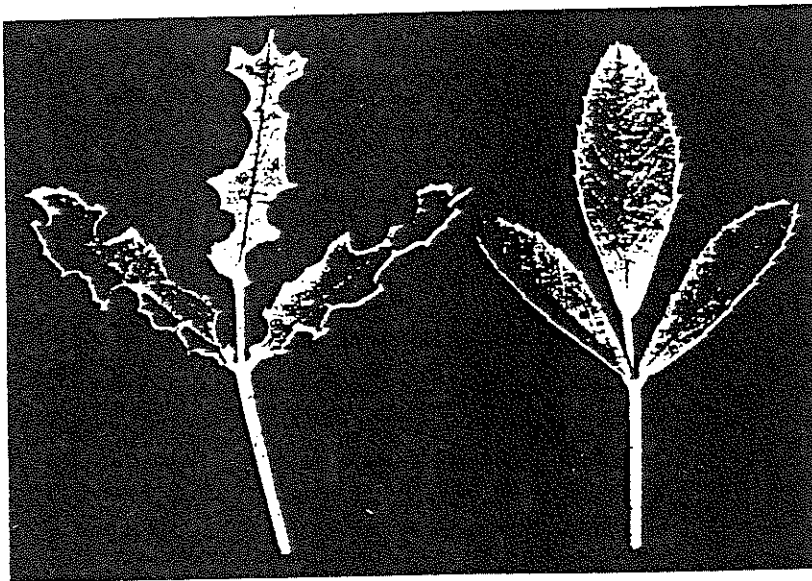


Figure 13 : Morsures de sitones sur feuilles de mélilot (GOLPEN, 1979 )

#### 2.2.4.2 AGENTS PATHOGÈNES

Le mélilot ne pose pas de gros problèmes en culture. Seul le charançon (*Sitona cylindricolis*) peut causer des dégâts importants. Il existe également quelques champignons et virus susceptibles d'affecter la culture de *Melilotus officinalis*.

##### 2.2.4.2.1 Insectes

Le charançon du mélilot (*Sitona cylindricolis*), originaire d'Europe centrale, a été introduit pour la première fois au Canada en 1924. Il s'attaque également à la luzerne. Les adultes se nourrissent au printemps et à l'automne du feuillage dans lequel ils découpent des encoches semi-circulaires (**Figure 13**).

Les graves infestations peuvent détruire des feuilles entières, sauf la nervure centrale, et endommager l'écorce externe des tiges des mélilots. Les larves s'alimentent durant l'été sur les racines mais n'occasionnent que peu de dégâts. Ce charançon passe l'hiver à l'état adulte dans le sol ou sous les débris végétaux et en sort entre la mi-avril et la mi-mai. Gris foncé avec des taches jaunes et noires, il mesure 4 mm de longueur et porte un rostre court et arrondi. Les oeufs sont déposés à la surface du sol de mai à août. Une seule femelle peut pondre jusqu'à 1 600 oeufs. Après une incubation de 2 à 3 semaines, les jeunes larves s'enterrent à une profondeur de 15 cm pour se nourrir des racines. Elles sont de couleur gris clair, apodes et atteignent une longueur de 4 mm. Plus tard, en juillet, elles remontent à 5 à 8 cm de la surface du sol pour la pupaison. Les adultes apparaissent au début d'août et s'alimentent sur les plants de mélilots jusqu'à l'arrivée du froid. Il n'y a qu'une génération par an. La rotation des cultures peut réduire dans certaines mesures les populations de sitones (INCONNU, 1981). En végétation, un traitement tous les 15 jours avec du lambda-cyhalothrine (*KARATE*, *SOPRA*) permet de limiter les dégâts (Communication personnelle CANTOT, INRA Lusignan). La sitone du pois (*Sitona luteus* L.) peut aussi s'attaquer au mélilot mais, plus sensible aux insecticides, elle est plus facile à maîtriser (MANGLITZ, 1976).

*La présence de coumarine libre semble favoriser les attaques de sitones.* En effet, la pulvérisation de coumarine libre sur des plantes les attirent (MATSUMOTO, 1962), alors qu'*une forte teneur en nitrates dans les plantes semble avoir une action répulsive* (MANGLITZ, 1976).

##### 2.2.4.2.2 Champignons et virus

Le mélilot est peu sensible aux attaques fongiques, il faut cependant noter la présence d'oïdium (*Erysiphe trifolii*, *E. polygori*) sur certaines variétés.

Des virus ont été observés sur le mélilot notamment issu de multiplication végétative. Ils n'ont pas été déterminés et leurs dommages restent extrêmement ponctuels.

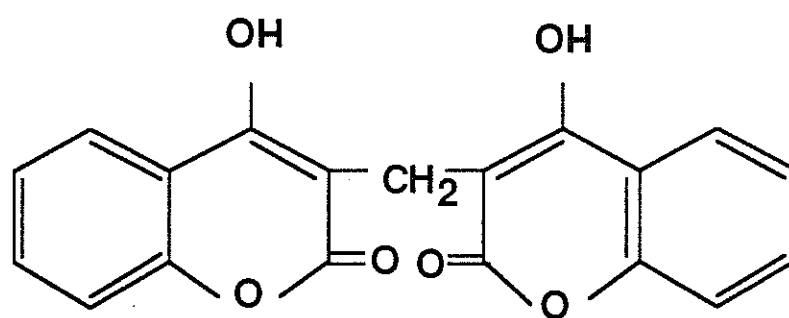


Figure 14 : le dicoumarol

### 2.2.5 COMPOSITION CHIMIQUE

La composition chimique du mélilot a été étudiée en vue de son utilisation à des fins fourragères et/ou médicinales.

Suivant les objectifs, les recherches ont concerné le métabolisme primaire, en particulier la teneur en protéines qui lui confère ses qualités nutritionnelles (GELCINSKAJA et BORDUNOVA, 1936 ; ARORA, 1970 ; BOLLER et ALIBERT, 1983 ; IVANOVA, 1983) ou le métabolisme secondaire (impliqué dans les propriétés pharmacologiques comme la teneur en coumarine libre).

Nous développerons ici ce second aspect.

Le mélilot contient :

- *des saponosides* (soyapogénols E et B, mélilotigénine) (KANG, 1987 et 1988) (Annexe 6) ;
- *des flavonoïdes* (PLOUVIER, 1963 ; SIMON et GOODALL, 1968 ; TORCK et ROBELET, 1971 ; SPECHT *et al.*, 1976 ; HAMMOUDA *et al.*, 1983 ; ROMBI, 1991 ; MACIAS, 1994) (Annexe 7) ;
- *des ptérocarpanes*. Ce sont des isoflavonoïdes comme la médicarpine qui jouent le rôle de phytoalexine (INGHAM, 1976 ; MIYASE *et al.*, 1982) (Annexe 8) ;
- *des acides phénoliques* (DOMBRORWICZ, 1991 ; MACIAS, 1994) (Annexe 9) ;
- *des coumarines* (Annexe 10).

*Suivant les auteurs, les techniques de dosage et le matériel végétal analysé, les teneurs en coumarines du mélilot officinal peuvent varier de 0,02 % à 2 % sur matière sèche* (GELCINSKAJA et BORDUNOVA, 1936 ; ZHELEZNOV et DEJNEKO, 1983).

Cependant, HASKINS *et al.* (1964) trouvent dans une étude comparative de différentes espèces de mélilot des teneurs en coumarines pouvant atteindre 7,8%.

Vers les années 1920, au Canada et dans le Nord des États-Unis, est apparue une maladie du bétail à allure épidémique se traduisant par de sévères hémorragies. Elle était consécutive à l'absorption de mélilot de mauvaise qualité. En effet, dans de mauvaises conditions de séchage, la molécule de coumarine subit une transformation par une moisissure conduisant à une dimérisation autour d'un groupement méthylène apporté par le champignon : il se forme du dicoumarol ou méthylène bis 3,3 (4-hydroxycoumarine) (Figure 14).

Ce composé est puissamment anticoagulant. Son absorption intestinale a un effet compétitif vis-à-vis de la vitamine K nécessaire à la biosynthèse hépatique du complexe thrombinique (DELAVEAU, 1984). Compte tenu de ses propriétés anticoagulantes, le dicoumarol est d'ailleurs couramment utilisé comme rodenticide.

La teneur en dicoumarol considérée comme toxique pour le bétail est de 20 p.p.m. de matière sèche dans le foin de *M. officinalis* et de *M. albus* bien que la norme adoptée pour le contrôle de routine soit inférieure ou égale à 500 p.p.m. Une bonne ventilation au cours du séchage ou

un traitement à l'acide propionique du matériel végétal récolté prévient la formation de dicoumarol (SANDERSON, 1986).

## 2.2.6 STABILISATION DU MATÉRIEL VÉGÉTAL

SLATENSEK (1947), GOLPEN *et al.* (1956), ASHTON et JONES (1959) ont étudié l'influence du séchage sur la teneur en coumarines du mélilot en vue de maîtriser les techniques permettant de produire du matériel à faible teneur en coumarine libre (anti-appétant pour le bétail et précurseur du dicoumarol). Les résultats obtenus sont contradictoires. C'est en 1973 que HASKINS et GORZ testent différentes températures de séchage en séchoir ventilé (25°C, 30°C, 40°C, 60°C, 100°C) sur différents génotypes de *M. albus* et *M. officinalis*. Ils montrent que pour les températures testées, la perte en coumarine libre est la plus importante à 25°C et que la plus grande proportion de coumarine libre est obtenue après séchage à 60°C. Il existe actuellement de nouvelles techniques visant à stabiliser rapidement le matériel végétal (lyophilisation, séchage aux micro-ondes) qui permettent de limiter les modifications moléculaires postrécolte (FOLDESI, 1975 ; ALLORGE et PLUMEL, 1984 ; GRONING et JANSKE, 1987 ; JAQUIN-DUBREUIL, 1989).

## 2.2.7 UTILISATIONS

### 2.2.7.1 PLANTE FOURRAGÈRE MELLIFÈRE ET AUTRES USAGES

Ses faibles exigences vis-à-vis du milieu ainsi que ses capacités d'amélioration des sols légers prédisposaient le mélilot à être la *plante fourragère* des sols légers en régions froides (Canada, Sibérie...). L'utilisation du mélilot (non encore sélectionné sur sa teneur en dérivés coumariniques) en Europe centrale fut pourtant un échec en raison des risques de formation de dicoumarol (UFER, 1934). Il reste toutefois largement utilisé au Canada où des variétés à faible teneur en coumarines sont commercialisées.

Le mélilot est également utilisé pour ses propriétés *mellifères* (SMITH et GORZ, 1965). Actuellement, le mélilot réapparaît sur les *jachères* comme *plante de couverture* ou encore comme *plante à vocation cynégétique*.

La coumarine libre contenue dans le mélilot lui confère des propriétés *aromatiques*. Il entre ainsi dans la composition de "sirupeux" mais son utilisation dans l'alimentation est réglementée. Il permet aussi d'aromatiser le tabac (WORNER et SCHREIER, 1990).

### 2.2.7.2 PLANTE MÉDICINALE

*Melilotus officinalis* L. figurait déjà à la pharmacopée française en 1884. En médecine populaire, cette **plante** est employée par voie orale comme antispasmodique et diurétique et surtout en lotion oculaire en raison de propriétés légèrement astringentes et anti-inflammatoires (PARIS et MOYSE, 1967). Les feuilles sèches et les fleurs de *Melilotus officinalis* ont été utilisées en Europe pour le traitement de l'arthrite, des bronchites et des rhumatismes (KANG, 1988) (Annexe 11). En Allemagne, *Melilotus altissima* est également inscrit à la pharmacopée. Il posséderait, d'après BEZANGER-BEAUQUESNE *et al.* (1990), une efficacité supérieure. Aujourd'hui, le mélilot est **cultivé à des fins médicinales sur quelques dizaines d'hectares en France**. Peu utilisé directement, il est en grande partie transformé sous forme d'**extraits** qui entrent dans la composition de **préparations galéniques**.

En France, l'extrait de mélilot intervient dans la fabrication :

\* Esbériven® (brevet de la société allemande Schaper et Brummer, commercialisé en France par les laboratoires Boots Pharma et Knoll). Cette spécialité pharmaceutique est présentée sous forme :

- de crème (extrait de mélilot titré en coumarine libre associé à de l'héparine) ;
- de solutions buvable et injectable (extrait de mélilot titré en dérivés coumariniques associé à du rutoside) ;
- de comprimés enrobés Esbériven fort® (extrait sec de mélilot titré en coumarine libre associé à de la rutine);

\* Avène Crème Mélilot® (Laboratoires Pierre Fabre). Elle comprend un extrait de mélilot associé à un extrait de *Ruscus*.

Les spécialités pharmaceutiques allemandes à base de mélilot sont notamment :

\* Venalot® (Laboratoires Schaper et Brummer). Ce sont des dragées contenant un extrait de mélilot et de la troxérutine.

\* Pascovénol® (Laboratoires Pascoe). Ce médicament associe l'extrait de mélilot à de la thiamine, du rutoside et d'autres extraits végétaux (Hamamélis, Marronnier d'Inde, Chardon Marie).

L'association d'un extrait de mélilot avec la rutine est commercialisée dans plusieurs pays comme la Suisse, le Brésil et le Japon (CASLEY-SMITH, 1982).

Les travaux pharmacologiques effectués sur l'Esbériven ® sous forme buvable ou injectable montrent que cette spécialité possède les propriétés suivantes :

- **un renforcement de la résistance capillaire** (FOLDI et ZOLTAN, 1965 ; DESMONS et SIMONS, 1975) ;
- **une amélioration de la circulation capillaire veineuse et lymphatique**

(SHIMAMOTO et TAKAORIS, 1965 ; DESMONS et SIMONS, 1975 ; LANGUILLAT, 1989) ;

- *un effet anti-inflammatoire* (DESMONS et SIMONS, 1975) ;

- *un effet anti-oedémateux* (SHIMOMURA *et al.*, 1965 ; HANDA *et al.*, 1992) ;

- *un effet cicatrisant* (HIGO *et al.*, 1978 ; NISHIKAWA *et al.*, 1981).

Les propriétés médicinales du mélilot sont essentiellement attribuées à la coumarine libre et aux flavonoïdes. Cependant dans le cadre de traitements thérapeutiques, il faut prendre en compte la présence d'acides phénoliques comme l'acide caféique, les acides *p* et *o* coumariques qui possèdent des activités anti-bactériennes et anti-mycosiques ou, comme l'acide salicylique, des propriétés anti-inflammatoires. L'acide férulique également présent dans les extraits de mélilot possède une activité cholagogue (DOMBROWICZ, 1991).

*Le mélilot a été cultivé pendant de nombreuses années comme plante fourragère. Cette production a régressé du fait de la présence de coumarine libre, une molécule possédant la propriété de se condenser, sous l'action de micro-organismes, en dicoumarol anticoagulant, dans le cas de mauvaises conditions de séchage. Le rôle des coumarines dans le mélilot n'est pas connu. Sous l'action d'éliciteur, le mélilot synthétise une phytoalexine : la medicarpine. Fabacée facile à cultiver, le mélilot réapparaît notamment sur les jachères dont il améliore les sols et peut, très ponctuellement, être valorisé comme plante médicinale. En effet, des extraits de mélilot entrent dans la composition de médicaments à visée essentiellement vasculaire.*

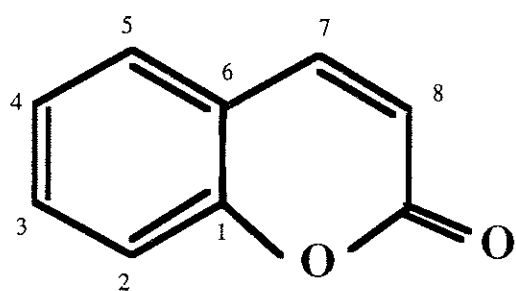


Figure 15 : la coumarine

## 2.3 LES COUMARINES

### 2.3.1 GÉNÉRALITÉS

#### 2.3.1.1 DÉFINITION

Les coumarines sont des métabolites secondaires très largement présentes dans le monde végétal. Elles appartiennent à la famille chimique des phénylpropanoïdes divisée en deux groupes d'isomères :

- les benzène  $\delta$ -pyrones ou chromones ;
- les benzène  $\alpha$ -pyrones ou coumarines.

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation (fermeture du cycle entre les groupements O-hydroxy et O-carboxyl) (HARBORNE, 1980). La plupart des coumarines d'origine naturelle, à l'exception de la coumarine libre elle-même, possèdent un oxygène sous forme hydroxyle ou méthoxyle en C7.

Ces composés phénoliques se présentent souvent liés à des glucosides surtout lorsqu'ils sont en solution vacuolaire (RICHTER, 1993).

La **coumarine libre** (Figure 15), est une molécule lactonique comportant deux cycles : un anneau hétérocyclique oxygéné et un noyau benzénique. Elle a été isolée pour la première fois par VOGEL en 1820 dans la fève Tonka (*Dipteryx odorata* Willd., Fabacées) appelée "coumarou" dans les îles Caraïbes (1 à 3%).

En 1833, la coumarine libre est isolée de *Melilotus albus*, plus tard, des feuilles d'aspérule odorante (*Asperula odorata*, Rubiacées), de lavande (*Lavandula officinalis*, Labiées), de flouve odorante (*Anthoxanthum odoratum*, Graminées), puis en quantité plus importante des feuilles de "Vanille de Caroline" (*Trilisa odoratissima*, Astéracées), une plante du Sud des États-Unis utilisée dans l'industrie du tabac (MILLSPAUGH, 1974 ; HASKINS *et al.*, 1972).

De plus, il existe une centaine de coumarines de synthèse (BROWN, 1977) dont certaines sont utilisées comme médicaments (par exemple, le Lysedem<sup>®</sup> à base de coumarine libre).

#### 2.3.1.2 CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES

**La coumarine libre** :  $C_9H_6O_2$  est un solide cristallin blanc, de masse molaire 146,15.

- Son point de fusion est de 68 - 70 °C,
- son poids spécifique de 1150 kg/m<sup>3</sup>,
- sa densité de 0,935,
- son point d'ébullition de 301,72°C.

Elle possède une forte odeur, agréable qui explique sa large utilisation dans l'industrie cosmétique. Elle est très soluble dans l'éthanol, le chloroforme, l'éther et les huiles essentielles ; elle est soluble dans les solutions alcalines.

La coumarine libre se solubilise plus facilement dans l'eau chaude (20 mg ml<sup>-1</sup>) que dans l'eau froide (2,5 mg/ml) (SIGRIST, 1984).

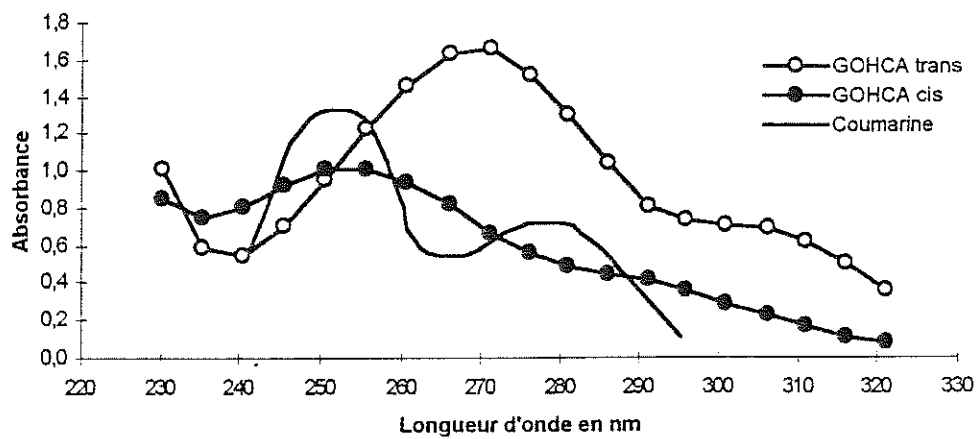


Figure 16 : Spectres d'absorption U.V. de la coumarine et des  $\beta$  glucosides des acides ortho hydroxycinnamiques *trans* et *cis* (KOSUGE, 1961)

**Les coumarines** absorbent les radiations infrarouges et la lumière U.V. (**Figure 16**) autour de 300 nm. La valeur exacte de cette bande dépend de la nature et du nombre de substituants sur le noyau benzénique. Le spectre de la coumarine libre en U.V. révèle des pics d'absorption à 274 et 311 nm qui ont été attribués respectivement aux noyaux benzène et pyrone (MURRAY, 1982). Les coumarines présentent une fluorescence bleue sous U.V.

Les méthodes les plus classiques de caractérisation sont :

- la chromatographie en couche mince ;
- la spectroscopie U.V. ;
- la chromatographie en phase liquide.

### 2.3.2 VOIE DE BIOSYNTHÈSE

La synthèse des coumarines du mélilot est actuellement bien connue contrairement à leur catabolisme et à leur rôle dans la plante.

L'intérêt de la voie de biosynthèse des coumarines a été stimulé par la recherche d'espèces de mélilot déficientes en coumarine libre. GOLPEN *et al.* (1956) sont les premiers à mettre en évidence que la coumarine libre isolée des plantes est seulement un artefact. En effet, la coumarine libre se trouve sous forme de  $\beta$  GOHCA *cis* dans le mélilot et très peu de coumarine libre existe dans la "cellule intacte". Le même phénomène est observé dans les feuilles de flouve odorante (*Anthoxanthum odoratum*), d'avoine odorante (*Hierochloe odorata*), de fève du Tonka (*Dipteryx odorata*) et de plusieurs espèces de *Trigonnella* (HASKINS *et al.*, 1972 ; STOCKER et BELLIS, 1962).

Des travaux avec des substrats marqués au  $^{14}\text{C}$  chez le mélilot et *Hierochloe odorata* ont montré que la voie de l'acide shikimique est utilisée pour la biosynthèse des coumarines et de l'OHCA (KOSUGE et CONN, 1959). La voie de l'acide shikimique fournit des précurseurs de synthèse aux composés phénoliques, en particulier la **phénylalanine** et la **tyrosine**. La plupart des enzymes de cette chaîne réactionnelle ont été caractérisées *in vitro* chez les végétaux mais leur localisation intracellulaire demeure mal connue.

La voie de biosynthèse des coumarines dans le mélilot est présentée **Figure 17**.

Elle est détaillée étape par étape dans les paragraphes suivants.

Ce chapitre a pour objectif de présenter l'état des connaissances et la complexité des mécanismes impliqués dans la synthèse des coumarines. Dans le cas de lacunes bibliographiques sur le mélilot, des exemples seront ponctuellement pris dans d'autres genres.

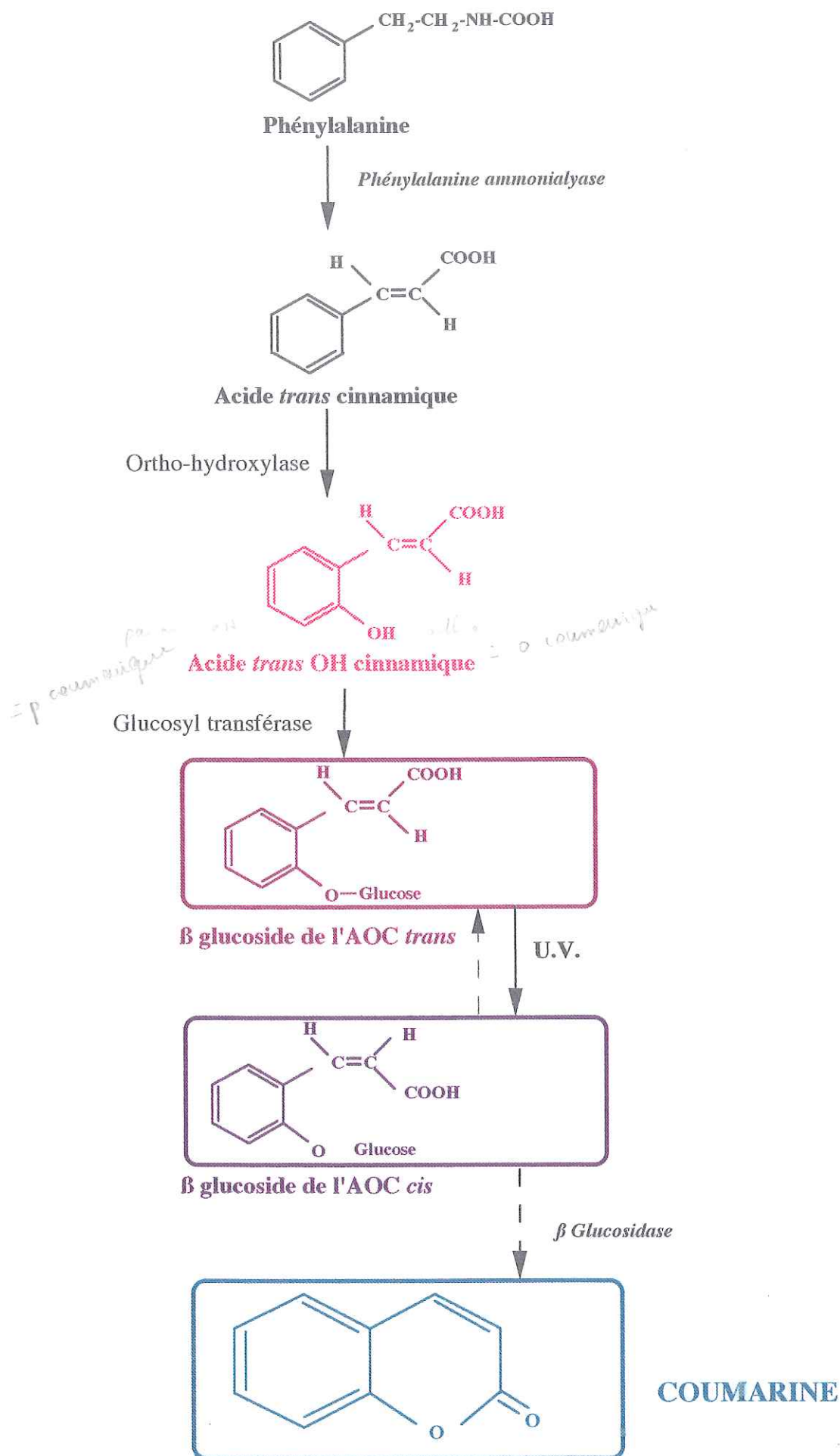


Figure 17 : Voie de biosynthèse des coumarines dans le mélilot

### 2.3.2.1 LA PHÉNYLALANINE AMMONIALYASE

La PAL est l'enzyme la plus étudiée du métabolisme secondaire. Elle a fait l'objet de travaux récents.

#### 2.3.2.1.1 Généralités

Découverte en 1961 par KOUKOL et CONN, la PAL est présente dans toutes les plantes vertes ainsi que dans les cryptogames supérieurs, les Basidiomycètes et les Streptomycètes (CAMM et TOWERS, 1973). Cette enzyme catalyse la réaction de désamination de la L phénylalanine pour donner de l'acide *trans* cinnamique et de l'ammoniaque. Elle permet la *diversion de la L phénylalanine vers les voies de biosynthèse des métabolites secondaires*. C'est la première étape de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes chez les plantes. Ainsi l'acide cinnamique, produit de cette réaction enzymatique, est le précurseur *de la lignine, des flavonoïdes, des coumarines*, etc. (JORRIN, 1990).

#### 2.3.2.1.2 Structure et localisation

Il existe généralement plusieurs *formes isoenzymatiques* de la PAL dans les plantes. Dans le cas du maïs et de la pomme de terre, c'est un tétramère composé de 2 sous-unités possédant chacune un site actif (STAFFORD, 1974).

La PAL est une enzyme relativement stable et facile à doser (CAMM et TOWERS, 1973), localisée dans les différents organes de la plante, souvent dans l'épiderme ou dans les cellules adjacentes du métaxylème (cellules vraisemblablement impliquées dans le maintien d'une alimentation en précurseurs des phénylpropanoïdes au xylème pour former de la lignine) (NEUMANN, 1991). Dans ces cellules, les sous-unités PAL sont dans le *cytosol* bien qu'une partie soit associée à une endomembrane (SMITH, 1994). D'autres sites de désamination ont été mis en évidence dans plusieurs organites ou fractions cellulaires dont les *mitochondries* et les *chloroplastes* (BOLWELL *et al.*, 1985). Ces derniers possèdent une activité PAL fermement liée aux thylakoïdes\*.

*L'acide cinnamique* est la molécule de base de nombreux métabolites secondaires. C'est pourquoi, *la multiplicité des sites de synthèse* de ce composé représente vraisemblablement une situation favorable pour la cellule. Cette *compartimentation* pourrait faciliter une *régulation indépendante des différentes voies métaboliques issues de l'acide cinnamique*. Ainsi, la distribution de la PAL dans le méfilot suggère que, dans les jeunes feuilles, cette enzyme permet la synthèse d'OHCA alors que dans les tiges où elle est fortement présente, elle induit plutôt la synthèse de lignine (KLEINHOF, 1966).

### 2.3.2.1.3 Régulation

#### 2.3.2.1.3.1 Régulation interne

Le rôle de régulation de l'activité PAL dans le métabolisme des phénylpropanoïdes est mal connu en raison du *manque de corrélation observé entre l'activité PAL et l'accumulation de composés phénoliques spécifiques*.

Dans différentes espèces de plantes et en culture de tissus, il a été montré une augmentation concomitante du taux de PAL et de composés phénoliques mais cette relation n'est pas toujours établie (HAHLBROCK, 1976). En effet, l'étude d'un polyphénol ou d'un groupe de polyphénols ne correspond pas forcément à l'ensemble de la synthèse de phénylpropanoïdes produit par la plante (MARGNA, 1977). Ainsi, KLEINHOF, (1966) n'observe pas de différence d'activité PAL entre les génotypes de mélilot à forte et à faible teneur en coumarines. De plus, il remarque que la défoliation entraîne à la fois une diminution de l'activité PAL et une augmentation de la teneur en OHCA. Par contre, les jeunes feuilles de mélilot possèdent une activité PAL 40 fois plus élevée que les feuilles matures et une teneur en OHCA 3 fois plus grande.

En fait, la *capacité de désamination de la PAL est très supérieure à la formation de polyphénols dans la plupart des tissus*. L'*approvisionnement en phénylalanine* semble être *un facteur beaucoup plus limitant* dans l'accumulation de composés phénoliques que l'activité de la PAL. Dans les tissus, la teneur en phénylalanine libre est faible et constante.

Les différentes formes isoenzymatiques de PAL possèdent des propriétés différentes (BOLWELL, 1985 ; JORRIN, 1989). Une autorégulation cellulaire par une rétro-inhibition des produits synthétisés est possible ; elle est vraisemblablement transitoire car les formes phénoliques simples sont rapidement transformées par glycosylation ou par estérification puis stockées dans la vacuole ou la paroi (RANJEVA, 1977).

#### 2.3.2.1.3.2 Régulation externe

Le taux de PAL est affecté par différents facteurs notamment :

- *l'état physiologique de la plante* (CAMM et TOWERS, 1973),
- *les blessures*,
- *les infections* (CUNHA, 1988),
- *les régulateurs de croissance*,
- *la lumière* (NGUYEN, 1992 ; GANTET, 1993).

L'activité de la PAL décroît à l'obscurité (ROUBELAKIS-ANGELAKIS et KLIEWER, 1986).

\* Les U.V. sont connus pour augmenter sensiblement la PAL soluble en culture de cellules (HAHLBROCK, 1976). Ainsi, les U.V. autour de 350 nm déclenchent la

synthèse de flavonoïdes en induisant la formation de PAL (CZICHI et KINDL, 1977).

\* Un éclairage court avec du rouge suivi d'un retour à l'obscurité provoque une augmentation de l'activité PAL. Un éclairage bref avec du rouge sombre supprime la réponse du rouge (CAMM et TOWERS, 1973). La lumière rouge intervient par le biais du phytochrome et stimule l'activité de la PAL (GOUD, 1991).

\* L'activité de la PAL est induite par la lumière bleue et blanche (CASTANEDA et QUINTERO, 1991).

ENGELSMA (1972) rapporte que le  $Mn^{++}$  peut se substituer à la lumière bleue sur la PAL. Le  $Mn^{++}$  augmente l'activité de la PAL et la concentration en acides hydroxycinnamiques.

Le taux de cette enzyme peut varier de façon significative pendant un intervalle de temps court en réponse à différentes stimulations (CAMM et TOWERS, 1973). L'activité PAL est inhibée *in vitro* par les acides cinnamiques (LAMB et RUBERY, 1976).

#### 2.3.2.2 L'ORTHO-HYDROXYLASE

Cette enzyme est en grande partie liée aux chloroplastes (KINDL, 1971), plus particulièrement à leur membrane (BROWN, 1981 ; MURRAY, 1982). Elle permet la conversion de l'acide *trans* cinnamique en acide *trans* hydroxy-2 cinnamique. Dans une préparation de chloroplastes de *M. albus*, en présence de NADPH\*\*, cette réaction est accrue par la présence de lumière ou de glucose 6 phosphate (GESTNER et CONN, 1974).

#### 2.3.2.3 LA GLUCOSYL TRANSFÉRASE

Les enzymes de la voie des sucres sont exclusivement localisées dans le cytosol et peuvent constituer un marqueur de ce compartiment cellulaire (CANUT *et al.*, 1984). La glucosyl transférase permet la glucosylation de l'OHCA *trans* en  $\beta$  GOHCA *trans*. Cette réaction a été mise en évidence dans des extraits de cellules cultivées *in vitro* de *M. albus* en présence d'UGDP (KLEINHOF, 1967).

#### 2.3.2.4 L'ISOMÉRIISATION DU GOHCA TRANS EN CIS

HASKINS *et al.* (1964) montrent que *la conversion du  $\beta$  GOHCA trans en  $\beta$  GOHCA cis est une réaction photochimique non enzymatique*. Pour cela, ils utilisent des folioles de *M. albus* à forte teneur en coumarines cultivé en chambre de culture sous lumière blanche. Dans ces conditions, 95 à 100% des coumarines sont sous forme de  $\beta$  GOHCA *trans*. Ces auteurs placent ces folioles, un extrait de ces folioles et une solution témoin de GOHCA *trans* sous U.V. Ils montrent que :

- la forme *trans* est toujours présente dans les folioles (au minimum 23%) ;

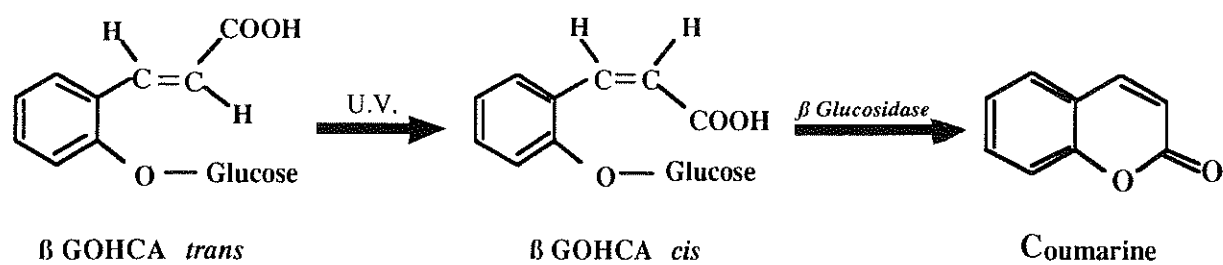


Figure 18 : Réaction d'isomérisation et d'hydrolyse des coumarines

- la diminution de la forme *trans* est, dans tous les cas, proportionnelle à l'apparition de la forme *cis* ;
- une solution témoin de  $\beta$  GOHCA *trans* est totalement isomérisée.

Cette réaction s'effectue à des longueurs d'onde inférieures à 360 nm mais il semble possible que des longueurs d'onde supérieures à 640 nm aient aussi une efficacité. Les plantes cultivées en serre, exposées une journée à la lumière du jour, ne contiennent plus que 17% de coumarines sous forme *trans* (HASKINS et GORZ, 1970).

Cependant, SCHON (1966) tente de purifier de la forme *cis* à partir d'une solution de GOHCA *trans* soumise aux U.V. (312 nm). La réaction n'est pas totale et se stabilise à 70 % de GOHCA *cis* et 30 % de GOHCA *trans*. De plus, il y a des pertes en GOHCA *trans* (Figure 18).

### 2.3.2.5 LA $\beta$ GLUCOSIDASE

*La  $\beta$  glucosidase du mélilot permet l'hydrolyse du  $\beta$  GOHCA cis en OHCA cis.* Elle est *spécifique de la forme cis* contrairement à d'autres  $\beta$  glucosidases comme l'émulsine (KOSUGE et CONN, 1961). L'OHCA *cis* se *lactonise spontanément* pour donner de la coumarine libre.

L'activité  $\beta$  glucosidasique a été détectée dans toutes les espèces de mélilot et de trigonelle contenant des quantités appréciables de GOHCA (GORZ et HASKINS, 1964).

Chez le mélilot, l'activité  $\beta$  glucosidasique est notamment fonction :

- du *génotype*. Les génotypes bb contiennent une protéine électrophorétiquement et sérologiquement identique à la  $\beta$  glucosidase active des génotypes BB mais elle ne possède pas son activité enzymatique (GILCHRIST *et al.*, 1970) ;
- du *stade de développement de la plante* (HASKINS et GORZ, 1965).

La plus grande partie de la  $\beta$  glucosidase des feuilles de *M. albus* se trouve dans le *compartiment extra cytoplasmique du mésophylle* (OBA *et al.*, 1981). Le pH optimum de la  $\beta$  glucosidase se situe autour de 5 (SCHON, 1966 ; JAYNES *et al.*, 1972).

Lorsque l'enzyme et son substrat sont localisés dans des tissus différents, l'hydrolyse ne peut avoir lieu que s'ils sont mis en contact. Ainsi, si le rôle des glucosides est mal connu chez les plantes, il demeure, de la même manière, des incertitudes quant au rôle des  $\beta$  glucosidases (HOSEL et CONN, 1982).

*Pour que le glucoside cis contenu dans les vacuoles des cellules du mélilot libère de la coumarine libre, il faut une rupture des tissus afin que la  $\beta$  glucosidase extra cytoplasmique intercellulaire entre en contact avec celui-ci et l'hydrolyse.*

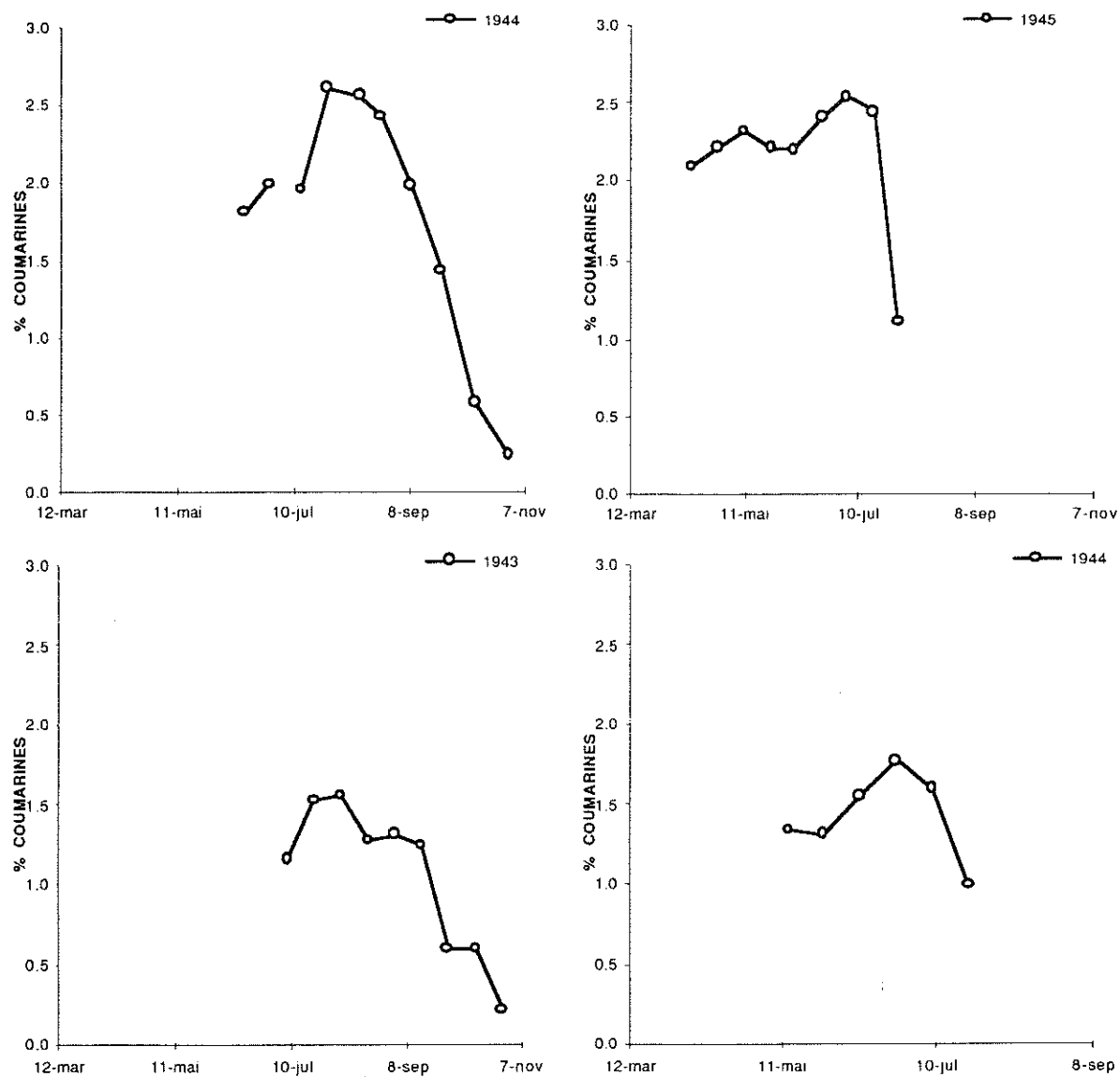


Figure 19 : Evolution de la teneur en coumarines dans les feuilles du mélilot durant les 2 années de son cycle de développement (SLATENSEK, 1947)

### 2.3.3 LIEUX DE SYNTHÈSE ET DE STOCKAGE

#### 2.3.3.1 DANS LA PLANTE

Les coumarines ont, très tôt, donné lieu à des recherches sur leur localisation dans la plante et sur l'évolution de leurs taux au cours du cycle de développement.

GELCINSKAJA et BORDUNOVA (1936) étudient la composition chimique de *Melilotus albus* au cours de sa croissance. Ils montrent que la teneur en dérivés coumariniques des parties aériennes augmente avec l'âge de la plante avec un maximum à la floraison.

SLATENSEK (1947) (Figure 19) précise notamment :

- que la *teneur en dérivés coumariniques est supérieure dans les tissus à forte activité métabolique comme les jeunes feuilles ou les bourgeons* ;
- que *très peu de dérivés coumariniques se trouvent dans les feuilles en automne alors que leur teneur augmente dans les racines* ;
- qu'une *corrélation positive existe entre les teneurs observées en première et deuxième années de culture*.

En 1958, RUDORF et SCHWARZE étudient la teneur en dérivés coumariniques de feuilles d'âges différents, récoltées le même jour. Ils trouvent 0,046% de dérivés coumariniques dans les feuilles jeunes et 0,013% dans les feuilles plus âgées. SMITH (1975) mesure la plus forte concentration de la plante en ces molécules dans les bourgeons (jusqu'à 2,5 %).

Afin de localiser le lieu de biosynthèse des dérivés coumariniques dans la plante, MOTHES et KALA (1955) greffent des Fabacées ne synthétisant pas ces dérivés sur du mélilot et retrouvent ces composés dans les parties aériennes. Ils posent alors l'hypothèse d'une synthèse de dérivés coumariniques par les racines et d'une migration vers les pousses. REPPPEL et WAGENBRETH (1958) réalisent le même type d'expérience en greffant *Melilotus albus* sur *Trigonella foenum-graecum* (dépourvu de dérivés coumariniques). Ils trouvent peu de coumarines dans les pousses de *M. albus* et en déduisent que les racines sont nécessaires à la synthèse des coumarines probablement parce qu'elles fournissent un précurseur essentiel. SCHLOSSER - SZIGAT (1962) a mené d'importantes expériences de greffage sur différentes espèces de *Melilotus* et d'autres Fabacées. Il conclut que :

- la teneur en dérivés coumariniques du porte greffe est influencée partiellement voire totalement par le greffon ;
- les dérivés coumariniques sont principalement synthétisés dans les parties aériennes.

Des résultats similaires ont été obtenus par GOLPEN *et al.* (1956) et GORZ et HASKINS (1962).

D'autres études ont été menées par *culture d'organe isolé*. Ainsi, WEYGANT et WENDT (1959) montrent que la culture de racines de *M. officinalis* synthétise des coumarines. Cependant, SMIRNOV et KUZOVNIKA (1974) isolent des racines de *M. albus* et les cultivent durant une période longue en propagation clonale, sur un milieu gélinifié. Ils constatent que celles-ci perdent leur capacité d'accumuler des coumarines contrairement aux racines des plantules intactes.

*Les racines et les parties aériennes du mélilot pourraient synthétiser des dérivés coumariniques. Cependant, dans des conditions normales de croissance, la synthèse aurait lieu de façon prédominante dans les organes jeunes, notamment dans les feuilles et les bourgeons (BROWN, 1981).*

#### 2.3.3.2 DANS LES TISSUS ET LES CELLULES

Les travaux d'OBA *et al.* (1981) sur la répartition des coumarines dans les feuilles de mélilot montrent que la concentration est la même dans l'épiderme et le mésophylle. Comme l'épiderme représente 10% du poids de la feuille, le mésophylle contient 90% ou plus des coumarines. Les *vacuoles* isolées des protoplastes du mésophylle contiennent l'ensemble des coumarines initialement présentes dans les protoplastes. La rapidité de la séquestration vacuolaire de ces molécules confirme l'hypothèse d'une mise à l'écart des substances toxiques dans la vacuole. Des études cinétiques réalisées en présence ou en l'absence de divers effecteurs\* connus pour perturber les échanges trans-membranaires ont mis en évidence que :

- le glucoside est transporté tel quel du cytoplasme vers la vacuole ;
- le contrôle de ces échanges est sous la dépendance de la différence de pH existant entre le cytosol et la vacuole.

Dans le cas des métabolites primaires, l'étape vacuolaire est généralement temporaire alors que le stockage des métabolites secondaires paraît y être définitif. Cette constatation implique la présence au sein de la vacuole d'un système de "piégeage" énergétiquement peu coûteux pour la cellule, capable de retenir et de concentrer ces composés. L'isomérisation de la forme *trans* en *cis* du GOHCA pourrait être à l'origine d'un tel phénomène (RATABOUL et ALIBERT, 1983). En ce qui concerne le lieu de synthèse des coumarines, les *chloroplastes* s'avèrent être un site possible. En effet, des chloroplastes isolés de Pétunia sont capables de former des dérivés coumariniques à partir de phénylalanine. Toutefois, on ne peut localiser l'ensemble du métabolisme phénolique dans un organe précis. Il semble possible de *distinguer des séquences réactionnelles se déroulant dans différents compartiments et qui, par l'intermédiaire de complexes multi-enzymatiques, conduiraient à la synthèse des coumarines* (ALIBERT, 1977).

*Les coumarines du mélilot résultent de plusieurs réactions enzymatiques. Chacune des enzymes impliquées dans leur production possède des caractéristiques propres de synthèse, de localisation, de régulation.*

*Leur activité est dépendante de nombreux facteurs dont la présence de substrat dans leur compartiment cellulaire, des phénomènes de rétroinhibition, des facteurs externes...*

*La production et le stockage des coumarines par la plante est un mécanisme complexe, difficile à appréhender au sein des différents niveaux d'organisation de la plante. En effet, bien que toutes les étapes de la synthèse soient connues au niveau moléculaire, il reste encore beaucoup à apprendre sur les liens existants entre les différentes molécules produites, leurs sites de synthèse au niveau cellulaire, leur localisation et leur stockage dans les tissus.*

## 2.3.4 EXTRACTION ET DOSAGE

### 2.3.4.1 EXTRACTION

Un très grand nombre de techniques d'extraction de coumarines dans le mélilot a été publié. Les solvants les plus couramment utilisés sont l'eau bouillante (HASKINS *et al.*, 1972), l'éthanol (Deutsche Arznei Codex, 1986), le méthanol, différents mélanges hydro-alcooliques (HARBORNE, 1989 ; VAN DE CASTEELE *et al.*, 1983) et l'acétonitrile (BOS *et al.*, 1995).

*De la qualité du protocole d'extraction vont dépendre les concentrations en coumarines obtenues. C'est pourquoi, ces protocoles d'extraction variant considérablement suivant les auteurs, les concentrations présentées dans la bibliographie ne doivent être considérées qu'à titre indicatif.*

La technique retenue par la pharmacopée française pour mettre en évidence la présence de coumarine libre consiste en une extraction à l'eau en maintenant l'ébullition 2 mn. La pharmacopée allemande dans la DAC10 préconise une extraction de la coumarine libre par reflux au méthanol pendant une heure.

La méthode classiquement adoptée pour un dosage *quantitatif* des coumarines est celle présentée par VILLENEUVE et ABRAVANEL en 1982. Elle consiste en une extraction avec de l'éthanol à 80% suivie d'une hydrolyse acide après évaporation de l'alcool. Le GOHCA *trans* est alors transformé en AOC alors que le GOHCA *cis* est hydrolysé en coumarine libre.

### 2.3.4.2 DOSAGE

En 1913, OBERMAYER met au point la première méthode pour quantifier les coumarines dans le mélilot. Depuis cette époque, une grande quantité de méthodes qualitatives et quantitatives ont été utilisées (SMITH, 1943 ; BEHR, 1957). Nous en citerons quelques-unes :

#### \* *Fluorescence*

Cette technique est simple d'emploi mais manque de sélectivité car dans les coumarines du mélilot, seule la coumarine libre donne une bonne réponse en fluorescence lorsque son cycle est ouvert sous l'action d'une base. D'autres molécules contenues dans un extrait de mélilot sont susceptibles d'être détectées (pigments, etc.). Cette technique n'est donc pas spécifique d'une seule substance mais "intègre" un complexe de molécules fluorescentes (RUDORF et SCHWARZE, 1958 ; HASKINS *et al.*, 1972). Cependant, BOS *et al.* (1995) trouvent que cette technique est plus sensible que la détection U.V. La fluorescence est classiquement utilisée en chromatographie en couche mince mais peut également être appliquée dans le cadre du *test d'écrasement*. HASKINS et GORZ (1970) et GORZ *et al.* (1992) pratiquent ce test en vue d'effectuer un grand nombre d'analyses.

Ce test consiste à :

- écraser un bout de feuille fraîche de mélilot sur du papier filtre ;
- faire agir une  $\beta$  glucosidase afin d'assurer l'hydrolyse de la forme liée ;
- pulvériser tous les spots avec de la NaOH pour ouvrir le cycle et rendre la coumarine libre fluorescente ;
- observer en fluorescence sous lumière U.V. à 360 nm.

Ce test est particulièrement intéressant lorsqu'il s'agit d'effectuer un tri parmi un grand nombre d'échantillons mais ne peut être utilisé pour des mesures quantitatives fines.

### \* HPLC

La chromatographie en phase liquide permet la séparation et le dosage quantitatif d'une large gamme de composés phénoliques simples et de substances proches, au moyen de colonnes de silice à polarité de phase inversée. VAN DE CASTEELE *et al.*, (1983) utilisent une colonne Lichrosorb R.P.18 et une combinaison de solvants en mode isocratique et linéaire (solvant A, eau-acide formique 95-5; solvant B, méthanol ; à 35°C) à 280 nm. D'autres techniques sont classiquement retenues (VILLENEUVE et ABRAVANEL, 1982 ; WALTERS *et al.*, 1980).

### \* Autres techniques

Dans le cas des furocoumarines, BOURGAUD *et al.* (1995) ont mis au point une technique de dosage par *test ELISA*. Toujours dans le cadre du dosage de ces molécules, NGUYEN (1992) utilise un *biotest* par mesure d'une zone d'inhibition provoquée par la solution à tester sur une culture de bactéries.

Les coumarines peuvent également être dosées par électrophorèse capillaire (TOMAS-BARBERAN, 1995). La coumarine libre est volatile ; cependant l'analyse quantitative en chromatographie en phase gazeuse manque de reproductibilité (BOS *et al.*, 1995).

## 2.3.5 ACTIVITÉS BIOLOGIQUES ET TOXICITÉ

Plusieurs acides hydroxycinnamiques et les coumarines simples sont connus pour provoquer diverses réactions (Annexe 12) notamment :

- \* une inhibition de la croissance des plantes et des micro-organismes (SVENSSON, 1971 ; GRIGG, 1978 ; TANIYA, 1986 ; MACIAS, 1994 ; HARBORNE, 1989 ; RYBNIKAR et MINAR, 1985)
- \* une inhibition de la formation des nodules par les végétaux symbiotiques abritant *Rhizobium* (RICHTER, 1993) ;
- \* l'inhibition d'un certain nombre d'enzymes ( $\beta$  amylase, invertase, phénolase) et la stimulation d'autres comme l'indolique acide oxydase (BROWN, 1977) ;
- \* une inhibition du transport d'électrons (NASH *et al.*, 1991) ;
- \* une activité antimétabolique (PODBIELKOWSKA *et al.*, 1995).

Bien qu'il existe de nombreuses études sur les activités biologiques des coumarines, leurs mécanismes d'action restent peu connus.

Les coumarines peuvent être *toxiques* chez les mammifères ; elles pourraient, entre autres, être la cause :

- \* de *lésions du foie* : chez le rat, la coumarine libre produit une nécrose fibrolobulaire hépatique à 0,86 mmol/Kg (LAKE, 1994). Cependant, le métabolisme est un facteur déterminant en ce qui concerne la réponse hépatotoxique et la différence de métabolisme entre les espèces devrait être prise en compte pour évaluer un éventuel effet hépatotoxique chez l'homme (COHEN, 1979) ;
- \* de *dermites* (HARBORNE, 1989) ;
- \* de *cancers* (BROWN, 1977 ; MURRAY, 1982).

### 2.3.6 UTILISATIONS ET ACTIVITÉS PHARMACOLOGIQUES

La coumarine libre a été largement utilisée comme aromatisant de denrées alimentaires et dans l'industrie de la parfumerie (savons, lotions). Elle est également présente dans les plastiques, les peintures, les sprays afin de neutraliser leurs odeurs désagréables. Sa plus large utilisation reste malgré tout liée à son activité pharmacologique.

De nombreux articles ont été publiés sur ses activités *thérapeutiques* (TAITO, 1964 ; SHILLING *et al.*, 1969 ; MURRAY, 1982 ; SIGRIST, 1984).

*Le métabolisme et les activités pharmacologiques de la coumarine libre sont actuellement bien connus alors que les données concernant les  $\beta$  glucosides de l'OHCA sont totalement inexistantes dans la bibliographie.*

La coumarine libre est pratiquement totalement absorbée après administration orale, métabolisée en 7-hydroxycoumarine dans le foie ; elle est rapidement absorbée par l'intestin chez l'homme où elle subit une glucuronisation. Son élimination se fait par voie urinaire.

Les principales activités pharmacologiques de la coumarine libre sont :

**- un effet antiphlogistique et antioedemateux selon la dose**

La coumarine libre est depuis peu utilisée à forte dose (100 à 400 mg/jour) comme stimulant des macrophages dans le traitement des oedèmes à forte teneur en protéines (LAMIABLE, 1993). Plus de 130 expériences montrent que ces drogues réduisent ces oedèmes car elles

- augmentent la lyse normale des protéines dans les tissus,
- provoquent l'ouverture des jonctions intercellulaires et la constriction des sphincters précapillaires ;
- dilatent l'anastomose artério-veineuse.

Le résultat est une augmentation de la pression et du débit sanguin ainsi qu'une meilleure oxygénation (FÖLDI et ZOLTAN, 1970 ; FÖLDI-BORCOK *et al.*, 1971 ; PILLER, 1977 ; CASLEY-SMITH, 1982) ;

*- la stimulation de la microcirculation*

La coumarine libre est couramment utilisée à faible dose comme protecteur vasculaire dans le traitement des symptômes des insuffisances veineuses (LAMIABLE, 1993).

Par ailleurs, *une activité antitumorale* a été récemment mise en évidence. Plusieurs auteurs ont montré que la coumarine libre peut avoir une activité chez les patients atteints de tumeurs avancées du rein (MARSHALL, 1994). VONANGERER (1994) montre aussi que l'administration de coumarine libre inhibe la croissance de la tumeur de la prostate Noble Nb-R et réduit le nombre des métastases dans le cancer du poulmon de façon significative (de 40 à 50 %).

*Les données bibliographiques concernant le mélilot et ses dérivés coumariniques sont souvent anciennes et contradictoires. Il est difficile de juger si les résultats présentés sont le fruit de phénomènes biologiques réels ou seulement d'artefacts liés aux techniques utilisées (modes d'extraction, de dosage,...). De plus, cette synthèse bibliographique met en évidence le "cloisonnement" de tous les travaux menés à chacun des niveaux d'organisation de la plante.*

*Ainsi, la voie de biosynthèse des coumarines est bien connue, mais la régulation et la localisation dans les compartiments cellulaires des différentes étapes le sont beaucoup moins. Les sites de synthèse les plus actifs de la plante semblent être les organes jeunes et actifs, mais il n'existe pas de données sur le transport des dérivés coumariniques dans la plante. Les connaissances sur les mécanismes de stockage des coumarines sont également limitées.*

*Ce travail de recherche a pour objectif d'essayer d'appréhender le métabolisme secondaire de façon "intégrée" en vue de mieux comprendre et maîtriser la production de métabolites secondaires d'intérêt pharmaceutique.*

## 2.4 CHOIX DES OBJECTIFS DE TRAVAIL

L'objectif de cette étude est :

- d'une part, de définir un itinéraire technique\* permettant de maîtriser la production de mélilot à forte teneur en dérivés coumariniques ;
- d'autre part, de transformer au mieux les dérivés coumariniques produits en coumarine libre au cours de la récolte et des étapes de transformation ultérieures (séchage, extraction) du matériel végétal produit.

Pour atteindre cet objectif, il est indispensable de disposer de connaissances sur :

*- l'ensemble des étapes de la "filrière" conduisant à la production d'un extrait :*

- \* *extraction,*
- \* *broyage,*
- \* *stabilisation,*
- \* *récolte,*
- \* *production du matériel végétal au champ (techniques culturales) ;*

*- la plante :*

- \* *sa biologie,*
- \* *la synthèse et la localisation des coumarines.*

En conséquence nous avons décomposé cette étude en différentes problématiques :

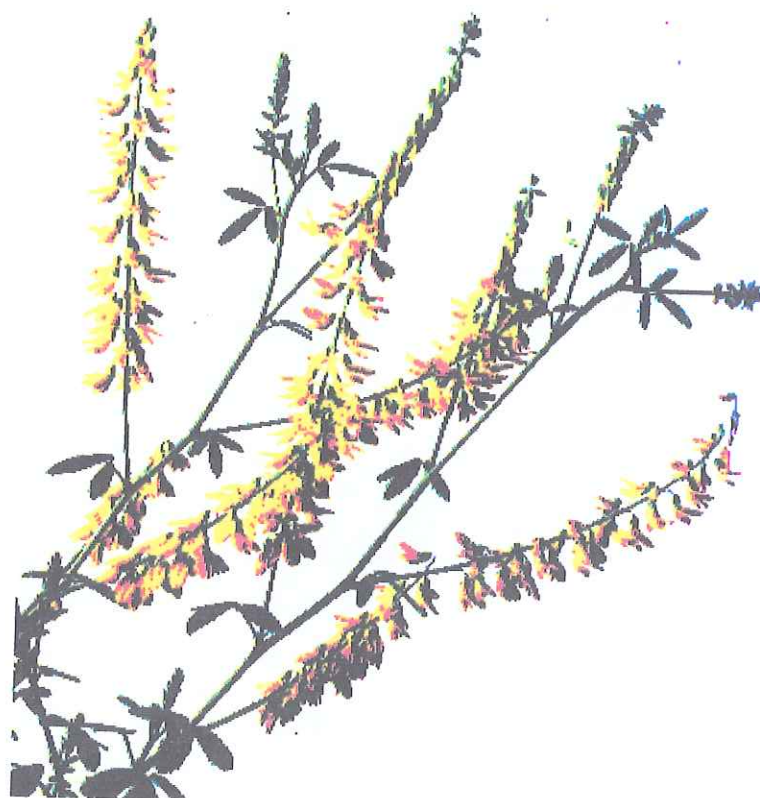
- \* la première, *d'ordre technique*, vise à mettre au point et à optimiser les techniques utilisées au cours de cette filière de production notamment le séchage du mélilot et l'extraction des coumarines ;
- \* la seconde, *d'ordre génétique*, a pour but d'évaluer la variabilité génétique et de sélectionner les populations et génotypes les plus performants ;
- \* la troisième, *d'ordre écophysiologique*, a pour objectif de vérifier et d'approfondir les connaissances acquises sur la synthèse des dérivés coumariniques par le mélilot.

Nous tenterons à ce niveau de répondre à plusieurs questions concernant :

- *le lieu de synthèse des dérivés coumariniques dans la plante,*
- *l'évolution de la teneur en dérivés coumariniques dans les différents organes de la plante au cours du temps,*
- *l'interaction entre la teneur et le rendement en dérivés coumariniques par plante,*
- *les facteurs susceptibles de réguler et de stimuler la synthèse de dérivés coumariniques, en particulier la lumière ;*

\* la dernière étape consiste à utiliser ces données pour proposer une technique raisonnée de production de mélilot à forte teneur en coumarine libre.

Contribution à l'amélioration  
des teneurs et rendements en  
dérivés coumariniques et  
en coumarine libre  
de *Melilotus officinalis* L.



## ESSAIS :



## APPLICATIONS :

Hauteur, nombre et dates des coupes  
Densité

Sélection d'une population à haut potentiel

Choix des techniques culturales

Choix d'une modalité d'extraction et de séchage

Figure 20 : Schématisation du déroulement du travail de thèse

L'amélioration des teneurs et rendements en coumarines du mélilot passe par une bonne maîtrise des techniques postrécolte (extraction, séchage ...) et par une bonne connaissance du matériel végétal utilisé. Une fois ces techniques et données acquises, il est possible d'entreprendre des études d'ordre écophysiologique en vue de valider et faire avancer les connaissances notamment sur la synthèse et la migration des coumarines dans le mélilot. Ces données fondamentales nous permettront ensuite de déterminer un itinéraire technique en vue de produire du mélilot à forte teneur en coumarines (Figure 20).

Les résultats des expérimentations menées sur le mélilot sont présentés par rapport au rendement ou aux composantes du rendement en coumarines du génotype ou de la population étudiée :

|                                                                                                                                                    |   |   |   |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|---|---|
| $\text{Rdt}^{**} \text{ coumarines ha}^{-1} = \% \text{ de coumarines} \times \text{Poids sec par plante} \times \text{Nombre de plantes ha}^{-1}$ |   |   |   |
| 1                                                                                                                                                  | 2 | 3 | 4 |

Chaque échantillon analysé est en général caractérisé par :

- 1- *le rendement en coumarines par unité de surface, par plante ou par organe,*
- 2- *le pourcentage de coumarines* contenu dans la matière sèche de mélilot ou *teneur en coumarines,*

Cette valeur correspond à la somme *exprimée en coumarine libre* :

- du GOHCA *trans*,
- du GOHCA *cis* (dans le cas où l'hydrolyse en coumarine libre n'a pas eu lieu),
- de la coumarine libre.

|                                                                                                                                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\% \text{ de coumarines} =$ $[(\% \text{ GOHCA } trans + cis) / (PM_{\text{coumarine libre}} / PM_{\text{GOHCA}})] + \% \text{ coumarine libre}$ |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

$$PM_{\text{coumarine libre}} = 146,15$$

$$PM_{\text{GOHCA}} = 343,32$$

- 3- *le rapport entre ces différentes molécules,*
- 4- *le poids frais et/ou le poids sec exprimé par unité de surface, par plante ou par organe.*

Pour chaque modalité testée, trois à quatre répétitions ont été effectuées. Les résultats présentés sont :

- soit les moyennes et les écart types de ces répétitions (moyenne  $\pm$  écart type) ;
- soit la valeur de chaque répétition.

## Domaines abordés

Agronomie

Génétique

Pathologie

Physiologie

Botanique

Biochimie

## Niveaux d'organisation

Population au  
champ ou en serre

Plante isolée  
*in situ*  
ou  
*in vitro*

Organes  
(feuilles, fleurs, tiges,  
racines....)

Extrait

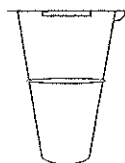
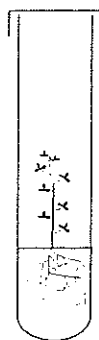
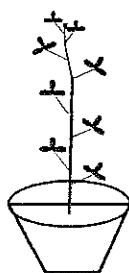
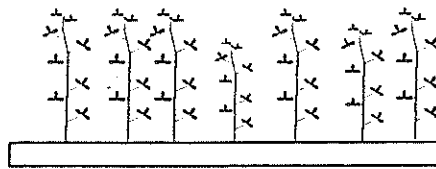


Figure 21 : Domaines de recherche abordés et niveaux d'organisation étudiés

Dans certains cas exceptionnels, nous n'avons eu qu'un seul échantillon par modalité (manque de matière sèche pour effectuer plusieurs dosages ...), ces résultats sont notés sans écart type et sont présentés à titre indicatif.

Le nombre très important de données collectées au cours de ces expérimentations nous ont amenés à effectuer un choix quant aux résultats présentés. Les données complémentaires sont placées en annexes.

Les analyses statistiques (analyses de variances, test de comparaison multiple de moyennes de SCHEFFE au seuil de 1%) ont été effectuées avec le logiciel SYSTAT.

Du fait de ce type de démarche allant de la population végétale à la composition de l'extrait, nous avons travaillé à plusieurs niveaux d'organisation de la population végétale ou de la plante et avons donc abordé différents domaines de recherche. Ceux-ci sont présentés **Figure 21**.

### 3.1 ÉTUDES PRÉLIMINAIRES : MISES AU POINT TECHNIQUES ET CHOIX DU MATÉRIEL VÉGÉTAL

#### 3.1.1 INFLUENCE DES TECHNIQUES POSTRÉCOLTE SUR LE RENDEMENT EN COUMARINES

Avant de mettre au point un itinéraire technique visant à produire du mélilot à forte teneur en coumarines, il est nécessaire de savoir comment valoriser au mieux le "potentiel en coumarine libre" (molécule recherchée par l'industrie pharmaceutique) du matériel végétal aux différentes étapes de la filière de production.

Les facteurs susceptibles de limiter les éventuelles pertes de cette molécule et ceux pouvant favoriser sa formation vont être étudiés connaissant :

- la forme de stockage des coumarines dans le matériel végétal frais : GOHCA *trans* et *cis*,
- la réaction entre le GOHCA *trans* et le GOHCA *cis* : isomérisation sous l'action des U.V.,
- la localisation de l'enzyme et de son substrat permettant la formation de coumarine libre : le GOHCA *cis* est stocké dans la vacuole, la  $\beta$  glucosidase est intercellulaire.

Pour permettre la formation de coumarine libre, il faut donc tenter de trouver des techniques favorisant :

- l'isomérisation du GOHCA *trans* en *cis*,
- un bon contact entre la  $\beta$  glucosidase et son substrat, le GOHCA *cis*,
- une bonne activité de la  $\beta$  glucosidase.

### 3.1.1.1 EXTRACTION

*Objectif : Mettre au point une technique d'extraction simple, efficace, fiable et reproductible et la comparer avec une technique de référence décrite dans la bibliographie.*

Les teneurs en coumarines du mélilot présentées dans la bibliographie peuvent être très variables. Dès 1940, WHITE et HORNER notent des variations de teneurs en coumarines suivant le titre alcoolique du solvant d'extraction. C'est pourquoi, il est important de prendre en compte les techniques d'extraction et de dosage utilisées par les différents auteurs pour pouvoir comparer ces résultats puisque chaque auteur utilise une technique qui lui est propre sans jamais la comparer aux autres. De plus, il n'existe pas de technique de dosage officielle dans la pharmacopée, seule une chromatographie en couche mince est obligatoire.

Plusieurs techniques d'extraction issues de la bibliographie ou nouvelles vont être présentées afin d'extraire la plus grande partie du potentiel en coumarines du matériel végétal, et ce de manière simple et rapide du fait du très grand nombre d'échantillons à analyser dans le cadre de ce programme de recherche.

#### 3.1.1.1.1 Matériel et méthodes

##### Molécules témoins

La coumarine libre et l'AOC proviennent de chez ROTH (KARLSRUHE).

Quelques milligrammes de GOHCA *trans* nous ont été envoyés par le Professeur S.A.BROWN de l'Université de l'ONTARIO (Canada) et le Professeur PLOUTON de l'Université d'IOWA (U.S.A).

Le GOHCA *cis* a été obtenu par isomérisation sous U.V. de la forme *trans*.

##### \* Extraction, identification et quantification des coumarines (Essai 1)

Matériel végétal :

Parties aériennes de plantes (origine 112) semées en plein champs en mai 1991 et récoltées en juin 1992, séchées 24 heures à 60°C puis broyées.

Sept techniques d'extraction ont été comparées à partir du même échantillon de mélilot.

\* Une des techniques de référence pour le dosage des coumarines du mélilot a été décrite par VILLENEUVE et ABRAVANEL (1982). Elle est notée V :

1 g de drogue est immergé dans 500 ml d'éthanol à 80% et agité 1 heure à température ambiante. Après filtration, la phase liquide est évaporée sous vide à basse température

(30°C). Le résidu est placé dans un tampon acétate (pH5), hydrolysé 4 heures avec de l'émulsine à (0,3%) à 37°C et acidifié à pH2 avec de l'HCl (1N).

Une autre technique utilisée consiste à supprimer l'étape d'hydrolyse avec l'émulsine. Les glucosides peuvent donc être directement quantifiés par HPLC. Dans ce cas, le résidu obtenu après l'extraction à l'éthanol de l'échantillon est dissous dans 25 ml d'eau distillée et dilué 2 fois.

\* Extraction à l'eau

1 g de drogue est plongé dans 25 ml d'eau bouillante et agité 30 mn à température ambiante (AKESON *et al.*, 1963).

\* Extraction au méthanol à température ambiante

1 g de drogue est plongé dans 25 ml de méthanol et agité 30 mn à température ambiante.

\* Extraction sous reflux de solvants : méthanol, acétate d'éthyle, diethyl éther, chloroforme

1 g de drogue est placé sous reflux 24 heures dans 100 ml de solvant.

Dosage des coumarines :

La coumarine libre et les GOHCA *cis* et *trans* sont dosés par chromatographie en phase liquide sur une colonne (Lichrosorb C 18 ; 250 mm x 4 mm ; Merk, Darmstadt) suivant la méthode décrite par VAN DE CASTEELE et VAN SUMERE (1983). Les composés sont identifiés avec un spectrophotomètre U.V. et comparés au témoin.

La phase mobile est constituée de méthanol (A) et d'acide formique à 5 ‰ dans l'eau (B).

| Durée (mn) | Flux (ml mn <sup>-1</sup> ) | % de A | % de B |
|------------|-----------------------------|--------|--------|
| 0          | 1,5                         | 93     | 7      |
| 2          | 1,5                         | 93     | 7      |
| 8          | 1,5                         | 85     | 15     |
| 25         | 1,5                         | 25     | 75     |
| 27         | 1,5                         | 20     | 80     |
| 29         | 1,5                         | 20     | 80     |
| 35         | 1,5                         | 0      | 100    |
| 42         | 1,5                         | 0      | 100    |
| 50         | 1,5                         | 93     | 7      |

\* Quantité minimale de matériel végétal nécessaire (Essai 2)

Matériel végétal :

Origine BORNTRAGGER semée en semis d'automne à Varize (28) et récoltée en juin de l'année suivante.

3 fois 1g, 0,5g, 0,1g, 0,05g, 0,01g de drogue sont placés :

- dans 25 ml d'eau froide pour les pesées de 1g et 0,5g,
- dans 5 ml pour les pesées de 0,1g et 0,05 g,

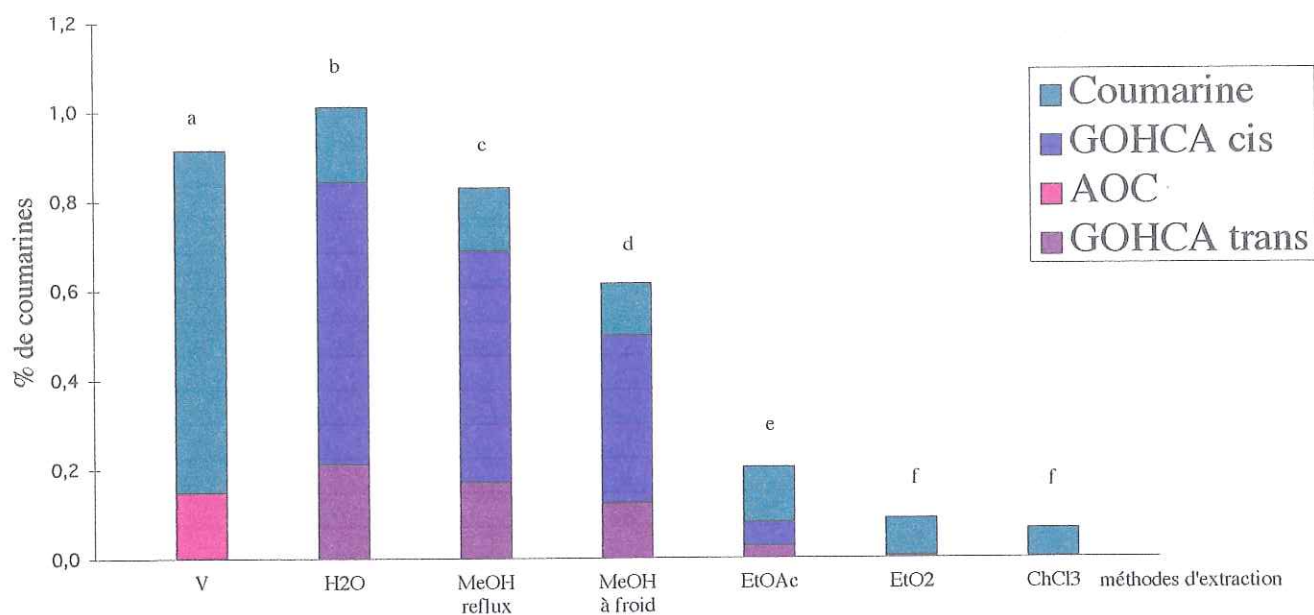


Figure 22 : Teneur en coumarines en fonction de la modalité d'extraction (d'après BOURGAUD *et al.*, 1994)

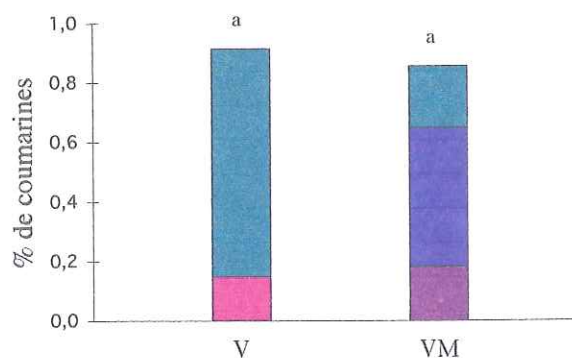


Figure 23 : Teneur en coumarines suivant la méthode d'extraction de VILLENEUVE et ABRAVANEL (1982) : V et cette même méthode modifiée : VM

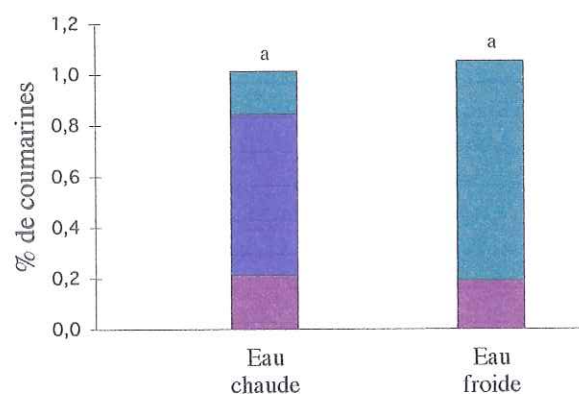


Figure 24 : Teneur en coumarines après extraction à l'eau chaude et froide

- dans 2 ml pour les pesées de 0,01g,  
et agités 30 mn

Dosage des coumarines :

La coumarine libre et les GOHCA *cis* et *trans* sont dosés par chromatographie en phase liquide sur une colonne (Lichrosorb C 18 ; 250 mm x 4 mm ; Merk, Darmstadt) suivant la méthode de VAN DE CASTEELE et VAN SUMERE (1983) *modifiée*.

La phase mobile est constituée de méthanol (A) et d'acide formique à 5 ‰ dans l'eau (B).

| Durée (mn) | Flux (ml mn <sup>-1</sup> ) | % de A | % de B |
|------------|-----------------------------|--------|--------|
| 0          | 1,5                         | 20     | 80     |
| 2          | 1,5                         | 20     | 80     |
| 13         | 1,5                         | 80     | 20     |
| 15         | 1,5                         | 80     | 20     |
| 19,5       | 1,5                         | 20     | 80     |
| 22         | 1,5                         | 20     | 80     |
| 23         | 1,5                         | 20     | 80     |

### 3.1.1.1.2 Résultats et discussion

#### 3.1.1.1.2.1 Comparaison de 7 techniques d'extraction

Les résultats sont présentés **Figure 22**.

Dans le cas des méthodes d'extraction faisant intervenir des solvants organiques, la qualité d'extraction des coumarines est fonction de la polarité des solvants utilisés. L'extraction au méthanol sous reflux pendant 24 heures permet l'extraction de la même quantité de coumarines que la méthode utilisée par VILLENENEUEVE et ABRAVANEL, ce qui tend à montrer que des solvants de polarités proches possèdent une capacité d'extraction quasi identique. Cependant, une extraction rapide (30 mn) au méthanol à température ambiante donne une teneur en coumarines nettement inférieure. L'acétate d'éthyle extrait la même quantité de coumarine libre que les autres méthodes mais donne des résultats plus faibles pour les glucosides. Cette tendance est encore plus nette avec le diéthyl éther et le chloroforme dans lesquels aucun glucoside n'est extrait. Ceci s'explique par la faible solubilité des GOHCA dans les solvants non polaires.

La plus forte concentration en coumarines est obtenue par la méthode d'extraction à l'eau. Toutefois, la méthode de VILLENEUEVE et ABRAVANEL (1982) permet également l'extraction d'une bonne quantité de OHCA et de coumarine libre. Cette méthode donne la plus forte concentration en coumarine libre comparée aux 6 autres méthodes et l'OHCA *trans* est bien extrait avec cette méthode de référence. Dans le but de simplifier la méthode de référence, une version modifiée de la méthode de VILLENEUEVE et ABRAVANEL (1982) a été testée.

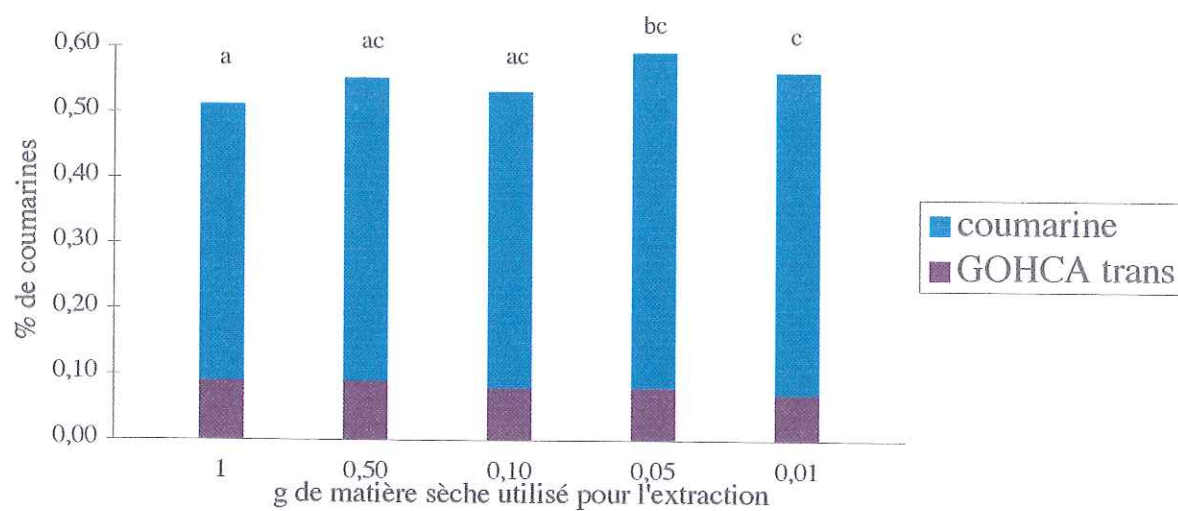


Figure 25 : Influence de la quantité de matière sèche utilisée pour l'extraction sur la teneur en coumarines

présentée **Figure 23**. La méthode classique utilise l'émulsine. Celle-ci est une  $\beta$  glucosidase non spécifique de la forme *cis* du GOHCA et contrairement à celle du mélilot, elle hydrolyse également la forme *trans* en AOC.

L'extraction à l'eau a été testée à deux températures, à 100°C (AKESON *et al.*, 1963) et à température ambiante. Ces deux méthodes permettent d'extraire exactement la même quantité de coumarines (**Figure 24**) mais à température ambiante, le GOHCA *cis* est hydrolysé en coumarine libre, ce qui prouve que la  $\beta$  glucosidase naturelle contenue dans le mélilot reste active après séchage à 60°C.

*Il est conseillé d'extraire à l'eau froide. C'est une méthode simple, fiable et peu coûteuse.*

#### **3.1.1.1.2.2 Quantité minimale de matériel végétal nécessaire**

Les résultats sont présentés **Figure 25** et montrent qu'il est possible d'effectuer de façon fiable des extractions à l'eau à température ambiante sur de petites quantités de matériel végétal (jusqu'à 0,1 g). En effet, il apparaît des différences significatives sur les deux dernières modalités. Dans ces deux cas, les coefficients de variation sont légèrement plus importants.

La technique de dosage HPLC raccourcie par rapport à l'expérience précédente, sera retenue pour les expérimentations ultérieures.

#### **3.1.1.1.3 Conclusion**

Le solvant et la technique d'extraction employés jouent un rôle important tant sur la quantité des coumarines extraites que sur leurs formes chimiques.

La technique d'extraction à l'eau à température ambiante permet d'extraire la quantité la plus importante de coumarine libre du matériel végétal. Cependant, elle présente l'inconvénient de ne pas donner la composition exacte des différentes formes de coumarines et n'est vraisemblablement pas directement applicable à l'industrie. En effet, l'eau peut poser des problèmes bactériologiques et rend l'extrait difficile à concentrer (risque de pertes en coumarine libre et consommation d'énergie importante). Ainsi, cette technique ne donne pas la quantité de coumarine libre valorisée par l'industrie. Elle indique le potentiel en coumarine libre du matériel végétal c'est-à-dire la quantité de coumarine libre qui serait valorisable par les industries, dans la mesure, où elles adaptent leur technique d'extraction. En effet, les solvants classiquement utilisés par l'industrie ne favorisent ni la réaction d'hydrolyse ni l'extraction des glucosides.

*Dans le cas où l'hydrolyse n'a pas été effectuée dans des étapes antérieures de la filière (ce qui arrive lorsque la récolte est réalisée de façon traditionnelle : à l'autochargeuse\* suivie d'un séchage à 40°C), une grande partie du "potentiel en coumarine libre" n'est pas valorisée du fait des techniques d'extraction inadaptées.*

### 3.1.1.2 SÉCHAGE

#### *Objectifs :*

- \* Déterminer l'influence du mode et du temps de séchage sur la teneur en coumarines du mélilot*
- \* Définir la température de séchage optimale, c'est-à-dire permettant :*
  - de limiter les pertes en coumarine,*
  - de favoriser l'hydrolyse du GOHCA cis en coumarine libre,*
  - un séchage de qualité à moindre coût.*

Le séchage est un facteur influant sur la qualité des plantes médicinales. Ce facteur est rarement travaillé de façon rigoureuse car à l'interface entre plusieurs disciplines.

STEVENSON et CLAYTON (1936), SLATENSEK (1947), GOLPEN *et al.* (1956), ASHTON et JONES (1959) ont étudié l'influence du séchage sur la teneur en coumarines du mélilot. Leurs résultats sont contradictoires. En 1973, HASKINS et GORZ étudient différentes températures de séchage en étuves ventilées (25°C, 30°C, 40°C, 60°C, 100°C) et montrent que pour ces températures, la perte en coumarine libre est la plus importante à 25°C et que la plus forte teneur en coumarine libre est obtenue à 60°C. Comme pour ces auteurs, ces résultats nous paraissent étonnants. En effet, 60°C ne correspond pas à une température optimale d'activité enzymatique. C'est pourquoi, nous avons mis en place une expérimentation visant à valider ces résultats. De plus, il existe d'autres méthodes de stabilisation du matériel végétal comme la lyophilisation et le séchage aux micro-ondes non encore testées et qui méritent d'être étudiées bien que leur application industrielle n'apparaisse pas a priori rentable dans ce cas.

Une étude préalable a été menée visant à définir la cinétique de séchage d'échantillons de mélilot. Elle nous a permis de déterminer l'humidité contenue dans le matériel végétal après un temps donné de séchage.

#### 3.1.1.2.1 Matériel et méthodes

\* Matériel végétal commun aux trois essais : mélilots de génotypes 112-4 multipliés *in vitro* et cultivés en serre durant deux mois. Les échantillons sont constitués des parties aériennes des plantes fraîches coupées en morceaux de 1 à 2 cm et bien homogénéisées.

#### \* Cinétique de séchage (Essai 1)

Des échantillons de matériel frais de 5 g sont déposés à 5 températures différentes : 25°C, 30°C, 40°C, 60°C et 80°C, dans une étuve ventilée, et trois d'entre eux, notés A, B, C, sont sortis régulièrement de l'étuve et pesés à des intervalles de temps réguliers :

- pour les températures de 80°C et 60°C toutes les 10 mn,
- pour les températures de 40°C, 30°C et 25°C, les intervalles augmentent avec le niveau de séchage :
  - toutes les 30 mn jusqu'à 8 heures de séchage,
  - toutes les heures jusqu'à 15 heures de séchage,
  - toutes les 8 heures jusqu'à 71 heures de séchage,
  - toutes les 12 heures jusqu'à 143 heures de séchage pour 40°C, 167 heures pour 30°C.

A 25°C, deux pesées supplémentaires ont été effectuées à 167 et 191 heures de séchage.

Pour le séchage aux micro-ondes (marque VEDETTE, fréquence : 2450 MHz), trois échantillons de 10 g ont été placés dans ce four à des intervalles de temps variant de 30 secondes à 12 minutes.

L'humidité résiduelle des échantillons est mesurée en les plaçant 24 heures à 105°C.

#### \* Influence du séchage sur la teneur en coumarines (Essai 2)

Les résultats de l'étude de la cinétique de séchage ont permis de déterminer le temps nécessaire pour obtenir une humidité définie pour chaque température de séchage.

L'humidité initiale contenue dans le matériel végétal est désignée comme étant 100% et HR comme l'humidité résiduelle contenue dans le matériel sec. Ainsi, 50% et 15% d'humidité correspondent respectivement à la moitié et à 85% de l'humidité éliminée par séchage du matériel frais. La modalité "excès de séchage" correspond à des échantillons séchés deux fois le temps nécessaire à l'obtention de l'humidité résiduelle contenue dans le matériel sec.

Des échantillons de 5 g de mélilot frais sont placés à 5 températures différentes : 25°C, 30°C, 40°C, 60°C et 80°C. Des échantillons de 10 g sont placés aux micro-ondes. Les contraintes expérimentales nous ont amenés à utiliser du matériel frais (F.M.) issu de quatre récoltes différentes effectuées à quelques jours d'intervalle. Pour les températures 25°C, 30°C et 60°C, le matériel végétal utilisé est F.M.1 ; pour 40°C et 80°C, F.M.2 ; pour le micro-onde, F.M.3. Pour le matériel frais séché dans le séchoir ventilé, 3 échantillons sont sortis aux temps définis dans l'essai "cinétique de séchage" pour obtenir 50%, 15% d'humidité et l'humidité résiduelle. Trois échantillons sont placés dans le micro-onde pour chaque temps de séchage.

Dans le cas de la lyophilisation, des échantillons de 5 g de F.M.4 sont immergés dans de l'azote liquide 2 à 3 minutes, puis placés dans un lyophilisateur (FTS System Incorporation, New York) durant 66 heures.

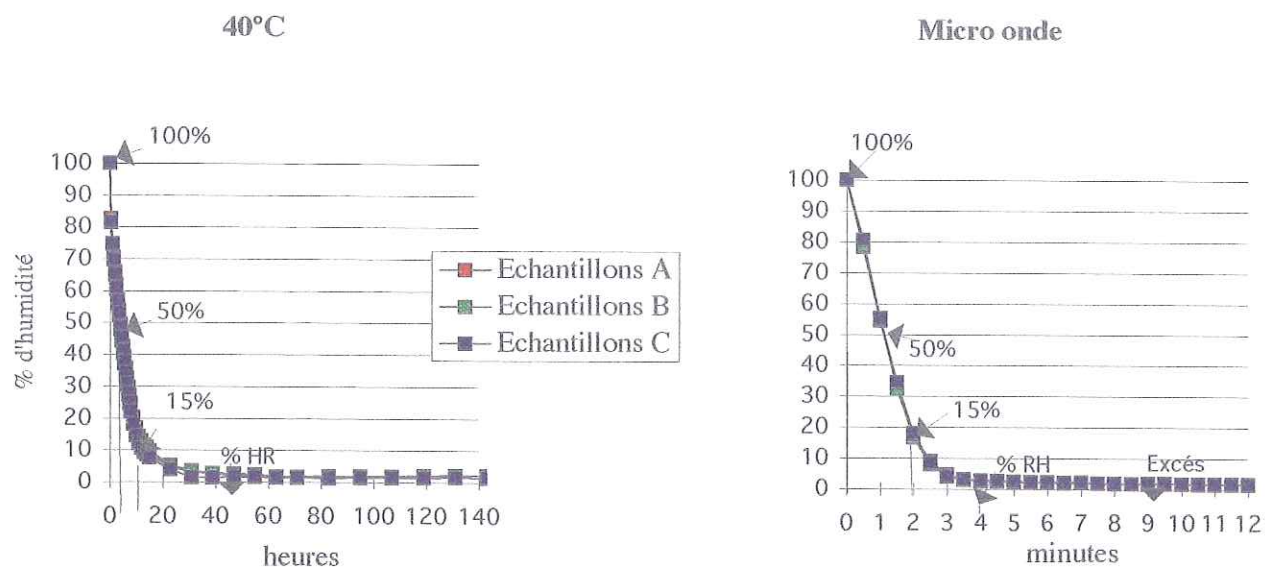


Figure 26 : Deux exemples de cinétique de séchage

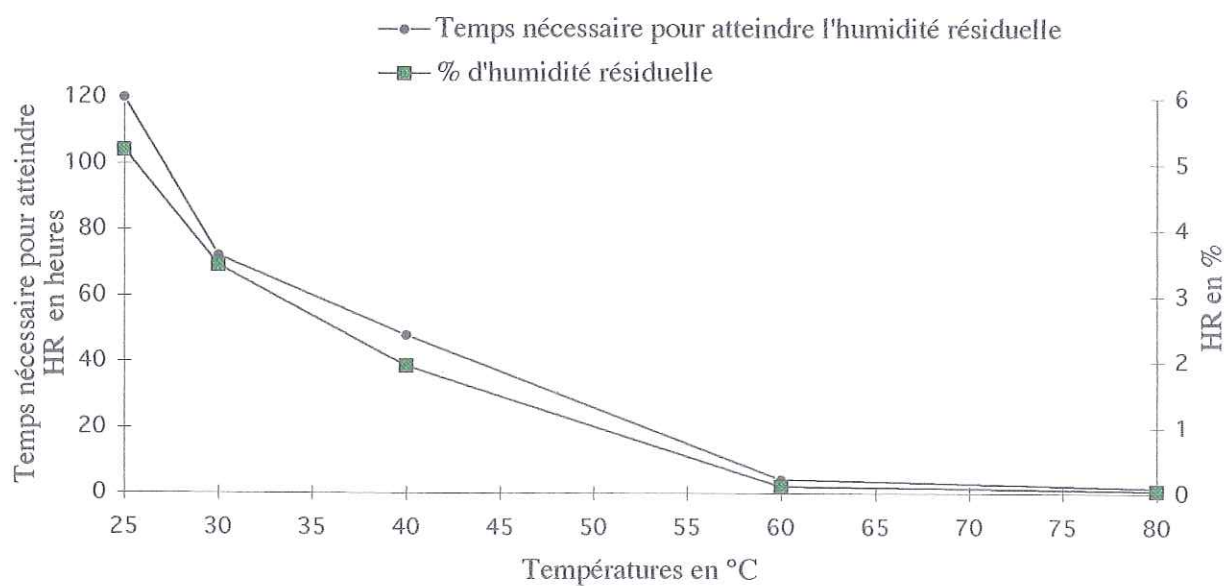


Figure 27 : Relation entre le pourcentage d'humidité résiduelle (HR) et le temps nécessaire pour l'atteindre

Lorsque les échantillons ne sont pas à l'humidité résiduelle, ils sont broyés avec du sable dans un mortier. Les échantillons secs sont broyés dans un broyeur à billes. Les particules obtenues mesurent de 0,003 à 0,1 mm.

Ces échantillons sont extraits avec 25 ml d'eau chaude, agités à température ambiante 30 mn puis centrifugés 2 fois à 12 000 tours  $\text{mn}^{-1}$  à 5°C. La teneur en coumarines est exprimée en coumarine libre sur matériel végétal ramené à 0% d'humidité.

\* Température optimale de la  $\beta$  glucosidase du mélilot (Essai 3)

10 g de matériel végétal frais sont récoltés, 5 g sont séchés aux micro-ondes, pesés, broyés et extraits avec 25 ml d'eau puis dilués 2 fois (extrait 1). Les 5 grammes restants sont broyés dans un mortier en présence de 25 ml d'eau à température ambiante et dilués 100 fois (extrait 2).

Les 2 extraits sont centrifugés 2 fois : 15 mn à 12 000 tours  $\text{mn}^{-1}$  puis dosés. Le mélange (50 - 50) des 2 extraits est placé pendant 1 heure aux températures 25°C, 37°C, 50°C, 60°C, 70°C et 80°C puis dosé.

### **3.1.1.2.2 Résultats et discussion**

#### ***3.1.1.2.2.1 Cinétique de séchage***

La cinétique de séchage a été obtenue pour chaque température avec du matériel frais possédant une humidité moyenne de 81%.

La **Figure 26** présente deux exemples de cinétique de séchage :

- à 40°C ;
- aux micro-ondes.

Ces courbes ont été faites pour chacune des températures (à l'exception de la modalité lyophilisation). Elles ont permis de déterminer le temps nécessaire pour obtenir une humidité donnée par température pour l'essai suivant.

Durant le séchage, la perte en eau n'est pas linéaire avec le temps. En séchoir ventilé, il y a deux étapes successives :

- une perte linéaire de l'eau superficielle,
- une perte progressive de l'eau contenue dans les tissus une fois amenée à la surface.

La **Figure 27** met en évidence la relation existant, pour chaque température, entre l'humidité résiduelle et le temps nécessaire pour l'atteindre. A 25°C, le temps de séchage et l'humidité résiduelle sont élevés, 120 heures et 5,2% alors qu'il faut 72 heures à 30°C pour obtenir une humidité résiduelle de 3,5%. A 80°C, il faut seulement 90 mn pour atteindre une humidité résiduelle de 0,03%.

| Températures<br>Humidité | 25°C      | 30°C       | 40°C       | 60°C       | 80°C       | Micro<br>ondes |
|--------------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|----------------|
| 50%                      | 19 h 8 mn | 7 h 48 mn  | 3 h 49 mn  | 30 mn 30 s | 14 mn 10 s | 1 mn 7 s       |
| 15%                      | 45 h      | 22 h 36 mn | 10 h 15 mn | 1 h 27 mn  | 35 mn      | 2 mn 8s        |
| HR                       | 120 h     | 72 h       | 48 h       | 4 h        | 1 h 30 mn  | 3 mn 30 s      |
| Excès de<br>séchage      | 240 h     | 144 h      | 96 h       | 8 h        | 3 h        | 7 mn           |

Tableau 4 : Temps de séchage nécessaires pour atteindre une humidité résiduelle donnée ou utilisés pour la modalité "excès de séchage"

Les temps de séchage nécessaires pour arriver à une humidité résiduelle donnée sont présentés dans le **Tableau 4**.

### **3.1.1.2.2.2 Influence du séchage sur la teneur en coumarines**

#### **\* Le matériel végétal frais de départ**

Quatre types de matériel frais ont été utilisés. Il n'y a pas de différence significative entre les taux d'humidité de F.M.1, F.M.2 et F.M.3 ni entre les teneurs en coumarines qui sont de l'ordre de 1,7%. La teneur en coumarines la plus faible est contenue dans le matériel végétal utilisé pour la lyophilisation (F.M.4). Ce résultat peut s'expliquer par la chronologie de cette expérimentation. En effet, la modalité "lyophilisation" a été testée en dernier sur des plantes légèrement plus âgées (1 mois).

La teneur en coumarine libre contenue dans ces échantillons correspond à environ 64% des coumarines. Ce résultat est inférieur à celui trouvé par HASKINS et GORZ (1973) (89%). Cette différence s'explique parce que nos plantes sont cultivées en serre alors que les leurs étaient cultivées en plein champs. Les vitres des serres arrêtent une partie des U.V. d'où une proportion plus importante de GOHCA sous forme *cis* dans le cas de plantes cultivées en plein champ.

#### **\* Comparaison entre le matériel frais et le matériel sec**

L'utilisation d'un séchoir ventilé entraîne des pertes en coumarines contrairement aux autres techniques de séchage comme la lyophilisation ou les micro-ondes. En fait, le pourcentage de GOHCA *trans* reste stable quelques soient les modalités, seules les teneurs en coumarine libre et en GOHCA *cis* sont modifiées.

***Ainsi les pertes en coumarines seront exprimées en perte de GOHCA cis et de coumarine libre.*** Pour une durée "normale" de séchage (jusqu'à l'humidité résiduelle), la perte la plus importante correspond à 25°C (61%) suivie de 80°C (43%), 60°C (41%) et 40°C (34%). HASKINS et GORZ (1973) trouvent également 62% de perte en coumarines après un séchage de 64 heures à 25°C. Il semble qu'une réaction particulière ait eu lieu. Il est possible d'émettre l'hypothèse qu'à cette température le matériel végétal reste un long moment à une humidité importante, d'où la formation de dicoumarol (SANDERSON, 1986).

Il n'y pas de perte en coumarines à 30°C, ce qui est difficile à expliquer. Par ailleurs, bien qu'il n'y ait que 5°C de différence avec 25°C, le temps de séchage ainsi que l'humidité résiduelle à 30°C sont divisés par 2.

Une perte importante en coumarine libre est notée à 80°C (51% dans le cas d'un excès de séchage). Ce résultat peut s'expliquer par la volatilisation de la coumarine libre. En effet, cette molécule possède un point de volatilisation de l'ordre de 70°C (HASKINS et KOSUGE,

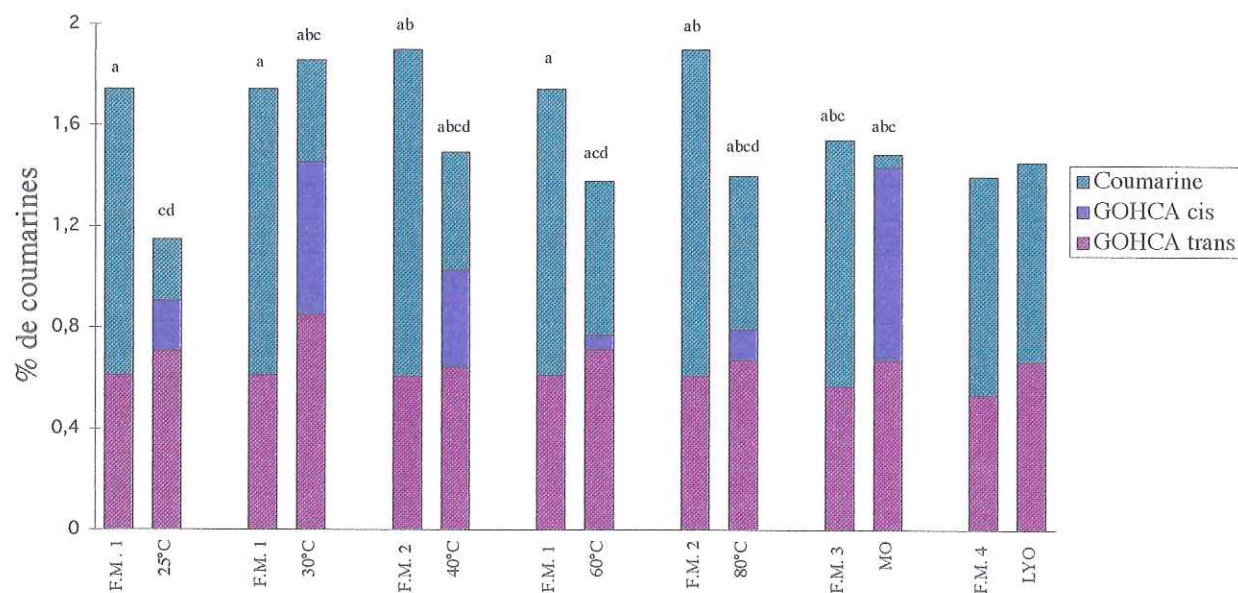


Figure 28 : Teneur en coumarines du mélilot sec après séchage en séchoir ventilé, par lyophilisation (LYO), ou par séchage au micro-onde (M.O.) en comparaison avec le matériel frais (F.M.)

1965). HASKINS et GORZ (1973) n'ont pas travaillé à cette température mais ils trouvent une perte de 41% après 4 heures de séchage à 60°C. Exactement le même pourcentage de perte est obtenu dans cet essai après le même temps de séchage, à 60°C.

Ne connaissant pas la température de volatilisation du GOHCA *cis*, il est difficile de déterminer si les pertes sont liées :

- à une volatilisation directe du GOHCA *cis*,
- ou
- à une volatilisation de la coumarine libre issue de la réaction d'hydrolyse du GOHCA *cis*.

La première hypothèse nous paraît peu probable en raison de la stabilité de la teneur en GOHCA *trans* pour toutes les modalités.

Un excès de séchage obtenu en utilisant un séchoir ventilé provoque une perte en coumarines de 66% à 25°C et de 27% à 40°C. Dans le cas du micro-onde, un excès de séchage n'induit pas de perte, vraisemblablement du fait de l'absence d'eau dans le matériel à l'humidité résiduelle.

La lyophilisation permet une conservation totale de la teneur en coumarines initiale et une bonne activité biologique du matériel végétal.

#### \* La composition en coumarines (Figure 28)

Le pourcentage de GOHCA *trans* est pratiquement constant durant tous les stades de séchage et pour toutes les techniques testées contrairement aux teneurs en GOHCA *cis* et en coumarine libre. Ces résultats viennent confirmer ceux obtenus par HASKINS et GORZ (1973). En séchoir ventilé, le pourcentage de coumarine libre semble diminuer au cours du séchage alors que le GOHCA *cis* augmente proportionnellement. Cependant, après séchage aux micro-ondes, le matériel végétal contient très peu de coumarine libre. En effet, les micro-ondes, par leur action sur les protéines, dénaturent la  $\beta$  glucosidase avec comme conséquence l'absence d'hydrolyse du GOHCA *cis*. La teneur de 0,05% de coumarine libre observée dans ce matériel est :

- soit un artefact lié au contact de l'enzyme et de son substrat entre le moment de la préparation du matériel frais et de la dénaturation de la  $\beta$  glucosidase par les micro-ondes (5 à 10 mn),
- soit le pourcentage de coumarine libre existant initialement dans le mélilot.

*La proportion en coumarine libre dans les parties aériennes de la plante fraîche serait au plus de 3% des coumarines.*

HASKINS et GORZ (1961) ont également montré en dénaturant la  $\beta$  glucosidase par immersion dans de l'eau bouillante que la présence de coumarine libre dans les extraits de

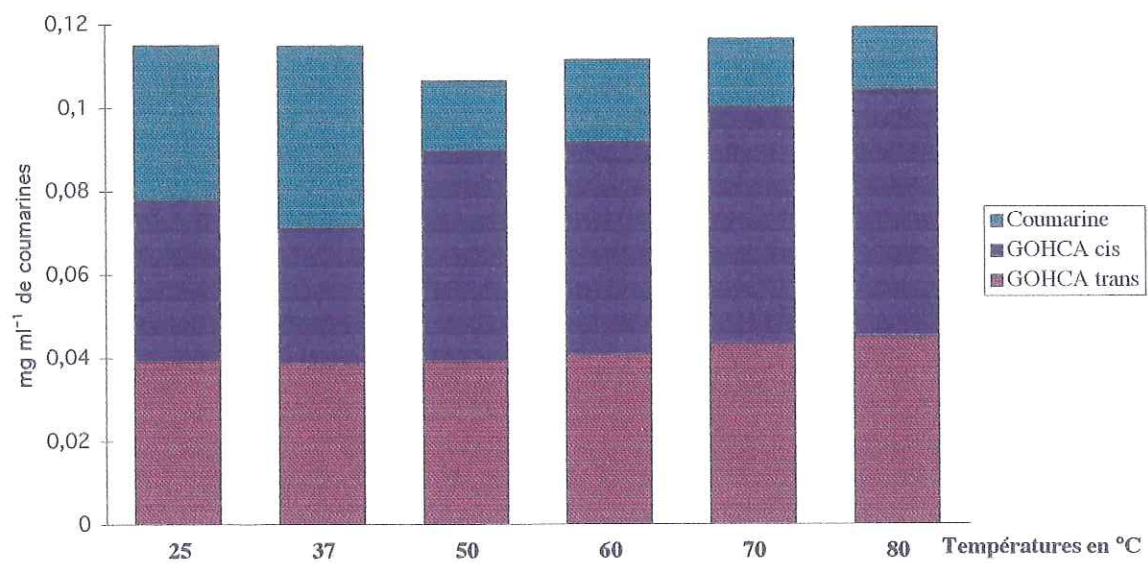


Figure 29 : Évolution de la concentration en GOHCA *cis* , *trans* et en coumarine libre (exprimée en coumarine libre) dans l'extrait à différentes températures

mélilot était un artefact et que la coumarine libre se trouvait sous forme de  $\beta$  GOHCA *trans* et *cis* dans le matériel frais.

La présence de coumarine libre dans le mélilot frais ou incomplètement sec provient de la mise en contact de la  $\beta$  glucosidase intercellulaire et de son substrat vacuolaire :

- soit pendant le temps de séchage,
- soit durant le broyage dans le mortier (plus le matériel végétal est humide, plus la réaction est rapide).

En ce qui concerne la lyophilisation, la phase de congélation peut endommager la structure cellulaire du matériel mais les protéines ne sont pas dénaturées. L'hydrolyse du GOHCA *cis* peut avoir lieu soit au moment de la congélation lorsque les cellules éclatent, soit lors de la phase de décongélation.

La comparaison des teneurs en GOHCA *cis* et en coumarine libre à différentes températures de séchage met en évidence que la réaction d'hydrolyse du GOHCA *cis* est la plus importante à 60°C (92% du substrat est hydrolysé). Ce résultat est surprenant si l'on se réfère à l'optimum thermique de l'émulsine ou d'autres  $\beta$  glucosidases du commerce (37°C).

Afin de vérifier l'optimum thermique de la  $\beta$  glucosidase du mélilot, nous avons mis en place un essai complémentaire à partir du matériel végétal qui a permis d'obtenir les résultats sur le séchage. Dans la mesure où nous ne disposions pas de GOHCA *cis* purifié, un extrait obtenu à partir du matériel végétal séché aux micro-ondes (7 mn) constituait le "substrat" (Extrait 1). Un autre extrait obtenu à partir de matériel frais traité à l'eau froide correspondait à "l'enzyme" (Extrait 2). Des études préliminaires ont permis de définir la dilution de l'enzyme et le temps de mise en contact entre l'enzyme et son substrat. L'extrait 2 a aussi été dilué 100 fois, du fait de l'extrême rapidité de la réaction à concentration normale. L'extrait 1 contient une forte proportion de GOHCA *cis* contrairement à l'extrait 2 qui n'en contient plus : l'hydrolyse s'est produite au cours de l'extraction, aqueuse à froid (**Figure 29**). Ces résultats viennent bien confirmer que :

*37°C est la température optimale d'activité de la  $\beta$  glucosidase du mélilot.*

Les résultats de teneurs en coumarines en fonction des températures de séchage viennent confirmer ceux obtenus par HASKINS et GORZ (1973). Ces auteurs concluent que la température de 60°C permet d'atteindre un degré de rupture des tissus qui assure le meilleur contact enzyme / substrat. Cette hypothèse resterait à vérifier en analysant, après extraction au méthanol sous reflux (pour bloquer l'activité  $\beta$  glucosidasique), du matériel végétal après 30 secondes, 1 minute, 2 minutes,... de séchage à 60°C.

Les premiers résultats obtenus à l'échelle industrielle ne sont pas présentés ici. En effet, certains problèmes techniques ont été rencontrés. Cependant, nous avons remarqué qu'environ 90% du

GOHCA *cis* a été hydrolysé en coumarine libre dans le matériel végétal récolté à l'ensileuse séché 5 heures à 80°C et 13 heures à 60°C. Il existe donc un "décalage" important entre le temps de séchage de 5 g et celui d'une tonne de matière fraîche, à température identique. Ce phénomène, prévisible, peut s'expliquer en partie par le temps nécessaire à une masse importante de matériel pour atteindre la température de l'air. En réalité, la température affichée dans le séchoir s'avère toujours supérieure à celle atteinte dans le matériel végétal lui même. Ainsi, des conditions de séchage de 80°C durant 5 heures puis de 60°C durant 13 heures permettent d'obtenir à une échelle industrielle :

- une bonne teneur en coumarines,
- une hydrolyse maximale du GOHCA *cis* en coumarine libre,
- un temps d'occupation du séchoir réduit (par rapport à 40°C, température classiquement utilisée).

La teneur en coumarines dans le matériel frais séché industriellement n'a pu être dosée. Il a donc été impossible de déterminer la perte en coumarines, occasionnée par cette technique.

Des études préliminaires ont permis de montrer que l'épaisseur de la couche de matériel végétal frais, déposée dans le séchoir, jouait un rôle important d'une part sur le bon déroulement du séchage (si elle est trop importante, il y a un risque de formation de poches de fermentation) et d'autre part, sur la qualité du matériel sec obtenu.

Une étude plus fine sera menée en 1996.

### 3.1.1.2.3 Conclusion

Cette étude vient confirmer l'influence du séchage sur la teneur en coumarine(s) du mélilot.

*La lyophilisation est une technique de stabilisation du mélilot frais qui n'occasionne aucune perte en coumarines.*

Cependant, cette technique coûteuse est rarement disponible chez les producteurs. Le séchage se fait généralement en séchoir ventilé.

*Dans ce cas, la température optimale de séchage est 60°C.*

Il convient de noter, dans le cas du séchage d'une quantité importante de mélilot, qu'il faut tenir compte de "l'inertie" du matériel végétal et donc sécher, dans une première phase, à une température plus élevée que la température optimale déterminée sur une petite quantité de matériel.

La modalité de séchage à l'échelle industrielle (80°C durant 5 heures puis 60°C durant 13 heures) reste donc à valider en 1996.

### 3.1.1.3 ISOMÉRIISATION DU GOHCA TRANS EN GOHCA CIS

*Objectif : Isomériser le GOHCA trans en GOHCA cis en vue d'obtenir après hydrolyse un rendement optimal en coumarine libre*

Le GOHCA *trans* existe dans une proportion plus ou moins importante (de l'ordre de 15%) dans tous les échantillons de parties aériennes analysés. L'activité pharmacologique de ce précurseur n'étant pas connue, le critère de qualité du mélilot reste sa teneur en coumarine libre. La maîtrise de la réaction d'isomérisation du GOHCA *trans* en *cis* puis de l'hydrolyse du dérivé *cis* permettrait théoriquement d'augmenter la quantité de substrat pour la  $\beta$  glucosidase donc la quantité de coumarine libre produite.

On peut envisager que cette réaction d'isomérisation prenne place à différentes étapes de la chaîne de production :

- lors de la culture de la plante,
- durant le séchage,
- durant l'extraction.

#### 3.1.1.3.1 Matériel et méthodes

##### \* Dans la plante

2 plantes (A et B) de génotype 70-5 (le premier chiffre correspond au numéro de l'origine, le second au numéro de la plante étudiée au sein de l'origine) issues de bouturage sont cultivées 1 mois en serre. La plante A est maintenue en serre alors que la plante B est placée 6 heures par jour au soleil et ce pendant 3 jours.

Les parties aériennes des plantes sont alors récoltées, séchées (en séchoir ventilé, 5 heures à 60°C) et dosées après extraction à l'eau chaude.

##### \* Durant le séchage

Environ 320 g de matière fraîche sont récoltés sur des mélilots de génotype 112-4 issus de culture *in vitro*, cultivés 2 mois en serre.

Trois fois 40 g sont placés dans une étuve ventilée pendant 5 heures à 60°C.

- modalité T témoin : l'étuve n'est pas éclairée
- modalité LN : l'étuve contient une lampe U.V. émettant autour de 365 nm

Les échantillons sont broyés, extraits et dosés.

##### \* Durant l'extraction

- Isomérisation d'une solution témoin de GOHCA *trans* (Essai 1)

5 ml d'une solution de GOHCA *trans* à 0,4 mg ml<sup>-1</sup> dans du méthanol est préparée ;

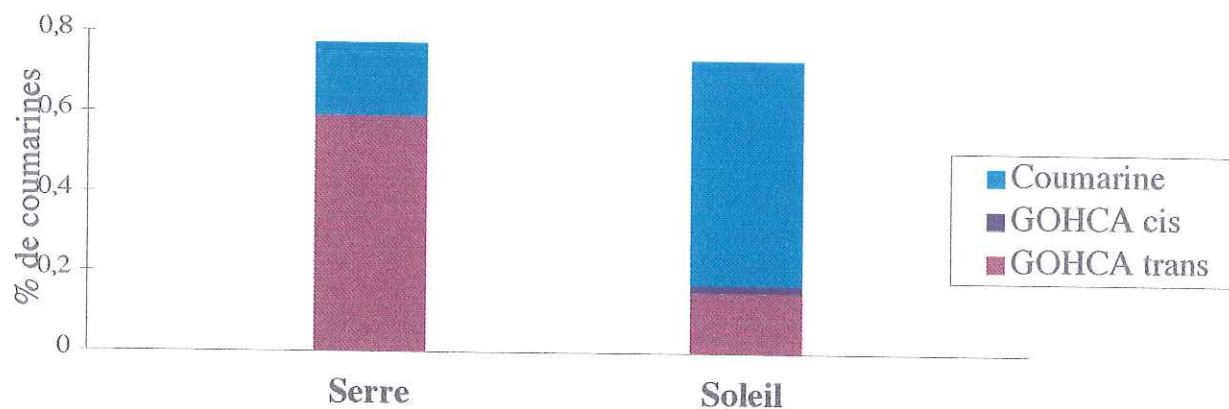


Figure 30 : Teneur en coumarines des plantes (70-5) cultivées en serre ou exposées au soleil (6 heures par jour pendant 3 jours)

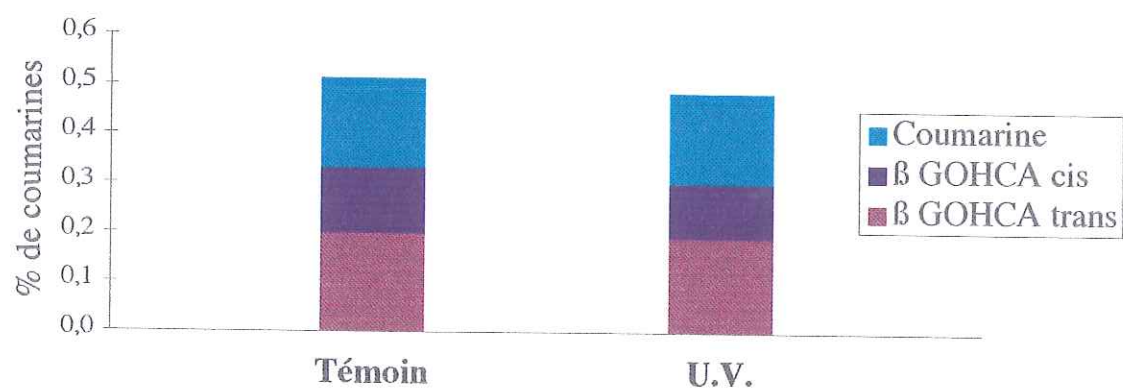


Figure 31 : Teneur en coumarines de mélilot séché à l'obscurité et sous U.V.

2,5 ml de cette solution sont placés sous U.V. et dosés après 3 et 4 heures.

#### - Isomérisation du GOHCA *trans* contenu dans l'extrait (Essai 2)

La matière sèche issue du génotype 112-4 est séchée à 60°C pendant 5 heures.

L'extraction a lieu à 37°C dans une enceinte climatique équipée d'une lampe U.V. et d'une table d'agitation.

- modalité T témoin : 3 fois 0,5 g + 10 ml d'eau froide sont placés dans des boîtes de Pétri fermées, protégées des U.V.
- modalité LN : 3 fois 0,5 g + 10 ml d'eau froide sont placés sous U.V. autour de 360 nm dans des boîtes de Pétri ouvertes.

Après 24, 48 et 72 heures, le volume est réajusté respectivement à 10, 9 et 8 ml et 1 ml est prélevé, centrifugé et dosé.

### 3.1.1.3.2 Résultats et discussion

#### 3.1.1.3.2.1 Dans la plante

Les résultats sont présentés **Figure 30**. La diminution de forme *trans* dans les plantes exposées au soleil est proportionnelle à l'apparition de forme *cis*.

*Le passage à la lumière solaire de mélilots cultivés en serre permet l'isomérisation d'une grande partie du GOHCA trans en cis.*

Confirmant les travaux de AKESON *et al.* (1963), qui notent que les mélilots cultivés au champ contiennent toujours un minimum de 11% de GOHCA *trans*, on constate qu'il reste de l'ordre de 20% de GOHCA *trans* dans les parties aériennes des plantes exposées 6 heures par jour pendant 3 jours au soleil. Ces auteurs concluent que le GOHCA *trans* existe toujours dans le mélilot et que le pourcentage obtenu en plein champ est le résultat d'une situation d'équilibre. Quant au GOHCA *cis*, il a été hydrolysé par la  $\beta$  glucosidase en coumarine libre durant le séchage et l'extraction.

#### 3.1.1.3.2.2 Durant le séchage

### Figure 31

Aucune isomérisation du GOHCA *trans* en GOHCA *cis* n'est obtenue lorsque l'on fait sécher le matériel végétal cultivé en serre (donc à forte teneur en GOHCA *trans*) sous U.V. Cependant, HASKINS *et al.* (1964) suggèrent que cette réaction étant photochimique, ils arrivent à l'induire dans des folioles de mélilot détachées placées sous U.V.

Ces résultats contradictoires sont difficiles à expliquer.

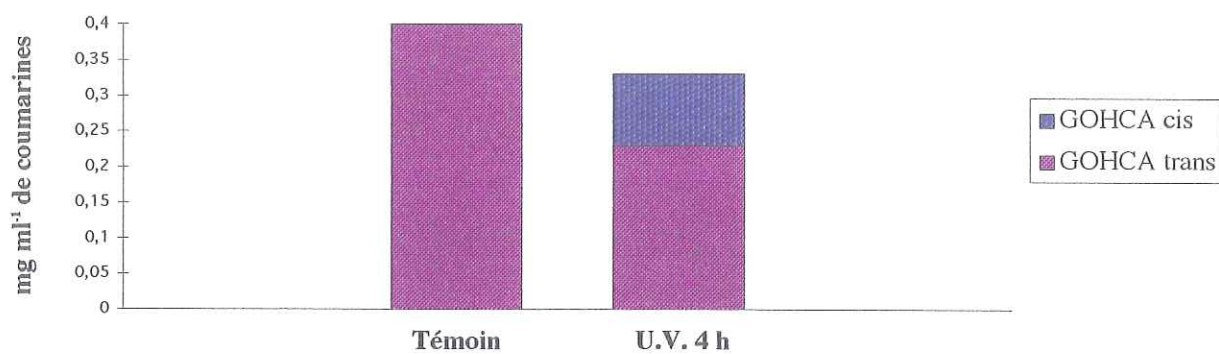


Figure 32 : Influence d'un traitement U.V. (4 heures) sur une solution de GOHCA *trans* à 0,4 mg ml<sup>-1</sup>

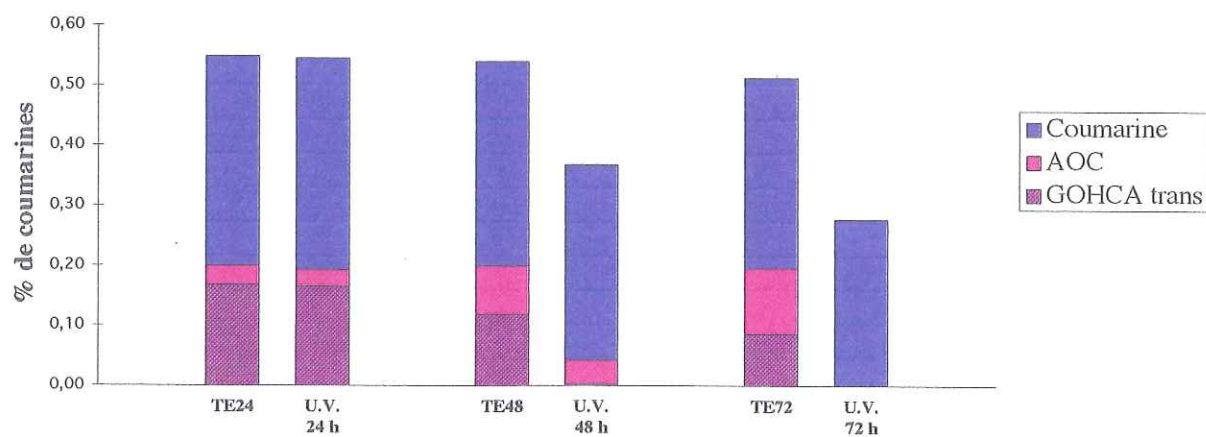


Figure 33 : Influence d'un traitement U.V. prolongé durant l'extraction des coumarines du mélilot

Une hypothèse peut toutefois être émise : les longueurs d'ondes situées autour de 360 nm ne sont pas le facteur déterminant cette réaction.

### 3.1.1.3.2.3 *Durant l'extraction*

#### - Isomérisation d'une solution témoin de GOHCA *trans* (Essai 1)

##### **Figure 32**

La solution témoin de GOHCA *trans* est en partie isomérisée sous U.V. Après 4 heures d'irradiation, 25% du GOHCA *trans* sont isomérisés sous forme de GOHCA *cis*. Cependant, nous pouvons remarquer des pertes : la teneur en coumarines de l'extrait diminue. Ces résultats confirment ceux obtenus par SCHON (1966) qui en essayant de produire du GOHCA *cis* par l'action des U.V. à 312 nm sur une solution de GOHCA *trans* provoque des pertes en coumarines. D'autres essais nous ont donné des résultats similaires.

#### - Isomérisation du GOHCA *trans* contenu dans l'extrait (Essai 2)

##### **Figure 33**

Après 24 heures d'irradiation U.V., ni la teneur en coumarines, ni la composition de l'extrait ne sont modifiées. Si cette irradiation se prolonge (48 heures), la teneur en coumarines est inférieure dans les échantillons irradiés par rapport au témoin correspondant. Il n'y a plus de GOHCA *trans* dans ces échantillons alors que la quantité de coumarine libre est stable. Après 72 heures d'irradiation, le GOHCA *trans* a disparu des échantillons et la quantité de coumarine libre a légèrement augmenté.

Les U.V. sont réputés pour leur effet "destructeur" des liaisons moléculaires. Ici, ils interviennent sur le GOHCA *trans* mais ne semblent pas provoquer la réaction d'isomérisation attendue. En effet, ni le pourcentage de GOHCA *cis*, ni celui de coumarine libre n'augmentent.

### 3.1.1.3.3 **Conclusion**

Nous ne sommes pas arrivés à maîtriser parfaitement la réaction d'isomérisation qui permettrait, en théorie, d'augmenter la teneur en coumarine libre du végétal ou de l'extrait, d'environ 15% (proportion moyenne de GOHCA *trans* contenue dans les parties aériennes de mélilots cultivés en plein champ).

Ce phénomène est difficile à expliquer. Deux hypothèses peuvent être posées :

- cette réaction atteindrait un état d'équilibre à 15% de GOHCA *trans* ;
- la longueur d'onde utilisée (autour de 360 nm) ne correspond pas à celle induisant cette réaction. Dans la mesure où la lumière solaire permet l'isomérisation, il serait envisageable de décomposer le spectre de cette lumière en plusieurs bandes et de les tester pour connaître la longueur d'onde optimale d'irradiation.

### 3.1.2 CHOIX DU MATÉRIEL VÉGÉTAL

*Objectifs :*

- caractériser par des critères agronomiques et de teneur en coumarines le matériel végétal utilisé dans le cadre de cette étude
- sélectionner des génotypes à forte teneur et rendement élevé en coumarines

Dès 1936, STEVENSON et CLAYTON notent une forte variabilité génétique entre et au sein des populations de mélilots concernant le caractère "teneur en coumarines". Plus tard, de nombreux auteurs : SMITH (1948), WEBSTER (1955), GOLPEN *et al.* (1957), AKESON *et al.* (1963) ; HASKINS et KOSUGE (1965), GORZ *et al.* (1992) font la même constatation et sélectionnent des origines à faible teneur en coumarines en vue de créer des variétés fourragères. C'est pourquoi, l'une des premières étapes de ce programme de recherche a été de collecter un nombre important de graines de mélilot d'origines différentes afin de pouvoir disposer d'une base génétique large. Grâce aux relations que nous avons pu avoir dans le monde entier avec des conservatoires botaniques, des organismes de production ou de conservation de graines et diverses universités, nous avons collecté environ 160 origines de mélilot de 10 espèces différentes. En raison de la quantité restreinte de certains échantillons (parfois quelques dizaines de graines par origine) ainsi que le caractère allogamique du genre *Melilotus*, cette collection n'a pu être entièrement maintenue. En effet, la conservation en panmixie\* de populations de mélilots (généralement bisannuelles) ne peut se faire qu'en isolement. De plus, l'entomophilie de ce genre nécessite la présence d'insectes pollinisateurs pour avoir une fécondation donc une production de graines.

C'est la raison pour laquelle certaines origines particulièrement intéressantes ont été maintenues par culture sur des sites exempts de mélilot afin d'éviter une éventuelle interfécondation.

Une première étude de la *variabilité interorigine* au sein de cette collection nous a permis de déterminer (par dosages semi-quantitatifs : chromatographie en couche mince) des origines à forte teneur en coumarines possédant de bonnes qualités agronomiques (croissance, sensibilité aux pathogènes ...).

Nous avons également étudié la *variabilité intra-origine* (au sein de quelques-unes de ces populations) dans le but de propager par le biais de la multiplication végétative le matériel végétal ainsi sélectionné et de pouvoir travailler avec des plantes génétiquement stables.

Nous ne présenterons ici que quelques-uns des résultats de ces travaux.

### 3.1.2.1 MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### \* Les origines

Les origines ont été numérotées de 1 à 161 suivant leur ordre de réception. Les principales origines retenues présentent les caractéristiques suivantes :

- Origine 25 : *Melilotus officinalis* L. : jardin botanique de BORDEAUX.
- Origine 45 : *Melilotus officinalis* L. : jardin botanique de l'Université de VIENNE en Autriche.
- Origine 70 : *Melilotus officinalis* L. : jardin botanique de NANCY.
- Origine 83 : *Melilotus officinalis* L. : jardin botanique de LA GACILLY.
- Origine 91 : *Melilotus albus* Desr. : Université de LOGAN en UTAH aux USA.
- Origine 112 : *Melilotus officinalis* L. : jardin botanique de HAYYHO-KOJIMAP en Russie.
- Origine 126 : *Melilotus officinalis* L. : Union des Instituts des plantes industrielles à LENINGRAD en Russie.
- Origine 138 : *Melilotus albus* Desr. : jardin botanique de LIUCERNOVIDNYJ en Russie.
- Origine 157 : *Melilotus officinalis* L. variété YUKON, sélectionnée pour sa résistance au froid et sa bonne production fourragère (GOLPEN, 1971). Elle nous a été adressée par le Dr GOLPEN de la station de recherche agronomique de SASKATOON au Canada.

Avant d'être semées, toutes les graines ont été nettoyées et scarifiées manuellement par frottement entre deux feuilles de papier de verre.

#### - Étude de la variabilité interorigine

Le 12/05/93, 2 m<sup>2</sup> des origines 25, 70, 91, 126, 138, 157 ont été semées à 10 kg ha<sup>-1</sup> à Luttenbach (48° 2' N, 7° 2' 15" E) (altitude 400m) dans le vallée de Munster dans un sol sableux. Trois semaines après, elles ont été démariées pour obtenir 30 pl. m<sup>-2</sup>.

Quatre fois 15 plantes de chaque origine ont été récoltées à l'état végétatif le 27/07/93 (séchées 24 heures à 60°C et extraites à l'eau à température ambiante puis dosées). Une semaine après le semis, le pourcentage de germination a été noté.

#### - Étude de la variabilité intra-origine

Quarante graines des origines 45, 70, 83 et 112 ont été semées le 27/12/90 dans un plateau contenant 1/3 de terreau, 1/3 de sable et 1/3 de terre franche et placées en serre chauffée à 25°C. Le 21/01/91, les plantules ont été repiquées en "fertil pots" de 8 cm de diamètre et transférées en serre. Huit plantules vigoureuses de hauteur identique ont été choisies pour l'étude et numérotées. Les parties aériennes ont été récoltées le 09/07/91. Ces échantillons ont été séchés 4 heures à 60°C puis extraits au méthanol à froid.

| <b>Origine</b>                             | <b>25</b>        | <b>70</b>       | <b>91</b>       | <b>126</b>     | <b>138</b>      | <b>157</b>      |
|--------------------------------------------|------------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| <b>Taux de germination (%)</b>             | 76               | 93,3            | 90              | 90             | 74              | 70              |
| <b>Hauteur (cm)</b>                        | 40               | 35              | 30              | 25             | 35              | 35              |
| <b>Teneurs en coumarines (%)</b>           | 1,27<br>± 0,12   | 1,17<br>± 0,2   | 1,26<br>± 0,11  | 1,2<br>± 0,08  | 1,13<br>± 0,06  | 1,33<br>± 0,10  |
| <b>Rendements en coumarines (mg / pl.)</b> | 28,38<br>± 10,45 | 17,91<br>± 8,67 | 16,43<br>± 3,91 | 16,78<br>± 3,7 | 18,15<br>± 4,67 | 22,74<br>± 4,35 |

Tableau 5 : Résultats de l'étude de la variabilité inter origine

100 graines des origines 45, 112 et 157 ont été semées le 7/12/93 en terrines placées en serre ; les plantules obtenues ont été repiquées 1 mois après en "fertil pots" de 8 cm de diamètre. Le 7/3/94, 50 plantes de ces 3 origines ont été numérotées et les parties aériennes récoltées en laissant au minimum un bourgeon à la base de chaque plante. Les échantillons ont été séchés 4 heures à 60°C, extraits à température ambiante à l'eau et dosés.

Des graines issues de l'autofécondation de plantes de génotypes 112-4 ont été semées le 18/08/93 à Luttenbach sur une parcelle de 24 m<sup>2</sup> ; les plantules ont été démariées à 50 pl. m<sup>-2</sup> début mars 94. Le 25/05/94, 100 plantes ont été récoltées :

- 50 entièrement puis disséquées en racines, tiges et feuilles,
- 50 uniquement pour les parties aériennes qui n'ont pas été disséquées.

Les échantillons ont été séchés 4 heures à 60°C, extraits à l'eau et dosés.

### 3.1.2.2 *RÉSULTATS ET DISCUSSION*

En raison du manque d'informations à notre disposition, ces "origines" sont donc données à titre indicatif, dans la mesure où elles ne correspondent pas forcément à l'origine réelle (présence à l'état spontané) d'une population donnée.

Dans un premier temps, notre choix a été de récolter *les parties aériennes* des plantes mises en culture. Cependant, pour étudier la variabilité génétique d'un caractère au sein d'une population, il est préférable de travailler organe par organe. Le pourcentage de coumarines dans les parties aériennes peut être exprimé sous la forme suivante :

$$\frac{(\text{poids feuilles} * \% \text{ de coum feuilles} + \text{poids tiges} * \% \text{ coum tiges})}{(\text{poids des tiges} + \text{poids des feuilles})}$$

#### 3.1.2.2.1 - Étude de la variabilité interorigine

L'étude de l'ensemble de la collection (160 origines) n'a pas été réalisée dans de bonnes conditions. Les dosages ont été effectués en chromatographie en couche mince sur un nombre réduit de plantes récoltées à la floraison mais possédant des âges différents. C'est pourquoi nous ne présenterons pas ces résultats. Il faut cependant noter que les critères agronomiques étudiés (croissance, résistance à des agents pathogènes : oïdium, sitones..) et les données semi-quantitatives de teneur en coumarines présentaient de fortes variations selon les origines. Certaines provenances possèdent des teneurs en coumarines inférieures à 0,05% et correspondent vraisemblablement à des variétés à faible teneur en coumarines, issues des programmes de sélection mis en place dans les années 60 en vue de produire des métilots fourragers. D'autres atteignent des teneurs supérieures à 1%. Les 6 meilleures origines sélectionnées ont été comparées.

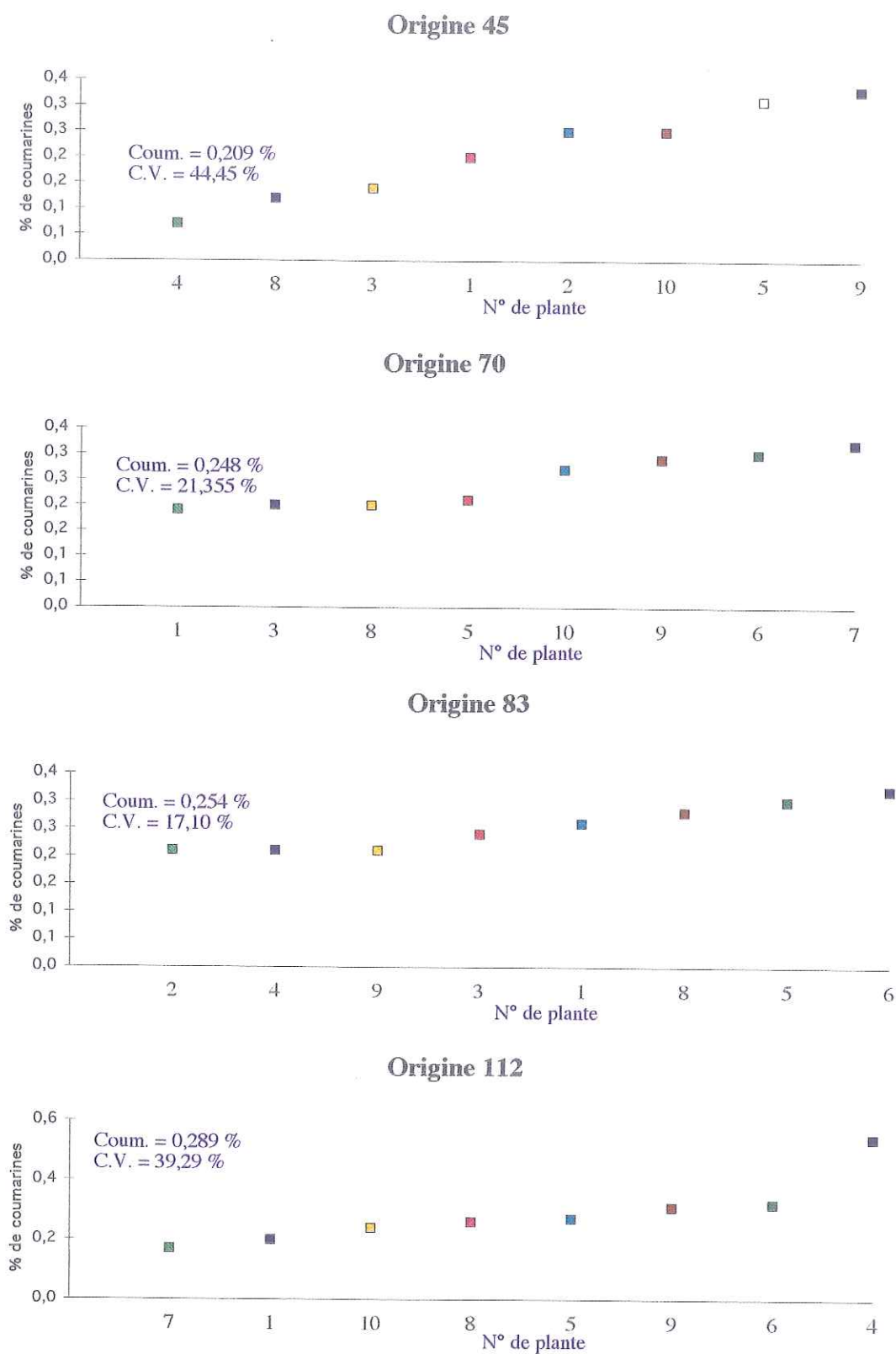


Figure 34 : Teneur en coumarines des feuilles de 8 plantes de 4 origines  
(Coum. : moyenne de la teneur en coumarines des feuilles des 8 plantes  
C.V. : Coefficient de variation)

Les teneurs (exprimées en pourcentage de coumarine libre sur le poids sec) et les rendements en coumarines de ces origines sont présentés **Tableau 5**.

Pour les 6 origines présélectionnées (par comparaison de profils CCM), un certain nombre de critères agronomiques ont été notés. Les teneurs en coumarines ont été déterminées par dosage en HPLC.

Ces résultats montrent que les teneurs en coumarines sont toutes élevées (supérieures à 1% après 2 mois et demi de culture) et mettent en évidence que l'étude de l'ensemble de la collection (bien que peu rigoureuse) a permis de sélectionner des populations intéressantes.

Le choix de 15 plantes par répétition paraît être suffisant. En effet, les coefficients de variations sont de l'ordre de 10% pour les teneurs en coumarines alors qu'ils sont beaucoup plus élevés pour les rendements en matière sèche (30 à 40%). Ce qui tend à montrer une plus forte variabilité de ce dernier caractère.

Il ressort que les origines 25 et 157 possèdent à la fois une bonne teneur et un bon rendement en coumarines.

Les origines choisies pour l'espèce *Melilotus albus* (origines 91 et 138) ne sont pas meilleures que celles sélectionnées pour *Melilotus officinalis*. Il est cependant impossible de conclure sur l'éventuel intérêt de cultiver une espèce autre que *Melilotus officinalis* compte tenu du faible nombre d'origines testées. Dans la bibliographie, il n'est pas mentionné de différences importantes entre ces deux espèces qui s'avèrent très proches d'un point de vue génétique et qui possèdent une biologie similaire.

#### 3.1.2.2.2 - Étude de la variabilité intra-origine

Le choix, la conservation et la multiplication de plantes sont relativement faciles chez le mélilot. En effet, une plante dont on récolte uniquement les parties aériennes et sur laquelle restent quelques bourgeons, reprend son développement. De plus, le mélilot se bouturant facilement, nous avons mis au point une technique de multiplication végétative *in vitro* (Annexe 13) qui permet la micropropagation rapide d'un génotype.

L'étude des feuilles de 8 plantes permet de mettre en évidence la variabilité intra-origine pour le caractère "teneur en coumarines" (**Figure 34**). Celle-ci est importante dans ces 4 populations. Cependant, la distribution des teneurs en fonction des génotypes est pratiquement linéaire au sein d'une population, ce qui paraît étonnant du fait du déterminisme génétique présenté dans la bibliographie. Ainsi, HASKINS et GORZ (1961) déterminent trois génotypes en ce qui concerne la teneur en dérivés coumariniques du mélilot :

- CuCu, plantes à forte teneur,
- Cucu, plantes à teneur moyenne,
- cucu, plantes à teneur faible.

Nos résultats évoquent davantage un déterminisme polygénique ou pluriallélique.

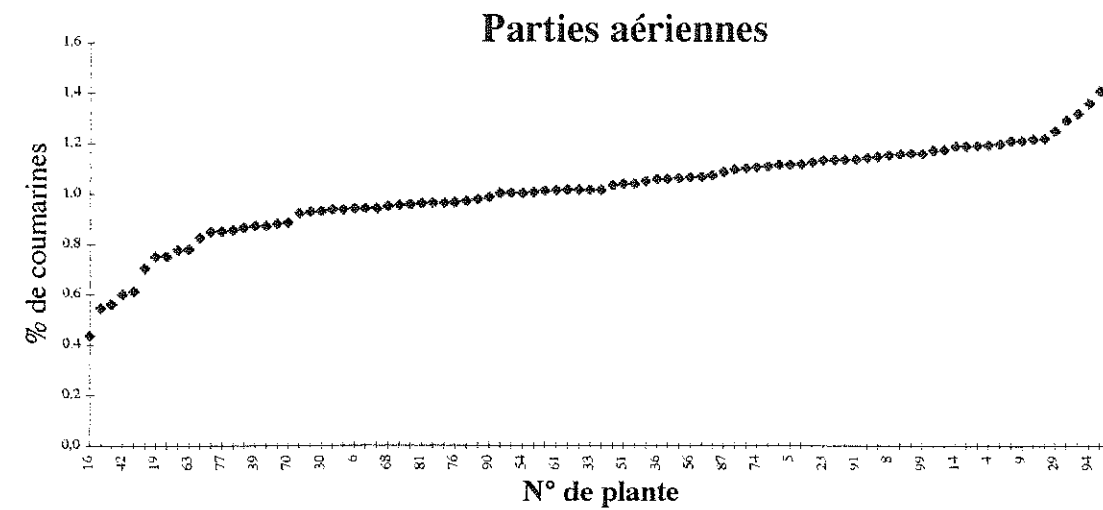
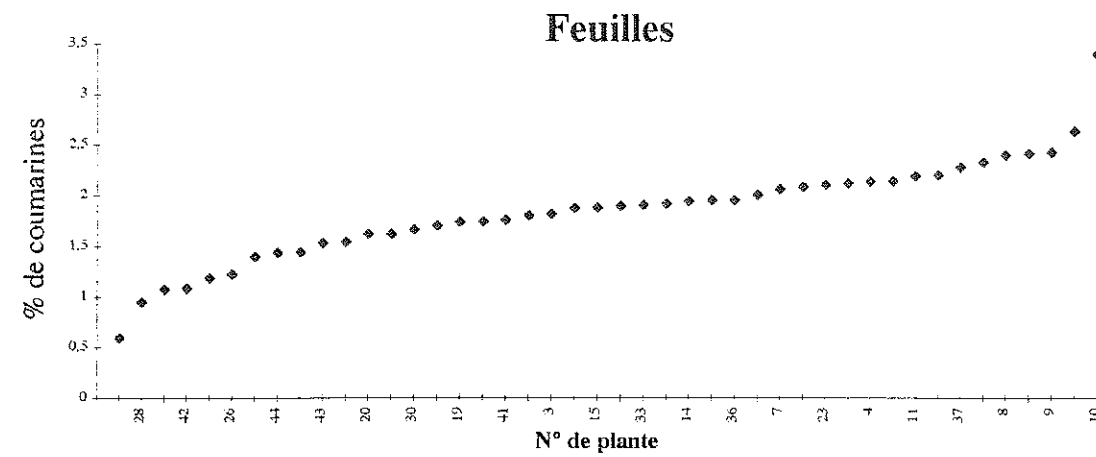


Figure 36 : Distribution de la teneur en coumarines des feuilles et des parties aériennes des plantes de l'origine issue de l'autofécondation du génotype 112-4

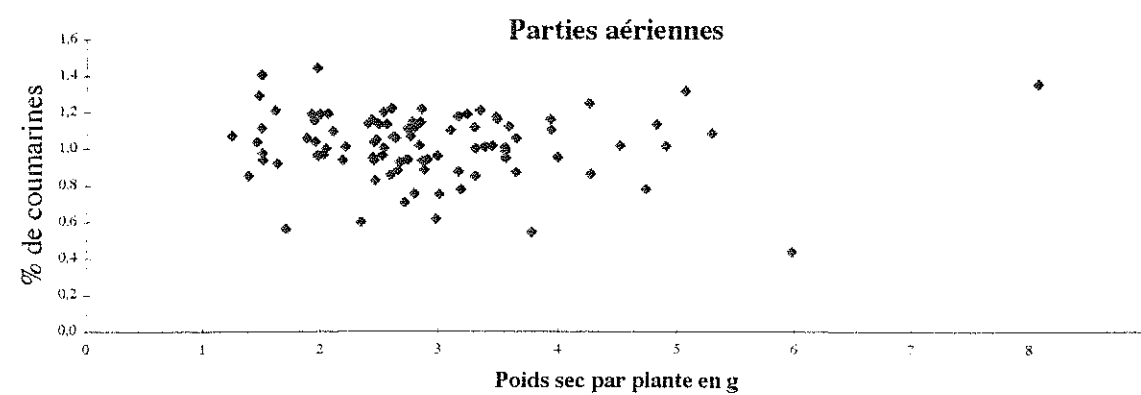
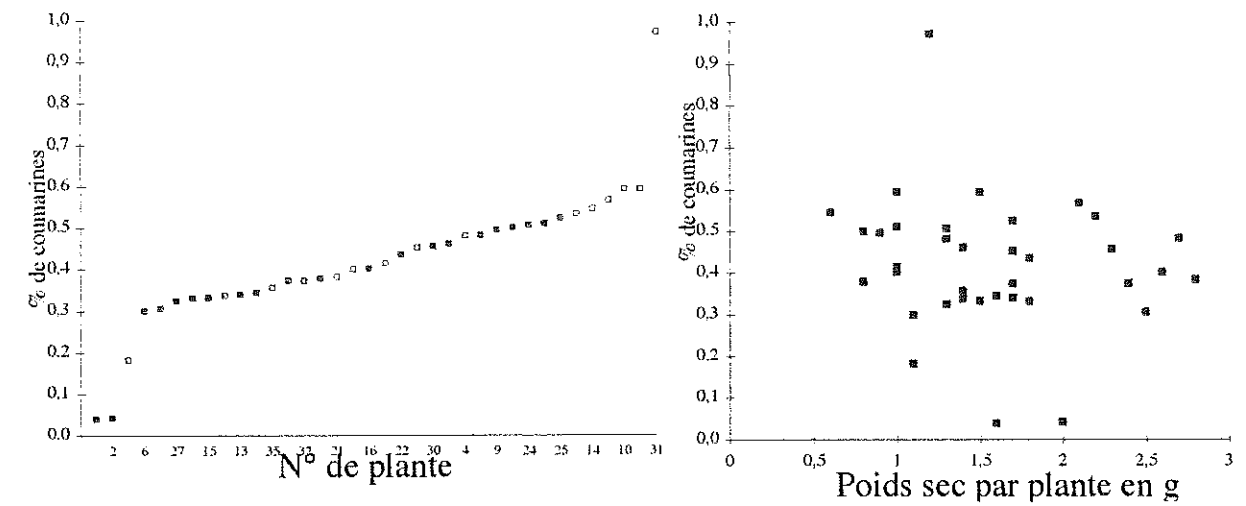


Figure 37 : Relation entre la teneur en coumarines et le poids sec des parties aériennes des plantes issues de l'origine provenant de l'autofécondation du génotype 112-4

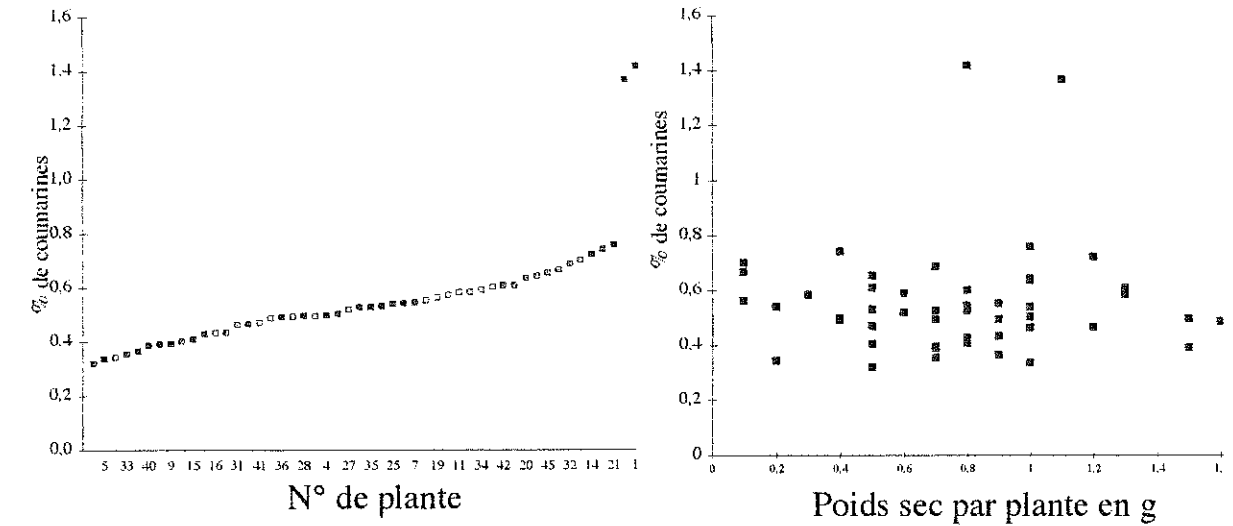
#### Origine 45

Teneur moyenne en coumarines :  $0,42 \pm 0,16$  (C.V. = 38,19%)



#### Origine 112

Teneur moyenne en coumarines :  $0,56 \pm 0,20$  (C.V. = 36,67%)



#### Origine 157

Teneur moyenne en coumarines :  $0,49 \pm 0,10$  (C.V. = 20,8%)

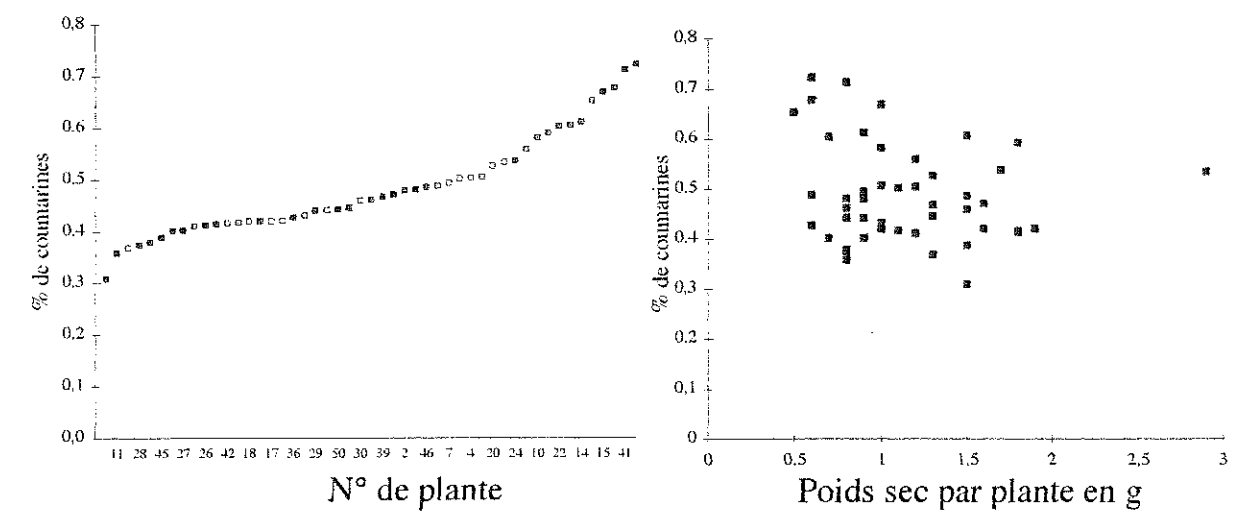


Figure 35 : Teneur en coumarines par plante et relation entre la teneur en coumarines et le poids sec des parties aériennes

Cette étude nous a permis de retenir deux génotypes que nous utiliserons par la suite :

- le génotype : 112-4, plante à forte "teneur en coumarines" ;
- le génotype : 45-4, plante à faible teneur.

Cependant, le mode d'extraction utilisé (méthanol à froid) et le faible nombre de plantes étudiées nous ont amenés à renouveler l'expérimentation dans de nouvelles conditions.

La teneur en coumarines par plante (50 plantes des 3 origines étudiées) et la relation entre le poids sec et la teneur en coumarines sont présentées **Figure 35**. Contrairement à ce que notent GORZ et HASKINS (1969 a), il ne semble pas exister de corrélation négative entre ces deux caractères. Pour les origines 45 et 112, le coefficient de variation du caractère "teneur en coumarines" est de l'ordre de 37% alors que pour l'origine 157, il n'est que de 20%. En effet, il s'agit d'une variété (YUKON), plus stable génétiquement. Le coefficient de variation sur 50 plantes est approximativement le même pour l'origine issue de l'autofécondation de la plante 112-4. De plus, la représentation des teneurs en coumarines des feuilles de cette population issue d'autofécondation (**Figure 36**) ressemble à celle obtenue Figure 37 et laisse penser à la distribution d'un caractère polygénique. Il est en effet difficile de mettre en évidence les trois classes CuCu (forte teneur), Cucu et cucu (faible teneur) décrites dans la bibliographie.

La **Figure 37** représente les teneurs en coumarines des parties aériennes en fonction de la plante ou de son poids. Dans le premier cas, on retrouve le même type de distribution que précédemment. En ce qui concerne la relation teneur en coumarines, poids sec des parties aériennes, il n'apparaît pas non plus de corrélation.

De plus, nous n'avons pas trouvé de plantes dites bb, c'est-à-dire ne possédant pas de  $\beta$  glucosidase active. Ce résultat étonnant ne peut s'expliquer que par une activité suffisante de la  $\beta$  glucosidase des génotypes bb pour l'hydrolyse du GOHCA *cis* au moment du séchage ou de l'extraction.

### 3.1.2.3 CONCLUSION

Il existe une forte variabilité génétique pour le caractère "teneur en coumarines" au sein des populations étudiées. Ce caractère tend à se stabiliser après une génération d'autofécondation. Cependant, les résultats obtenus remettent en cause le déterminisme génétique présenté dans la bibliographie et justifierait des études plus approfondies. En effet, le type de déterminisme génétique : 1 gène avec 2 allèles est rare et le caractère "teneur en coumarines" mériterait d'être à nouveau étudié avec des techniques comme par exemple l'électrophorèse afin de définir le rôle de ce ou ces gène(s).

A partir des génotypes sélectionnés, il serait possible de mettre en place un programme de sélection récurrente.

## 3.2 AMÉLIORATION PAR LA VOIE AGRONOMIQUE

Les recherches agronomiques ont pour objectifs, en se fondant sur des études sur l'écophysiologie des plantes, de définir un ou plusieurs *itinéraires techniques* en relation avec les contraintes du milieu, afin de permettre l'élaboration de produits végétaux récoltés avec des caractéristiques et des compositions chimiques déterminées.

### 3.2.1 SYNTHÈSE ET MIGRATION DES COUMARINES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DE *MELILOTUS OFFICINALIS*

#### 3.2.1.1 RÉPARTITION DES COUMARINES DANS LA PLANTE

*Objectif : Localiser les dérivés coumariniques dans la plante en vue de déterminer l'organe présentant la plus forte teneur en coumarines.*

GELCINSKAJA et BORDUNOVA (1936) et SLATENSEK (1947) ont montré que la teneur en coumarines est la plus élevée dans les tissus possédant une forte activité métabolique comme les feuilles et les bourgeons. Cependant, la localisation du site de synthèse est controversée. MOTHES et KALA (1955) et REPPPEL et WAGENBRETH (1958) proposent les racines tandis que GORZ et HASKINS (1962) considèrent que la synthèse s'effectue de façon prédominante dans les feuilles.

Deux essais ont donc été mis en place. Le premier cherche à montrer que les feuilles contiennent la plus forte teneur en coumarines de la plante quel que soit le génotype étudié. Le second a pour but de localiser plus finement les coumarines dans les différents organes de la plante afin de confirmer la relation pouvant exister entre l'activité métabolique et la teneur en coumarines.

#### 3.2.1.1.1 Matériel et méthodes

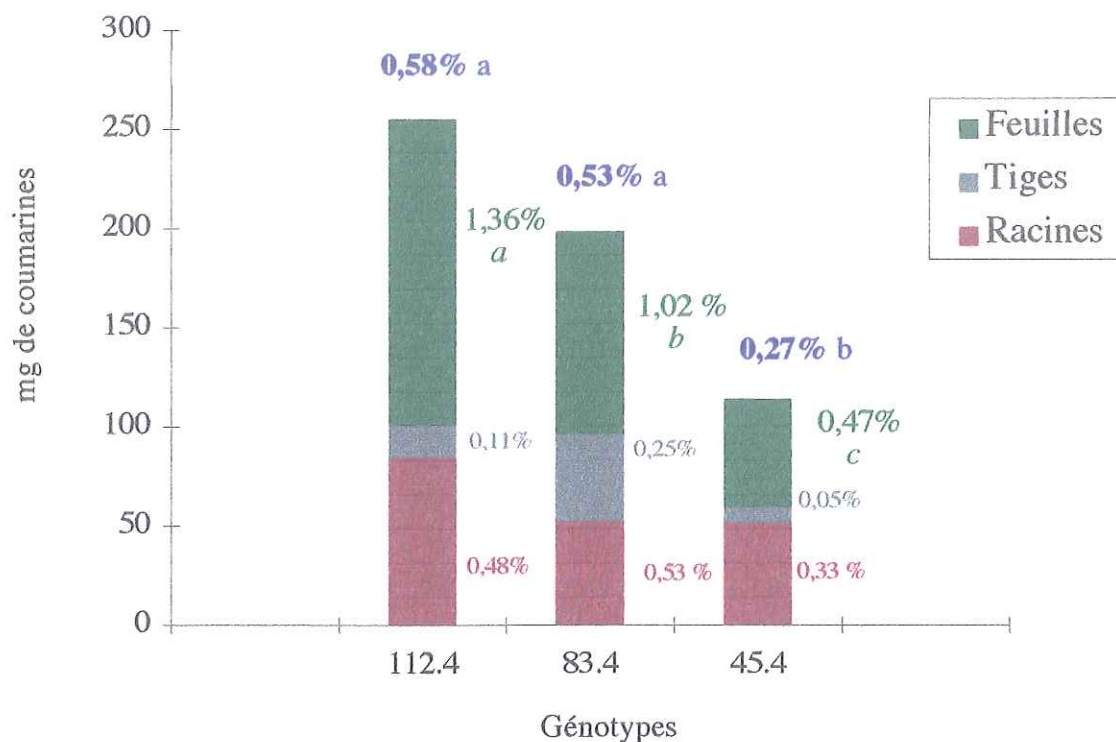
\* Répartition de la matière sèche et des coumarines dans les organes de trois génotypes caractérisés par leur teneur en coumarines (Essai 1)

Trois génotypes de *Melilotus officinalis* : 112-4, 83-4 et 45-4 préalablement caractérisés pour leurs teneurs en coumarines (respectivement forte, moyenne et faible) ont été retenus.

Les mélilots sont multipliés *in vitro*. Les plantes racinées sont sevrées au stade 6 à 7 feuilles en "fertil pots" de 5 cm de diamètre dans des mini-serres puis repiquées le 15/05/92 en pleine terre et récoltées 3 mois après.

Trois lots de 5 plantes de chaque génotype sont :

- disséqués en racines, tiges et feuilles,
- séchés 12 heures à 60°C,



|                                       |       |        |  |  |  |
|---------------------------------------|-------|--------|--|--|--|
| <b>Plante entière</b>                 |       |        |  |  |  |
| Poids sec en g                        | 44,25 | ± 2,97 |  |  |  |
| % de coumarines                       | 0,58  | ± 0,04 |  |  |  |
| % (GOHCA <i>trans</i> / coumarines)   | 8,54  | ± 0,09 |  |  |  |
| <b>Racines</b>                        |       |        |  |  |  |
| Poids sec en g                        | 17,62 | ± 1,76 |  |  |  |
| % de coumarines                       | 0,48  | ± 0,00 |  |  |  |
| % (GOHCA <i>trans</i> / % coumarines) | 1,02  | ± 0,14 |  |  |  |
| <b>Tiges</b>                          |       |        |  |  |  |
| Poids sec en g                        | 15,22 | ± 0,95 |  |  |  |
| % de coumarines                       | 0,11  | ± 0,03 |  |  |  |
| % (GOHCA <i>trans</i> / coumarines)   | 11,52 | ± 1,27 |  |  |  |
| <b>Feuilles</b>                       |       |        |  |  |  |
| Poids sec en g                        | 11,41 | ± 0,62 |  |  |  |
| % de coumarines                       | 1,36  | ± 0,1  |  |  |  |
| % (GOHCA <i>trans</i> / coumarines)   | 12,37 | ± 0,3  |  |  |  |
| <b>112-4</b>                          |       |        |  |  |  |
|                                       |       |        |  |  |  |
|                                       |       |        |  |  |  |
| <b>83-4</b>                           |       |        |  |  |  |
|                                       |       |        |  |  |  |
|                                       |       |        |  |  |  |
| <b>45-4</b>                           |       |        |  |  |  |
|                                       |       |        |  |  |  |
|                                       |       |        |  |  |  |

Figure 38 : Rendement et teneur en coumarines dans les différents organes de 3 génotypes de mélilot

- broyés au broyeur à billes,
- extraits à deux reprises pour une partie, au méthanol à froid pour l'autre à l'eau,
- dosés.

\* Répartition de la matière sèche et des coumarines dans les organes et tissus d'un génotype à forte teneur en coumarines (Essai 2)

Quatre plantes du génotype 112-4 multipliées par bouturage, cultivées en serre et récoltées à l'état végétatif après quatre mois de culture en serre sont :

- disséquées en limbes, nervures, pétioles, tiges, racines primaires et racines secondaires,
- séchées 12 heures à 60°C,
- broyées au broyeur à billes,
- extraites à l'eau,
- dosées.

### 3.2.1.1.2 Résultats

Les teneurs en coumarines trouvées après extraction au méthanol des organes des trois génotypes de mélilot sont données en Annexe 14. Elles complètent les résultats présentés à la **Figure 38** et obtenus après extraction à l'eau de ces mêmes organes.

En effet, le méthanol froid bien que moins performant que l'eau ne permet pas l'hydrolyse du GOHCA *cis* au cours de l'extraction (cf. 3.1.1.1 Extraction). Le GOHCA *trans* est le précurseur de la coumarine libre. Sa teneur peut servir d'indicateur d'activité de synthèse en coumarines d'un organe.

Il ressort de cet essai que :

- pour les trois génotypes étudiés, ***les feuilles présentent la plus forte teneur en coumarines*** (de 0,47 à 1,36%). Cet organe qui constitue 25 à 27% de la matière sèche des plantes contient toujours la plus importante quantité de GOHCA *trans* (plus de 12%).
- les ***tiges sont les organes les moins concentrés en coumarines*** (de 0,05 à 0,25%).
- les ***racines*** contiennent, en fin de première année de culture, une teneur en coumarines comprise entre 0,33 et 0,53%. Les coumarines racinaires sont constituées d'une ***très faible proportion de GOHCA trans*** (de l'ordre de 1%) et d'une forte proportion de GOHCA *cis* (61% dans le cas de l'extraction au méthanol) et le reste de coumarine libre (38% dans le cas de l'extraction au méthanol).

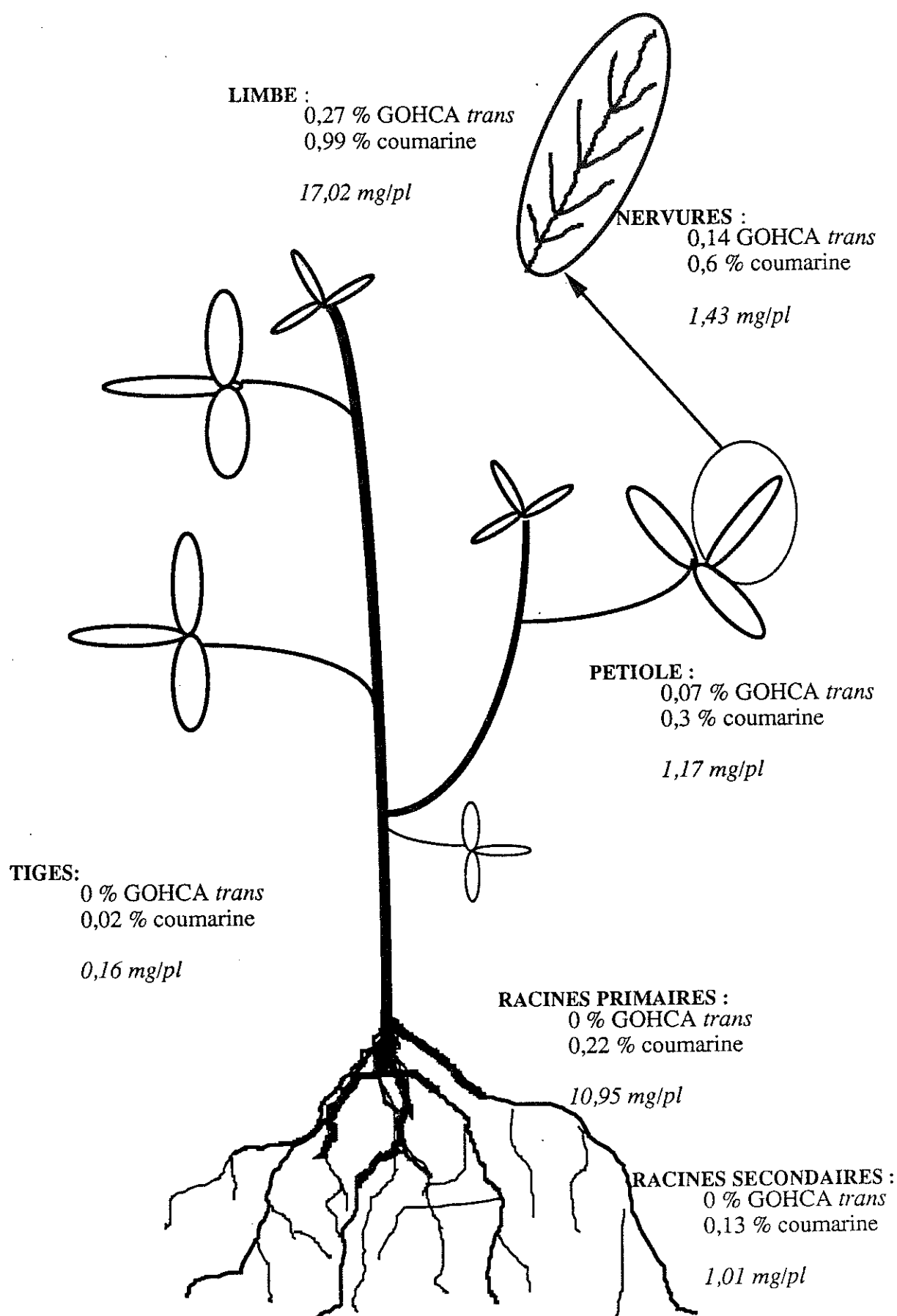


Figure 39 : Présentation sur un mélilot (schématisé à l'état végétatif) des teneurs et rendements en coumarines par organe

La dissection fine de plantes du génotype le plus performant 112-4 (Figure 39) met en évidence que le *limbe des feuilles possède la plus forte teneur en coumarines*. Cette teneur diminue dans les nervures (0,74%), le pétiole (0,37%) et la tige (0,02%) pour augmenter dans les racines primaires (0,22%).

*Le limbe foliaire et les racines primaires constituent les compartiments de la plante dans lesquels se trouvent les quantités de coumarines les plus élevées.*

### 3.2.1.1.3 Discussion

La teneur en coumarines des feuilles paraît être étroitement liée au génotype contrairement aux autres organes de la plante. Ces deux essais confirment les travaux même anciens trouvés dans la littérature : SLATENSEK (1947) et RUDORF (1958) considèrent en effet les feuilles comme le lieu de synthèse de coumarines. Les feuilles constituent donc l'organe possédant la plus forte teneur en coumarines de la plante. Dans cet organe, le rapport entre le pourcentage de GOHCA *trans* et de coumarine libre est élevé.

De plus, la dissection fine des organes nous a permis de montrer que le limbe foliaire est la zone de la feuille la plus active quant à la synthèse de coumarines. Ces résultats sont aussi en accord avec ceux trouvés dans la bibliographie : le limbe est la partie de la feuille possédant la plus forte activité photosynthétique. Or la localisation et la régulation des voies de biosynthèse des coumarines étant souvent associées aux chloroplastes (GESTETNER et CONN, 1974 ; ALIBERT, 1977 ; BROWN, 1977 ; POULTON *et al.*, 1980), il est permis d'émettre l'hypothèse de l'existence d'une *liaison entre l'activité photosynthétique et la synthèse de coumarines*.

Par ailleurs, la composition et le rendement en coumarines des racines permettent de poser une seconde hypothèse :

*les coumarines trouvées dans les racines sont synthétisées dans les parties aériennes d'où elles migrent vers les organes de réserve*. Si les coumarines étaient synthétisées dans les racines, elles devraient s'accumuler sous forme de GOHCA *trans*. Or la réaction d'isomérisation sous une forme *cis* n'est pas possible dans un organe souterrain, faute d'U.V. La forte présence de GOHCA *cis* dans les extraits méthanoliques de racines laisse à penser, à l'instar de ce qui se passe dans les parties aériennes, que la coumarine libre contenue dans les extraits aqueux de racines est le résultat d'une réaction d'hydrolyse entre la  $\beta$  glucosidase et son substrat au cours du séchage. *La migration des coumarines vers la racine se fait vraisemblablement sous forme de glucosides*.

L'étude de la synthèse et de la migration des coumarines dans la plante vise à vérifier cette dernière hypothèse. En effet, il est probable que les dérivés coumariniques contenus dans les vacuoles des cellules, au niveau du limbe foliaire, migrent avec les autres sucres de la plante afin d'être mis en réserve.

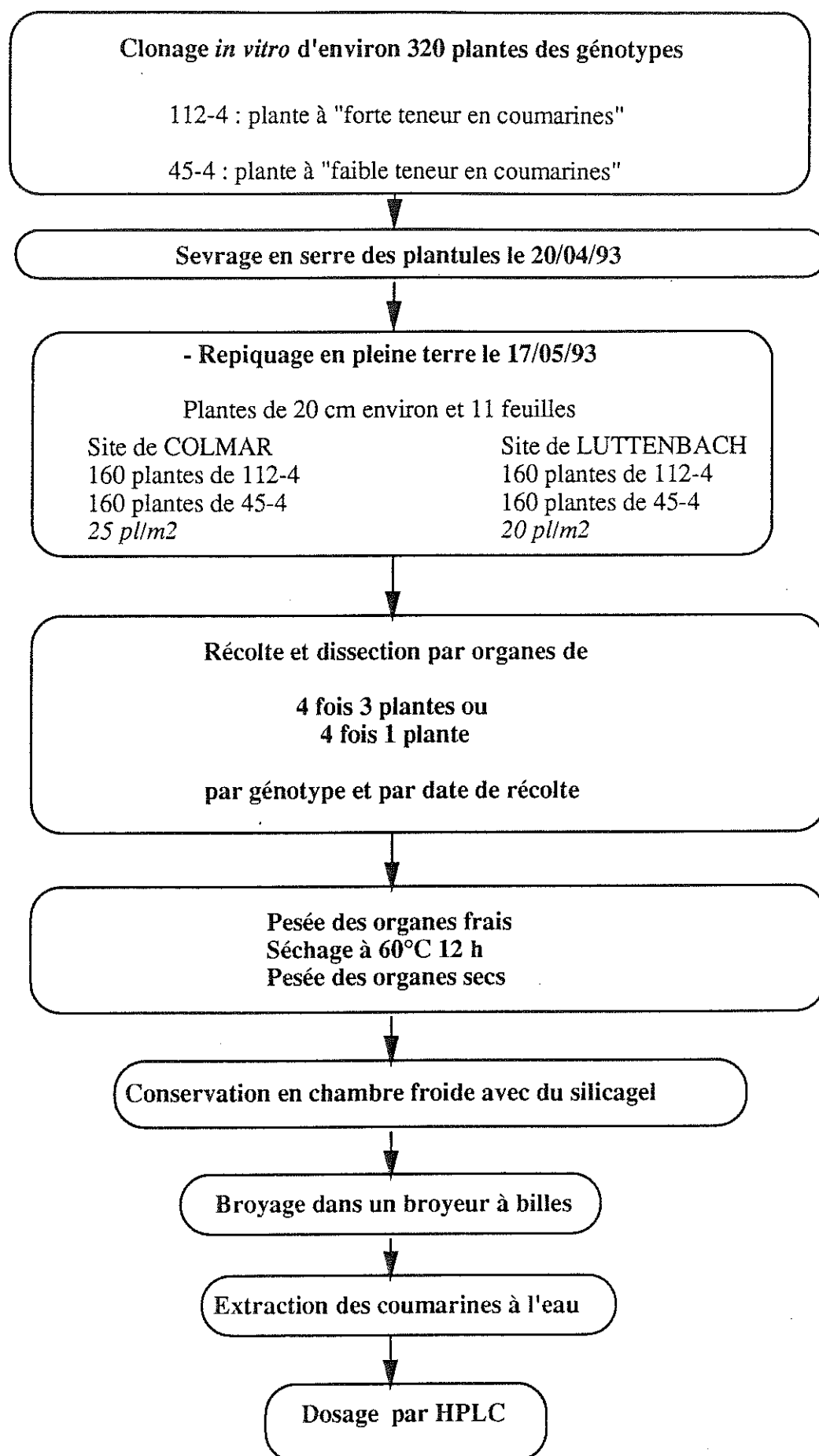


Figure 40 : Protocole expérimental choisi pour l'étude de la synthèse et migration des coumarines dans le mélilot

### 3.2.1.2 SYNTHÈSE ET MIGRATION DES COUMARINES DANS LE MÉLILOT

#### Objectifs :

- Tester l'hypothèse d'une migration des coumarines de l'organe "source" (feuilles) vers l'organe "puits" (racines)
- Etablir un parallèle entre la teneur en azote et la teneur en coumarines dans les tiges, les racines et les feuilles du mélilot

Le lien existant entre le métabolisme de l'azote et la synthèse de coumarines (la phénylalanine est l'acide aminé précurseur des coumarines) nous a amenés à étudier l'existence d'une éventuelle relation.

- Tester l'éventuelle capacité des racines à synthétiser des coumarines par culture d'organe isolé pour vérifier que cet organe joue uniquement un rôle de "puits"

#### 3.2.1.2.1 Matériel et méthodes

Le protocole expérimental de cet essai est présenté ci-contre **Figure 40**.

Cet essai est placé sur deux sites :

- à Luttenbach (48° 2' N, 7° 2' 15" E ; altitude 400m) dans la vallée de Munster dans un sol sableux,
- dans un châssis contenant le même type de sol sur le site de l'INRA de Colmar (48° 3' N, 7° 2' E ; altitude 200 m).

Dans le premier cas, 160 plantes de 112-4 et 160 plantes de 45-4 sont repiquées sur une surface de 16 m<sup>2</sup> soit à une densité de 20 pl. m<sup>-2</sup>. Dans le châssis, la surface étant plus limitée, le même nombre de plantes est repiqué à une densité de 25 pl. m<sup>-2</sup>. Deux rangées de mélilot sont produites par semis. Ils sont au même stade de développement que les clones au jour du repiquage et ils sont placés autour de l'essai, afin de limiter "l'effet bordure"\*.

Les plantes récoltées sont mesurées puis disséquées par organe. Dans le cas des deux premières dates de récolte, 3 plantes par génotype et par répétition sont utilisées afin de disposer de suffisamment de matière sèche par organe (environ 0,5 g) pour effectuer un dosage fiable. Aux dates suivantes, une plante constitue une répétition. Lorsque les plantes mesurent plus de 60 cm, elles sont disséquées par niveaux.

Ces derniers sont ainsi définis :

- 1 : N1 du niveau du sol à 30 cm,
- 2 : N2 de 30 cm à 60 cm,
- 3 : N3 supérieure à 60 cm.

| Colmar (INRA Châssis) |                           | Luttenbach       |                           |
|-----------------------|---------------------------|------------------|---------------------------|
| Dates de récolte      | Nombre de niveaux étudiés | Dates de récolte | Nombre de niveaux étudiés |
| 1/06/93               | 1                         | 1/06/93          | 1                         |
| 15/06/93              | 1                         | 15/06/93         | 1                         |
| 6/07/93               | 1                         | 6/07/93          | 1                         |
| 27/07/93              | 3                         | 27/07/93         | 1                         |
| 17/08/93              | 3                         | 17/08/93         | 1                         |
| 7/09/93               | 3                         | 7/09/93          | 1                         |
| 19/10/93              | 3                         | 5/10/93          | 1                         |
| 26/04/94              | 1                         | 26/04/94         | 1                         |
| 25/05/94              | 3                         | 25/05/94         | 3                         |
| 21/06/94              | 3                         | 21/06/94         | 3                         |

Tableau 6 : Calendrier des récoltes des génotypes 112-4 et 45-4

| Lieu       | Date de récolte | génotypes        | Organes                      |
|------------|-----------------|------------------|------------------------------|
| Colmar     | 6/07/93         | 112-4<br>et 45-4 | racines<br>tiges<br>feuilles |
| Luttenbach | 17/08/93        | 112-4<br>et 45-4 | racines<br>tiges<br>feuilles |

Tableau 7 : Échantillonnage pour le dosage de l'azote total

A l'apparition des premières morsures de sitones (*Sitona cylindricolis*), des traitements réguliers ont été effectués sur les deux sites avec de la lambda-cyhalothrine à 6,25 g ha<sup>-1</sup>.

Le 14/12/93 en fin de première année de culture, les parties aériennes constituées uniquement de tiges sèches ont été coupées à 10 cm de la base de la même manière sur les deux sites.

\* Les sommes des températures correspondent à la somme en base 0 (le zéro végétatif\* du mélilot n'est pas connu) de la moyenne des températures mesurées sous abri (température minimale + température maximale de la journée / 2) d'un relevé hebdomadaire.

En 1993, la somme débute avec la mise en place des plantes le 17/05/93. En 1994, elle débute au moment où les plantes commencent à se développer soit début mars.

A Luttenbach, les relevés thermiques ont été effectués à l'aide d'un enregistreur placé sur le site de l'essai. A Colmar, ils ont été notés par le centre météorologique situé sur le site de l'INRA à quelques dizaines de mètres de l'expérimentation.

\* Le rayonnement global a été relevé par le centre météorologique de Colmar. La somme du rayonnement global correspond à la somme journalière du rayonnement reçu par les plantes. Elle est exprimée en J cm<sup>-2</sup>. Elle débute :

- en 1993, à la mise en place des plantes sur le terrain,
- en 1994, le 1er mars.

Les dates de récoltes sont présentées **Tableau 6**.

\* Dosage de l'azote total

Certains échantillons (**Tableau 7**) sont analysés afin de définir leur teneur en azote total. La méthode utilisée est décrite en Annexe 15.

Le choix de ces échantillons a été réalisé en grande partie en fonction de la matière sèche disponible restante, après analyse des coumarines.

\* Culture *in vitro* de racines isolées de mélilot

Des apex racinaires d'environ 1 cm de long sont prélevés sur des plantes 112-4 cultivées *in vitro* et disposés dans 8 boîtes de pétri de 8 cm de diamètre contenant un milieu gélosé B5 (Annexe 16). Après 2,5 mois de culture à la lumière (4 boîtes) ou à l'obscurité (4 boîtes) à 22°C, les racines produites sont prélevées, séchées 4 heures à 60°C, broyées et analysées.

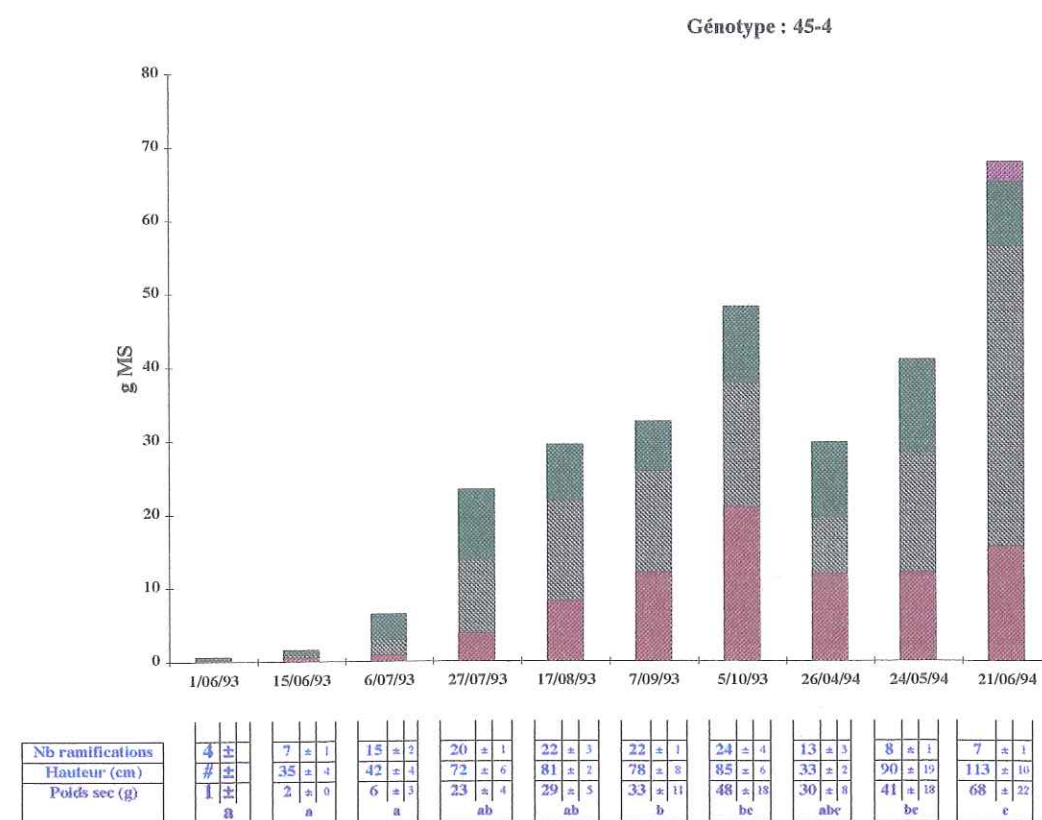
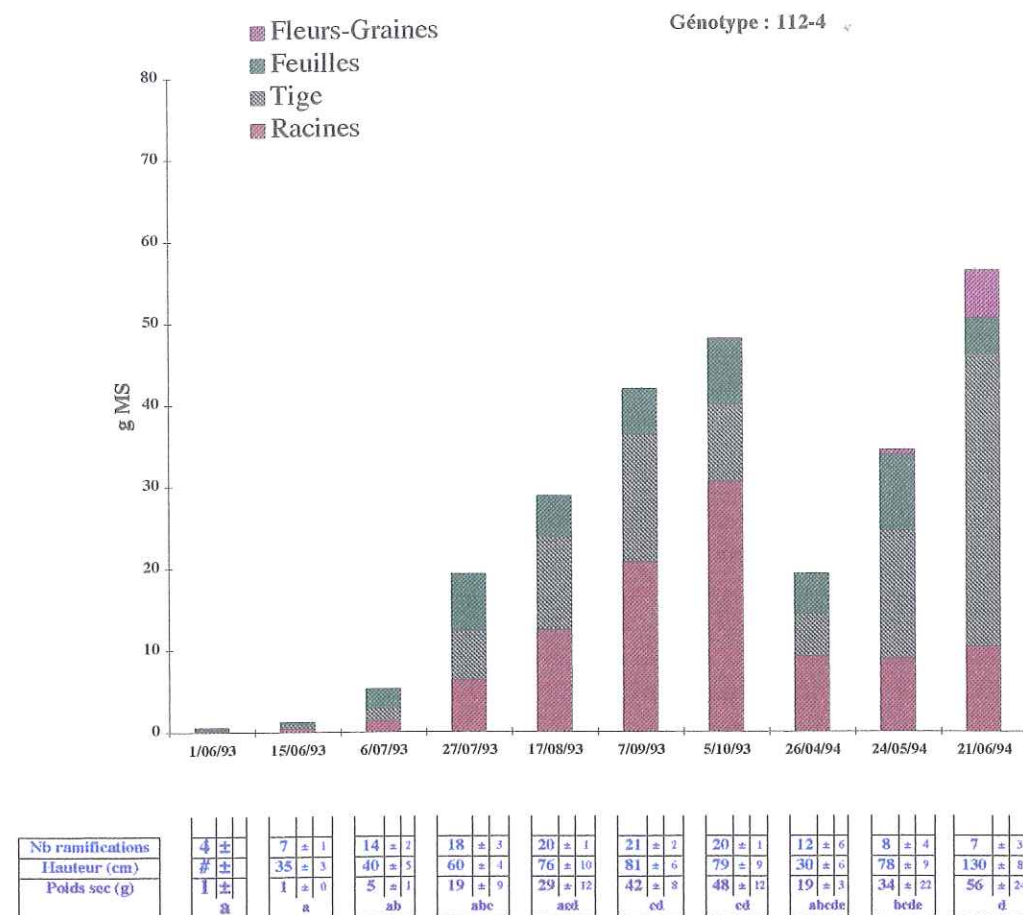


Figure 41 : Poids sec par organe en fonction de la date de récolte à Luttenbach

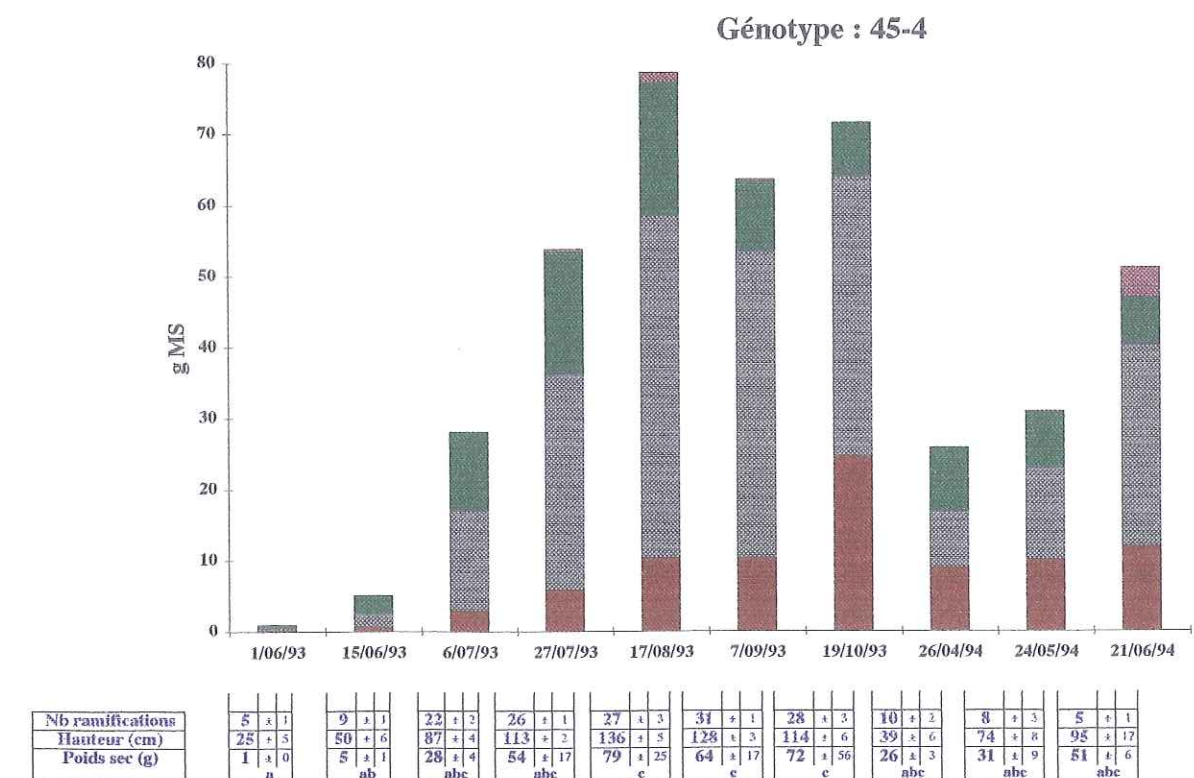
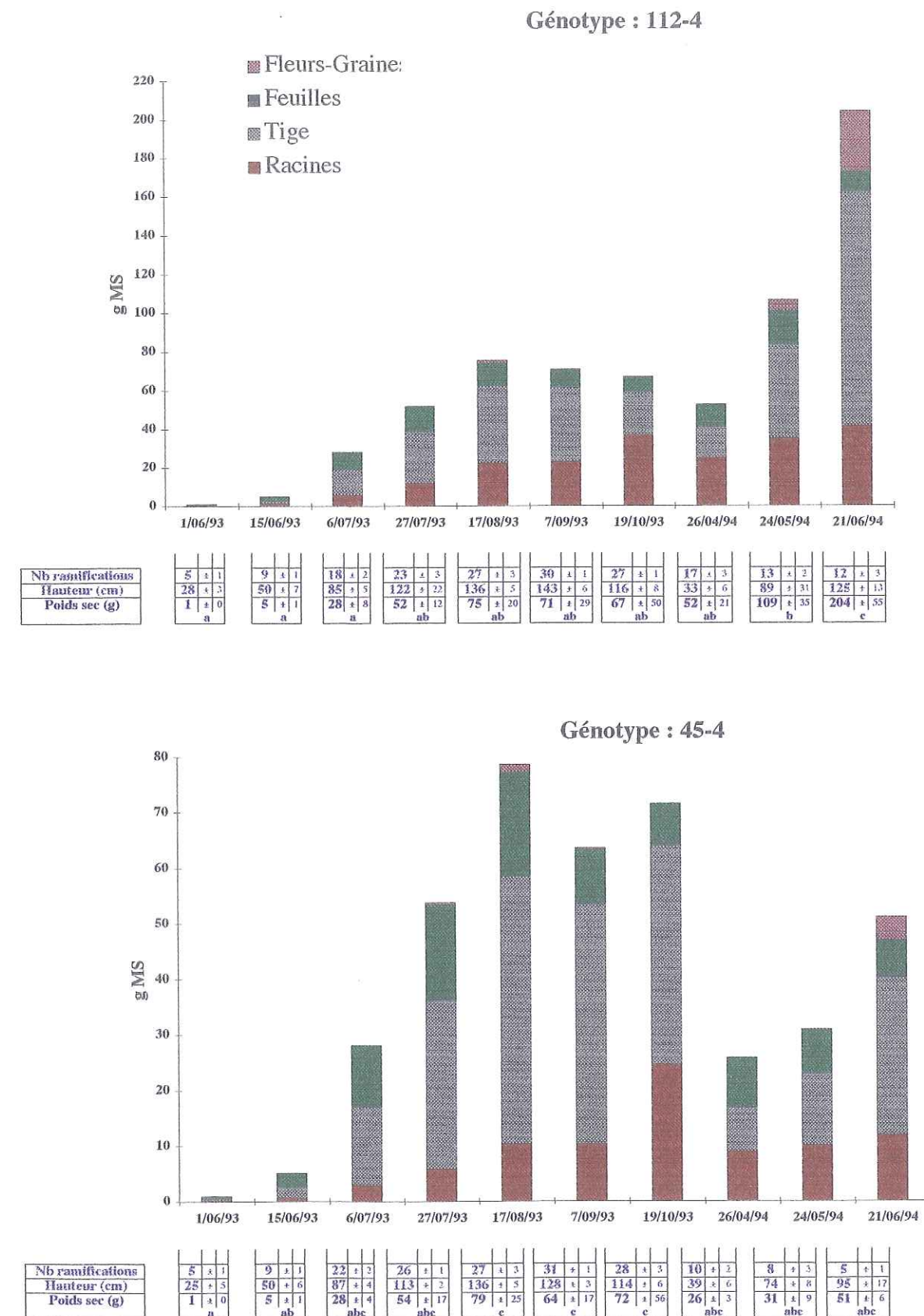


Figure 42 : Poids sec par organe en fonction de la date de récolte à Colmar

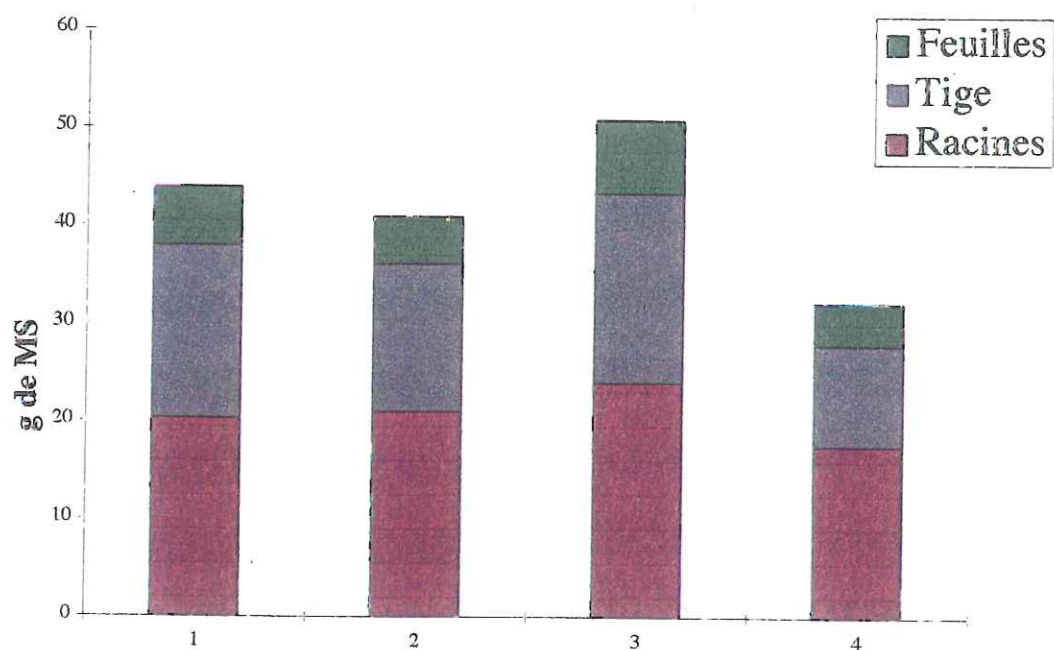


Figure 43 : Poids sec (MS) par organe des 4 plantes de génotype 112-4 récoltées le 9/7/93 à Luttenbach

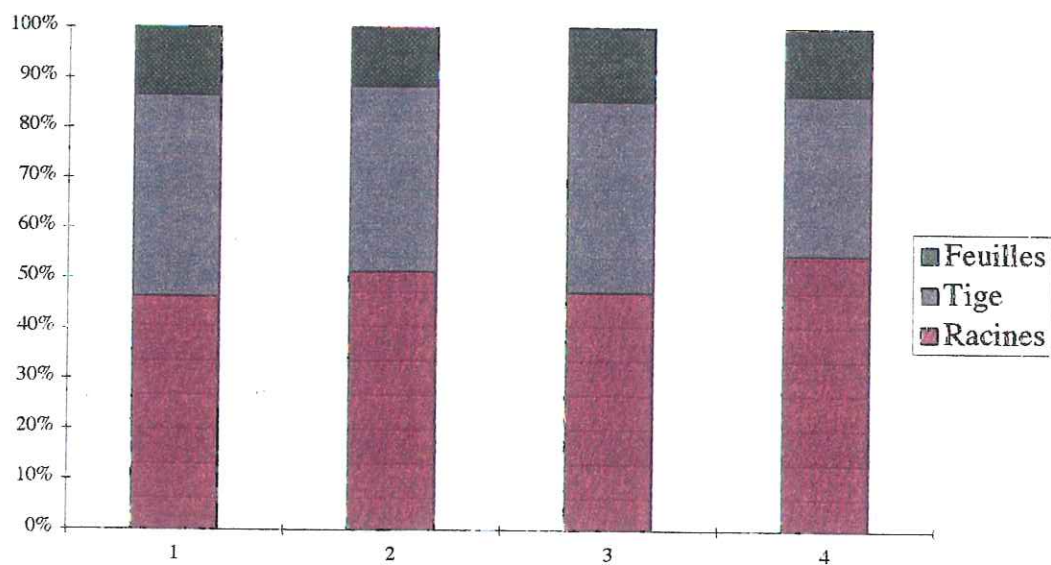
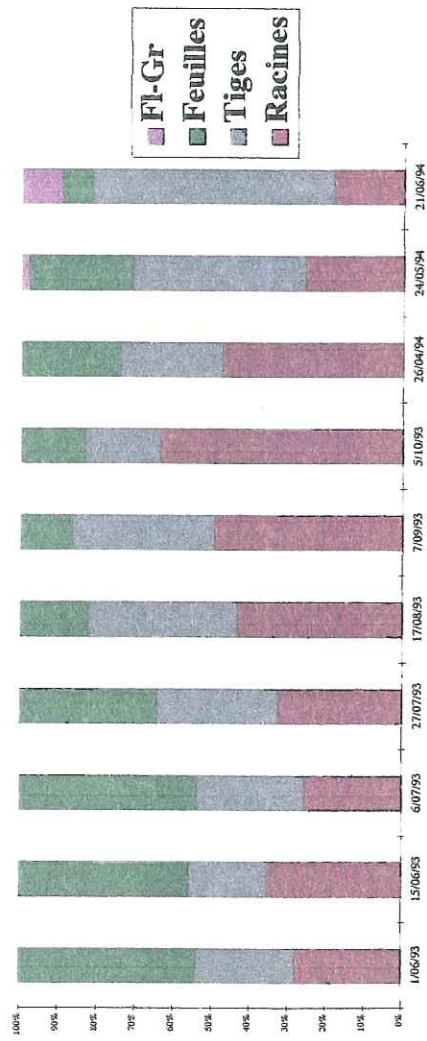


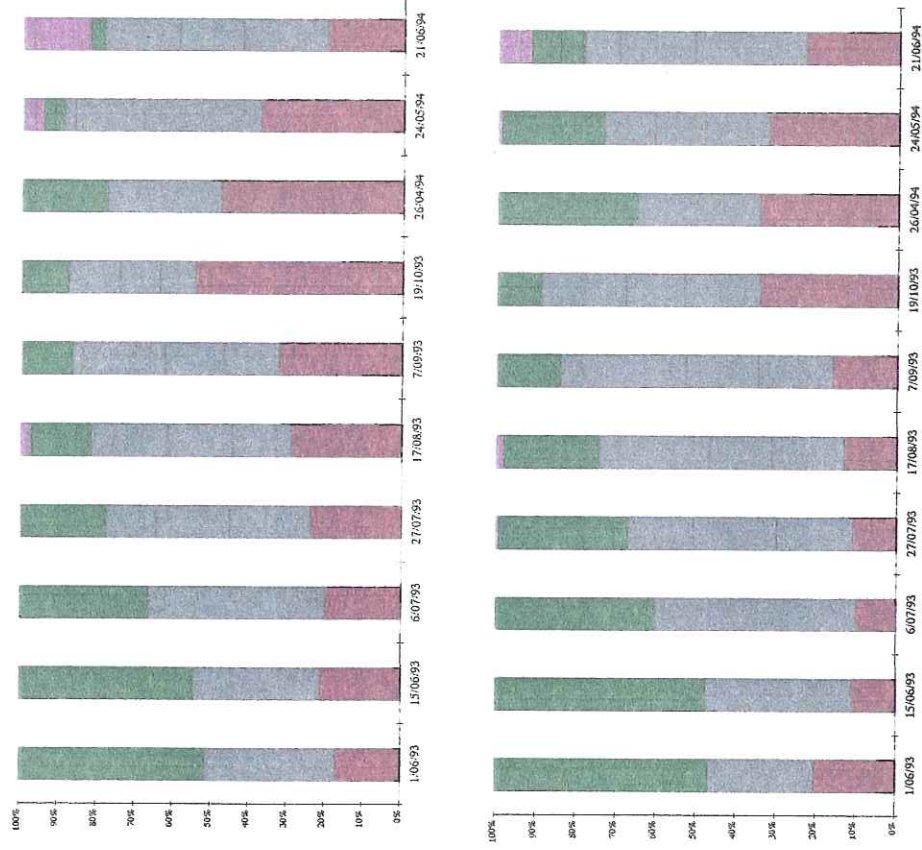
Figure 44 : Proportion des organes des 4 plantes de génotype 112-4 récoltées le 9/7/93 à Luttenbach

## Luttenbach



112-4

## Colmar



45-4

Figure 45 : Proportion de chacun des organes dans la plante en fonction des dates de récolte

### 3.2.1.2.2 Résultats et discussion

#### 3.2.1.2.2.1 Rendement moyen en matière sèche

L'évolution du poids sec par organe, du nombre de ramifications et de la hauteur des plantes est présentée, pour les deux génotypes étudiés, par lieux de culture (**Figure 41** à Luttenbach, **Figure 42** à Colmar).

- A *Luttenbach*, les 3 paramètres étudiés sont approximativement les mêmes pour les 2 génotypes pour une même date de récolte. Sur ce site, la première année, les plantes se développent régulièrement du 1er juin au 5 octobre. A cette dernière date, elles pèsent environ 50 g. Au printemps suivant, les plantes utilisent leur réserve racinaire et se développent jusqu'à mi-juin où, après "mise à graines", elles dépérissent.

- A *Colmar*, la croissance des plantes s'arrête la première année de culture autour du 17 août, avec un rendement par plante de 70 à 80 g. Les deux génotypes évoluent pratiquement de la même manière la première année de culture. Les plantes du génotype 112-4 se développent beaucoup mieux en seconde année. Leur poids sec et leur nombre de ramifications sont plus importants dès le 26/04/93.

Dans le cas du génotype 112-4, le poids sec des plantes reste approximativement stable jusqu'à l'automne alors que les plantes du génotype 45-4 présentent un poids sec le 7 septembre légèrement inférieur à celui du 17 août. Ce résultat peut paraître étonnant. En fait, la présentation sous forme de moyennes ne met pas en évidence la très *forte hétérogénéité pondérale* observée *entre les quatre répétitions* (poids de chacune des quatre plantes récoltées à une date donnée par site).

Ce phénomène est très net lorsque l'on observe les écarts types liés au poids des plantes par date de récolte qui atteignent jusqu'à 75% du poids moyen des 4 plantes le 19/10/93 à Colmar. L'exemple des plantes 112-4 prélevées le 7/9/93 à Luttenbach est présenté **Figure 43**. Ce phénomène est difficile à expliquer puisque nous avons travaillé sur des surfaces réduites et homogènes, à des densités relativement faibles, avec des plantes repiquées à un même âge, possédant une même taille au repiquage. Cependant, les dégâts de sitones présentes en début de végétation de chaque cycle ainsi que la grêle qui a touché le site de l'INRA le 25/5/93 peuvent expliquer partiellement ce phénomène. De plus, le dispositif expérimental simplifié du fait du nombre de plantes disponibles peut aussi être l'une des causes de cette très forte variabilité pondérale.

Néanmoins, lorsque les résultats sont présentés non plus en valeur absolue (poids des organes) mais en *valeur relative* (proportion que représente le poids sec de l'organe considéré dans la plante) (**Figure 44**), nous pouvons remarquer que l'hétérogénéité observée est très nettement atténuée. Ainsi, *à une date de récolte donnée, sur un site de culture, si le poids des plantes est très variable, le rapport entre organes reste pratiquement constant.*

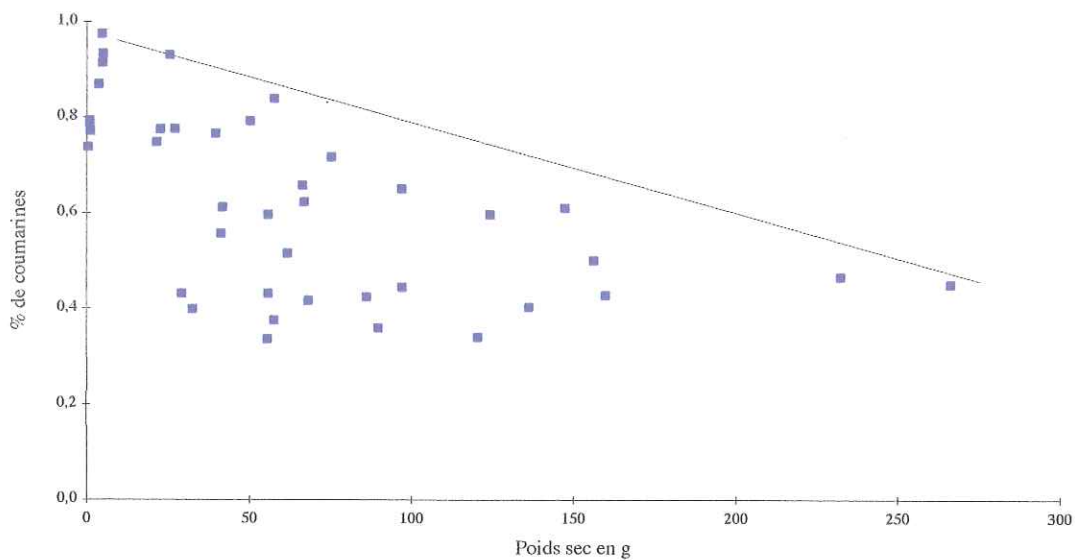


Figure 46 : Relation entre la teneur en coumarines et le poids sec dans la plante entière de génotype 112-4 à Colmar

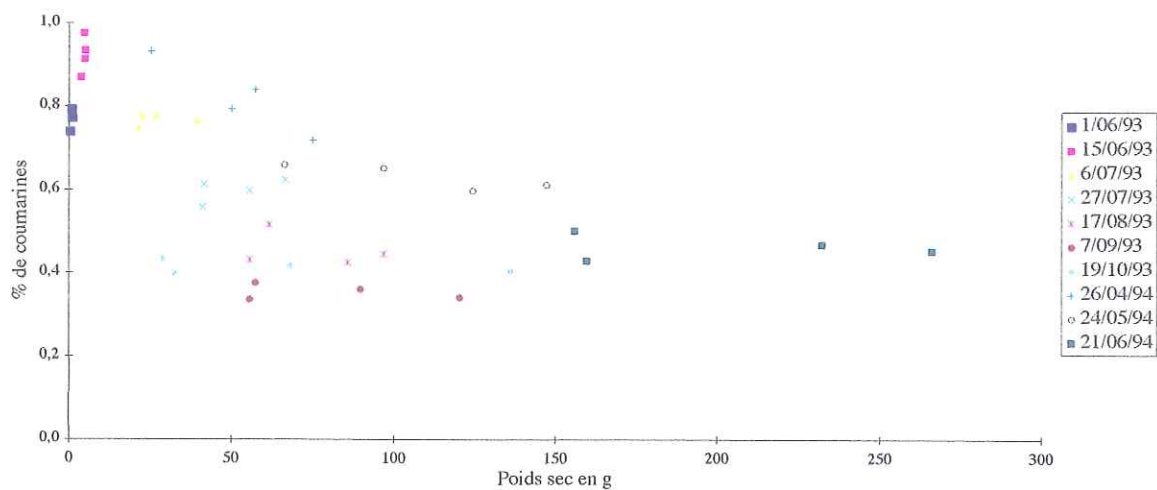


Figure 47 : Relation entre la teneur en coumarines et le poids sec dans la plante entière de génotype 112-4 à Colmar par dates de récolte

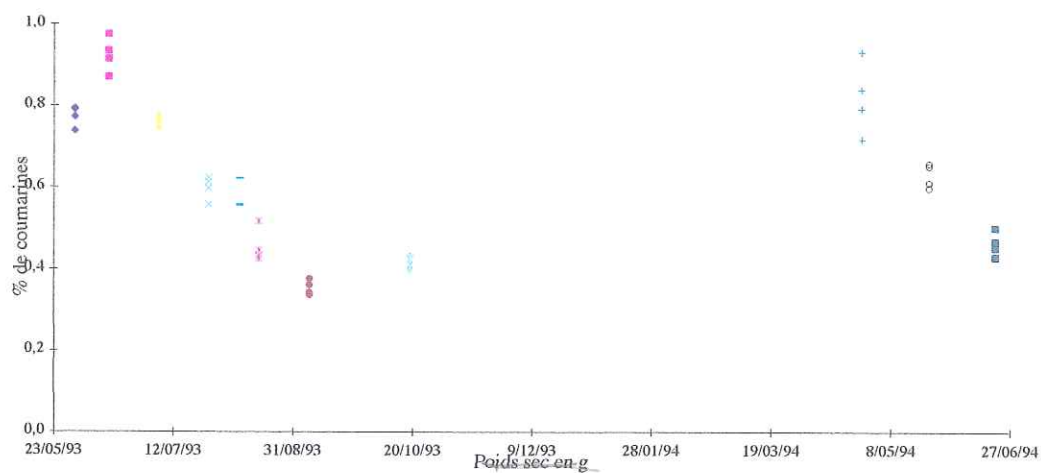


Figure 48 : Relation entre la teneur en coumarines et la date de récolte dans la plante entière de génotype 112-4 à Colmar

La relation entre l'âge et le rapport moyen entre organes (**Figure 45**) montre une augmentation du compartiment racinaire et une perte normale des feuilles à l'automne. Suivant les génotypes, la proportion de racines à l'automne peut varier de 35 à 60%. Elle est toujours plus importante sur les plantes 112-4 que sur les plantes 45-4 à une date donnée. De plus, à la floraison, stade de récolte préconisé par la pharmacopée, les tiges constituent 50 à 65% de la matière sèche de la plante.

#### **3.2.1.2.2.2 Teneur en coumarines**

La très forte hétérogénéité pondérale entre plantes par date de prélèvement, nous a conduits à remettre en cause la fiabilité et l'intérêt de cette expérimentation. En effet, en cas de liaison entre le poids de la plante et sa teneur en coumarines, le facteur "date de récolte" testé aurait été supplanté à notre insu par un effet poids. Ce qui paraît être le cas sur la **Figure 46**. Nous avons choisi de présenter les données des plantes 112-4 à Colmar, les résultats obtenus à Luttenbach et/ou avec le génotype 45-4 étant similaires.

La courbe enveloppe présentée sur cette figure nous amènerait à conclure qu'il existe :

- un phénomène *de dilution des coumarines dans la plante* (plus le poids de la plante est faible, plus la teneur en coumarines est élevée alors que lorsque la biomasse augmente, la teneur diminue). C'est un effet bien connu notamment dans le cas du métabolisme de l'azote (pour la luzerne, GREENWOOD, 1990 ; Figure 2) ;
- des plantes, situées en dessous de la courbe ont subi l'influence d'un facteur limitant leur teneur en coumarines et/ou leur poids de façon plus marquée que celles qui sont sur la courbe.

Cependant, lorsque l'on fait apparaître les dates de récoltes **Figure 47** et **Figure 48**, on peut tirer les conclusions suivantes :

***la teneur en coumarines est indépendante du poids et du stade de développement de la plante. Elle est uniquement fonction de la date de récolte.***

Ainsi, dans le cas des plantes de génotype 112-4 récoltées à Colmar le 21/06/94, quel que soit le poids des plantes (de 150 g à 270 g dans ce cas), la teneur est stable (de l'ordre de 0,43%).

Cette très forte hétérogénéité pondérale entre plantes d'un même génotype à une date de récolte donnée, nous a évité de commettre une erreur d'interprétation. Sans ce "biais expérimental", nous aurions pu établir une relation directe entre le poids de la plante et la teneur en coumarines. Alors qu'en fait,

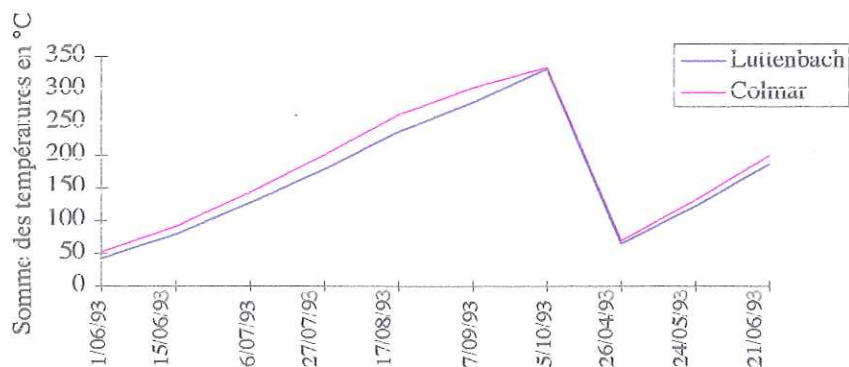


Figure 49 : Somme des températures à Luttenbach et à Colmar

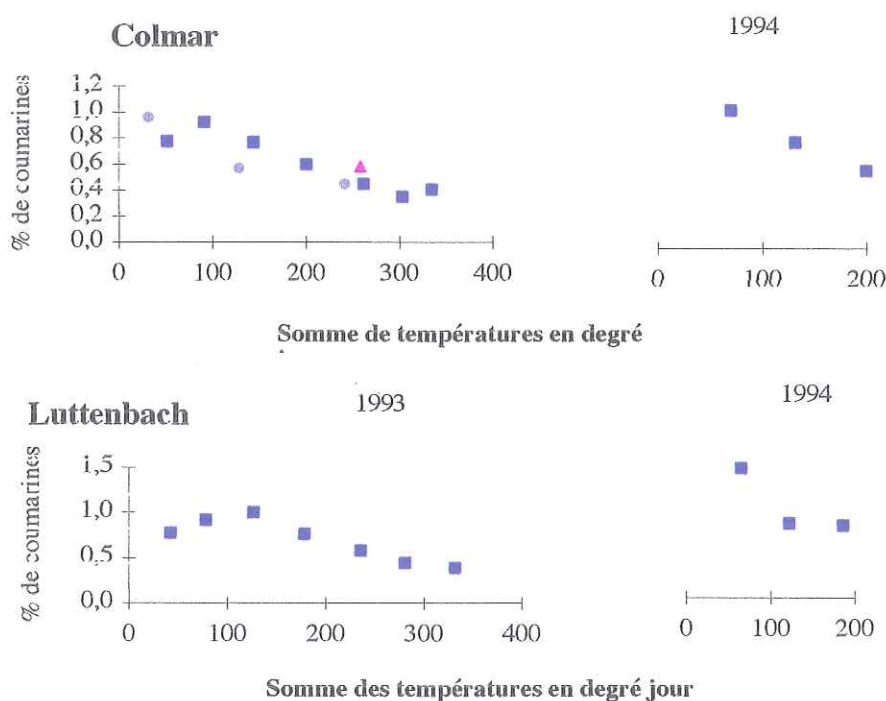


Figure 50 : Relation entre la teneur en coumarines des plantes 112-4 et la somme des températures

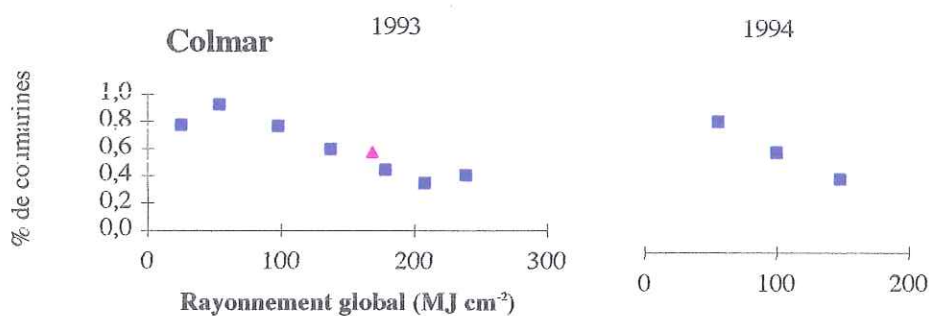


Figure 51 : Relation entre la teneur en coumarines des plantes 112-4 et le rayonnement global

Légende commune aux figures 50 et 51

- ▲ Plantes essai dissection de 1992
- Plantes de l'essai synthèse et migration 1993 - 1994
- Plantes de l'essai densité 1994

*à une date de récolte donnée, dans des conditions de culture déterminées, une plante présente un rapport entre organes stable et une teneur en coumarines indépendante de son poids mais fonction de son âge.*

Il est maintenant nécessaire de savoir à quoi correspond l'âge de la plante et définir ainsi le facteur qui intervient dans le temps et qui détermine la synthèse de coumarines. En agronomie, pour caractériser le développement d'une plante, on assimile le temps :

- soit à la somme des températures reçues par la plante au cours de son cycle (DURAND, 1969),
- soit à la somme du rayonnement global durant la période de végétation de la plante.

La prévision des différents stades végétatifs, à partir d'un facteur climatique facilement mesurable, permet d'améliorer le calendrier des travaux de culture et des récoltes.

La **Figure 49** représente les sommes des températures sur les deux sites étudiés. Bien que Luttenbach soit situé à 400 m d'altitude et Colmar à 200 m, il n'y a pas de différences importantes de températures enregistrées entre les deux sites.

La relation existant entre la somme des températures et la teneur en coumarines sur les deux sites est présentée **Figure 50**. Une somme des températures déterminée donne approximativement la même teneur en coumarines, à Luttenbach comme à Colmar : la première année de culture, une plante ayant reçu 90 degrés jour possède une teneur de 0,9% de coumarines sur les deux sites ; pour 250 degrés jour, les plantes contiennent environ 0,5% de coumarines.

La superposition de ces deux courbes pourrait donc constituer une *courbe de référence* permettant, à partir de la somme des températures d'un site donné, de définir approximativement la teneur en coumarines des plantes cultivées de géotype 112-4.

La **Figure 51** présente la relation existant entre la somme du rayonnement global et la teneur en coumarines. Cette courbe est similaire à celle obtenue avec les sommes des températures. En effet, ces deux facteurs sont fortement corrélés.

Les résultats des teneurs en coumarines des plantes de géotype 112-4 récoltées en 1992 mis en relation avec la somme des températures ou la somme du rayonnement global tendent à venir valider cette courbe de référence.

Cependant, pour choisir parmi ces deux facteurs celui pouvant être considéré comme une variable explicative de la teneur en coumarines et pour valider cette courbe de référence, il faudrait disposer du suivi de ce géotype sur des sites bien caractérisés quant à la somme des températures ou à la somme du rayonnement global.

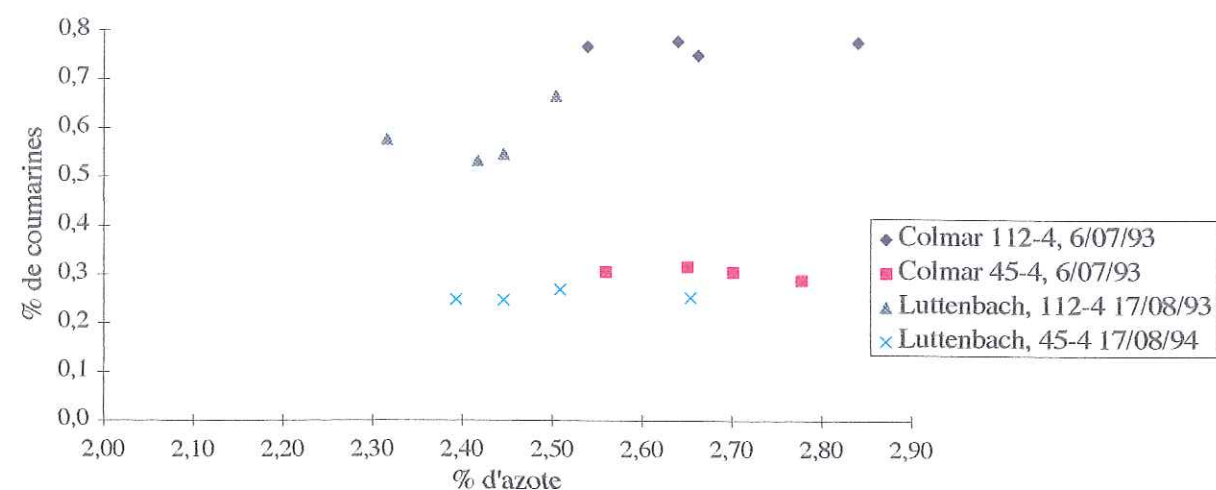


Figure 52 : Relation entre la teneur en coumarines et la teneur en azote dans la plante entière

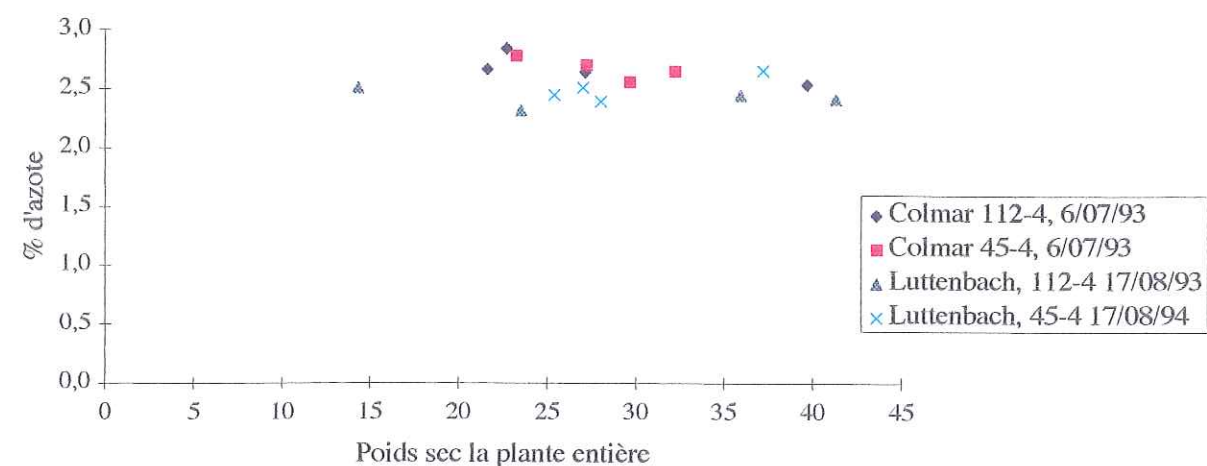
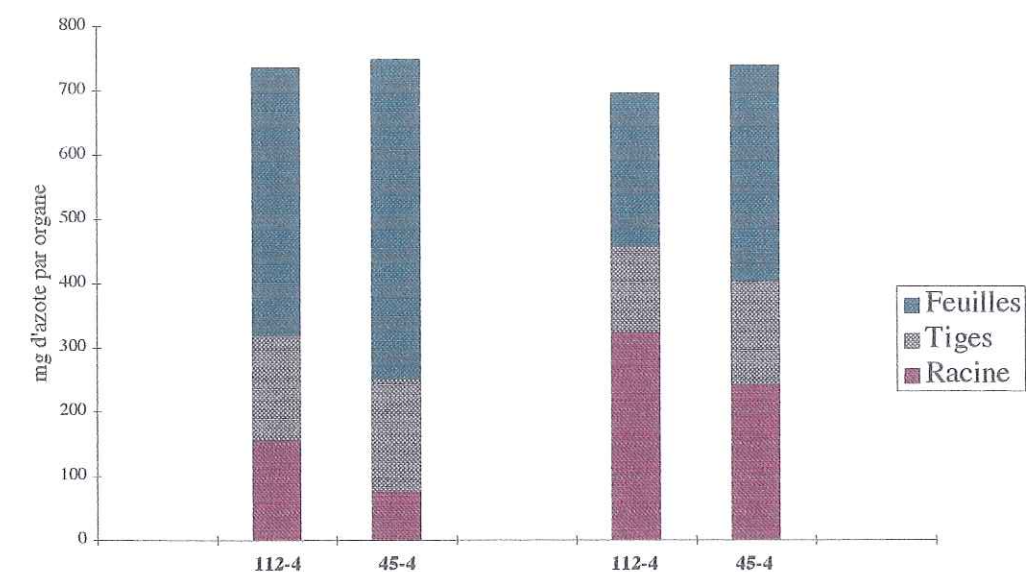


Figure 53 : Relation entre la teneur en coumarines et le poids sec de la plante entière



| Colmar, le 6/07/93 |       |        |  | Luttenbach, le 17/08/93 |        |       |         |
|--------------------|-------|--------|--|-------------------------|--------|-------|---------|
| Plante entière     |       |        |  |                         |        |       |         |
| Poids sec en g     | 27,78 | ± 8,27 |  | 28,08                   | ± 3,82 | 28,77 | ± 12,16 |
| % de coumarines    | 0,77  | ± 0,01 |  | 0,3                     | ± 0,01 | 0,58  | ± 0,06  |
|                    | a     |        |  | b                       |        | a     |         |
| % d'azote          | 2,67  | ± 0,12 |  | 2,67                    | ± 0,09 | 2,42  | ± 0,08  |
|                    | a     |        |  | a                       |        | a     |         |
| Racines            |       |        |  |                         |        |       |         |
| Poids sec en g     | 5,53  | ± 1,38 |  | 2,83                    | ± 0,32 | 12,43 | ± 6,41  |
| % de coumarines    | 0,38  | ± 0,04 |  | 0,21                    | ± 0,02 | 0,53  | ± 0,06  |
| % d'azote          | 2,81  | ± 0,13 |  | 2,66                    | ± 0,38 | 2,54  | ± 0,13  |
| Tiges              |       |        |  |                         |        |       |         |
| Poids sec en g     | 13,93 | ± 4,53 |  | 14,05                   | ± 2,1  | 11,27 | ± 4,21  |
| % de coumarines    | 0,25  | ± 0,02 |  | 0,07                    | ± 0,00 | 0,18  | ± 0,02  |
| % d'azote          | 1,27  | ± 0,03 |  | 1,26                    | ± 0,1  | 1,2   | ± 0,09  |
| Feuilles           |       |        |  |                         |        |       |         |
| Poids sec en g     | 9,32  | ± 2,43 |  | 11,21                   | ± 1,49 | 5,08  | ± 1,69  |
| % de coumarines    | 1,7   | ± 0,08 |  | 0,6                     | ± 0,04 | 1,56  | ± 0,05  |
| % d'azote          | 4,49  | ± 0,13 |  | 4,45                    | ± 0,08 | 4,73  | ± 0,14  |
|                    | 112-4 |        |  | 45-4                    |        | 112-4 |         |
|                    |       |        |  |                         |        | 45-4  |         |

Figure 54 : Rendement en azote par organe et par plante

### *3.2.1.2.2.3 Relation entre la teneur en azote et la teneur en coumarines*

Suite à ces observations et en raison des relations possibles entre le métabolisme de l'azote et la synthèse de coumarines, il nous est paru intéressant de suivre l'évolution de la teneur en azote des différents génotypes et de tenter de la corréler à la teneur en coumarines.

La teneur en azote par plante est indépendante de la teneur en coumarines (**Figure 52**) : pour les plantes 112-4 (génotype à forte teneur en coumarines) ou 45-4 (génotype à faible teneur en coumarines), les teneurs en azote sont constantes, à une date et en un lieu donnés. Compte tenu du choix des échantillons analysés, il n'est pas possible de déterminer s'il existe un "effet date" ou un "effet site" sur la teneur en azote. Par contre, la **Figure 53** qui représente la teneur en azote en fonction du poids des plantes montre que, dans ce cas, la teneur en azote paraît indépendante du poids des plantes, à un âge et sur un site donnés. Dans le chapitre 2.1.2.2 sont présentées les courbes de dilution de l'azote dans la matière sèche. La liaison entre la teneur en azote et le poids sec n'existe que pour des plantes non stressées en azote, toutes choses étant égales par ailleurs (température, eau, autres facteurs). Les résultats obtenus semblent indiquer que les plantes récoltées ont subi un stress à l'origine de la réduction du poids de certaines d'entre elles. La nature de ce stress n'a cependant pas été identifiée.

*La teneur en azote des plantes entières est indépendante de la teneur en coumarines.*

Ainsi, à une date donnée, les génotypes 112-4 et 45-4 possèdent des teneurs identiques en azote alors que leurs teneurs en coumarines sont très différentes. Cependant, la teneur en azote n'est pas homogène dans la plante. Comme pour les coumarines, la teneur est forte dans les feuilles, faible dans les tiges et moyenne dans les racines (**Figure 54**).

*La teneur en azote total des plantes n'est pas un bon indicateur de la teneur en coumarines.*

SLATENSEK (1947) ne trouve pas de relation entre la fertilisation azotée et la teneur en coumarines. L'azote ne paraît donc pas être un facteur limitant de la synthèse de coumarines.



#### 3.2.1.2.2.4 Teneurs et rendements en coumarines par organes et par dates de récolte

La **Figure 55** représente l'évolution des teneurs et rendements en coumarines par niveau, à Colmar et la **Figure 56** par organe à Luttenbach, dans des plantes de génotype 112-4. Ces figures sont représentatives des 2 autres obtenues avec le génotype 45-4. Elles mettent en évidence que :

- la *teneur en coumarines diminue avec l'âge de la plante à chacun des deux cycles*. Ceci est lié à un phénomène de dilution dû à la diminution de la proportion des feuilles dans la plante au cours de son cycle et à leur vieillissement. Les feuilles de mélilot constituant le site principal de synthèse de coumarines, elles déterminent en grande partie la teneur en coumarines de la plante entière ;

- la *teneur en coumarines du mélilot diminue avec le niveau dans la plante*, ceci comme dans le cas de l'azote. Ce phénomène peut être lié soit au vieillissement des feuilles des niveaux inférieurs, soit à l'effet d'ombrage qui provoque une modification de la qualité de la lumière (l'augmentation du rouge sombre pouvant induire des modifications métaboliques).

Ainsi pour récolter du mélilot à plus de 0,9% en coumarines, il faut récolter le niveau N3 (parties aériennes supérieures à 60 cm) des plantes soit fin juillet la première année de culture, soit fin mai la seconde année. A cette dernière date, le rendement en coumarines est supérieur. C'est d'ailleurs la période de récolte préconisée par la pharmacopée (ANNEXE 1) ;

- une *forte teneur en coumarines* (de l'ordre de 1,8%) *est également trouvée dans les fleurs*. Deux hypothèses peuvent être posées pour expliquer cette forte concentration :

- \* soit une synthèse importante de coumarines dans cet organe. En effet, le rapport GOHCA *trans*/ coumarine libre est élevé dans les organes reproducteurs ; par ailleurs, à une date donnée, (21/06/94 par exemple), alors que leur proportion en poids sec est la plus importante dans la plante, ces organes possèdent une forte teneur en coumarines ;

et / ou,

- \* soit une migration importante des coumarines des feuilles vers les organes reproducteurs. Ceux-ci sont peu actifs d'un point de vue photosynthétique et sont considérés comme des "puits forts" dans le cas du métabolisme primaire. Les coumarines présentes dans le mélilot sous forme de glucosides pourraient se comporter comme des glucides et migrer dans le flux de métabolites primaires pour venir alimenter les graines. En effet, le 21/06/94, quand les plantes sont en phase de



Figure 56 : Evolution de la teneur et du rendement en coumarines à Luttenbach par organe

(génotype 112-4)

remplissage des grains, les coumarines seraient encore synthétisées dans les feuilles puis migreraient par les tiges vers les organes reproducteurs. Contrairement à ce qui se passe dans les racines, le GOHCA *trans* qui migrerait ne serait pas isomérisé. Cette hypothèse est possible en raison à la fois de la courte distance à parcourir pour le GOHCA *trans* des feuilles aux organes reproducteurs et en raison des flavonoïdes, présents dans les fleurs et faisant écran aux U.V. (CHAPPEL et HAHLBROCK ; 1984) ;

- les tiges qui représentent une forte proportion de la masse de la plante contiennent très peu de coumarines. Il est plausible d'émettre l'hypothèse que, dans cet organe, l'éventuelle synthèse d'acides cinnamiques (précurseur potentiel des coumarines) est préférentiellement orientée vers la voie de synthèse des lignines (présentes en forte proportion dans les tiges) ;

- *l'évolution du rendement en coumarines dans la plante la première année de culture vient clairement confirmer l'hypothèse de départ :*

*les coumarines synthétisées dans les feuilles migrent dans les racines la première année de culture.*

Au cours du cycle de première année de la plante, le compartiment foliaire (source des coumarines) diminue au profit du compartiment racinaire (puits de coumarines). Ce **phénomène de migration** est indépendant du poids de la plante mais est lié à sa morphologie (rapport entre les organes "puits" et "sources"). Les racines sont un "puits fort" pour une grande partie des coumarines synthétisées. Le **flux de coumarines vers les racines** est un phénomène linéaire la première année de culture. Le flux moyen est identique sur les 2 sites, soit 0,02 mg de coumarines par jour et par gramme de matière sèche de plante, pour le génotype 112-4 à forte teneur en coumarines.

Le 27/7/93 à Colmar, les racines pèsent 11,7 g pl<sup>-1</sup> et possèdent une teneur en coumarines de 0,5%. Trois mois après, (le 19/10/93), leur poids moyen avoisine les 36 g et elles contiennent 0,6% de coumarines. En fait, le compartiment racinaire ("puits") triple alors que la teneur en coumarines reste pratiquement stable. Il y a eu **migration à la fois de coumarines et de métabolites primaires de structure, des organes "source" vers les organes "puits"**, provoquant l'augmentation du poids racinaire. Le très faible pourcentage de GOHCA *trans* (toujours inférieur à 0,01%) vient pratiquement éliminer l'hypothèse d'une synthèse dans cet organe.

Afin de tenter de valider ce phénomène, nous avons cultivé *in vitro* des racines isolées de mélilot. Bien que placées dans des conditions très différentes de celles de la culture au champ, les résultats de cette expérimentation permettront d'infirmer ou de confirmer l'hypothèse

| Culture          | Poids frais (g)<br>mis en culture | Poids frais (g)<br>récolté | %GOHCA<br><i>trans</i> | % coumarine<br>libre | Somme |
|------------------|-----------------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------|-------|
| <b>Lumière</b>   | 0,054                             | 0,539                      | 0                      | 0                    | 0     |
| <b>Obscurité</b> | 0,018                             | 5,057                      | 0                      | 0,01                 | 0,01  |

Tableau 8 : Rendement en poids frais et teneur en coumarines de racines isolées de mélilot de génotype 112-4 cultivées *in vitro* (durant 77 jours).



A B

Figure 57 : Culture de racines de mélilot à la lumière (A) et à l'obscurité (B)

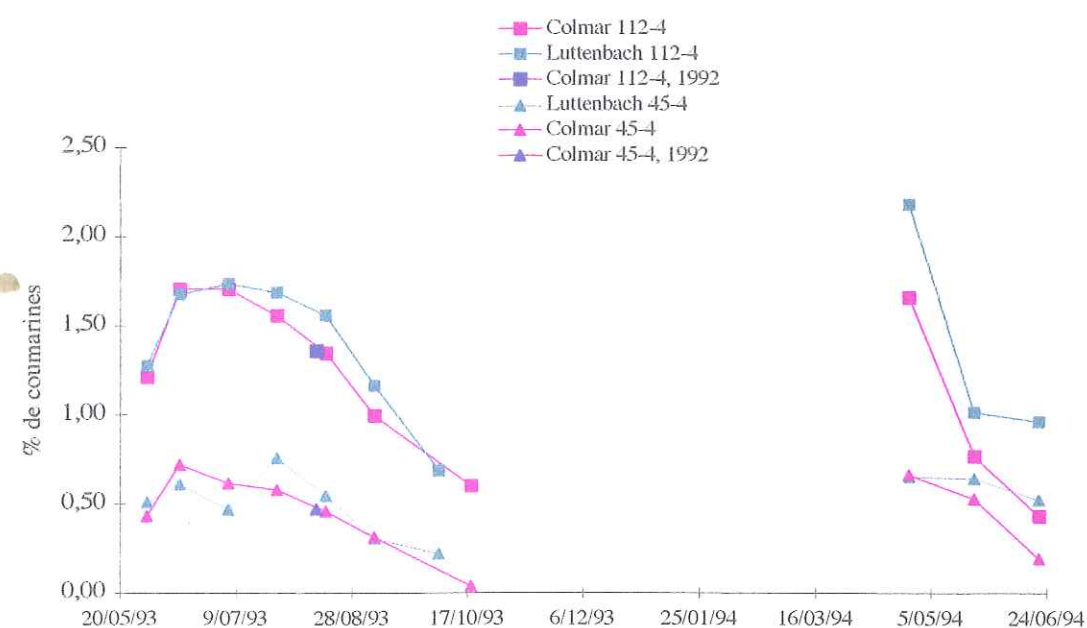
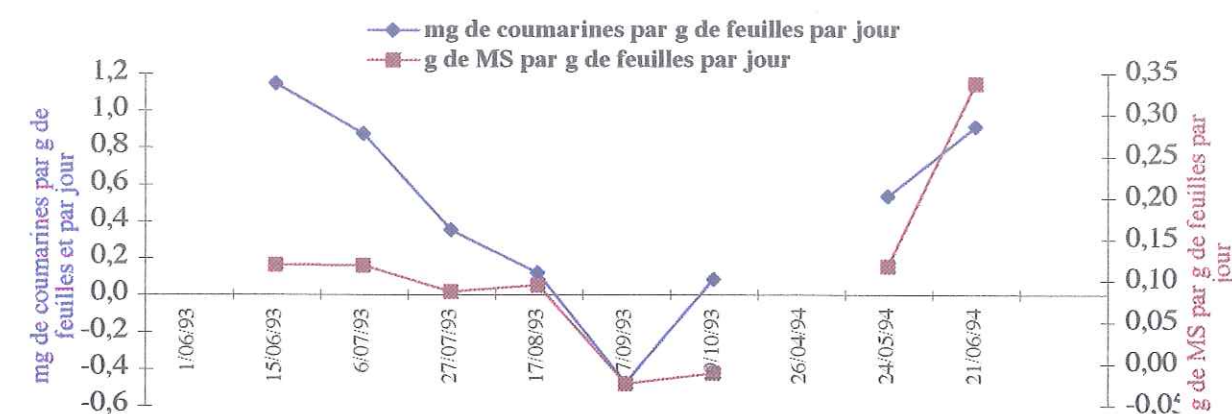


Figure 58 : Relation entre la teneur en coumarines des feuilles des plantes 112-4 et 45-4 par date de récolte et par site

Colmar plantes de géotype 112-4



Luttenbach plantes de géotype 112-4

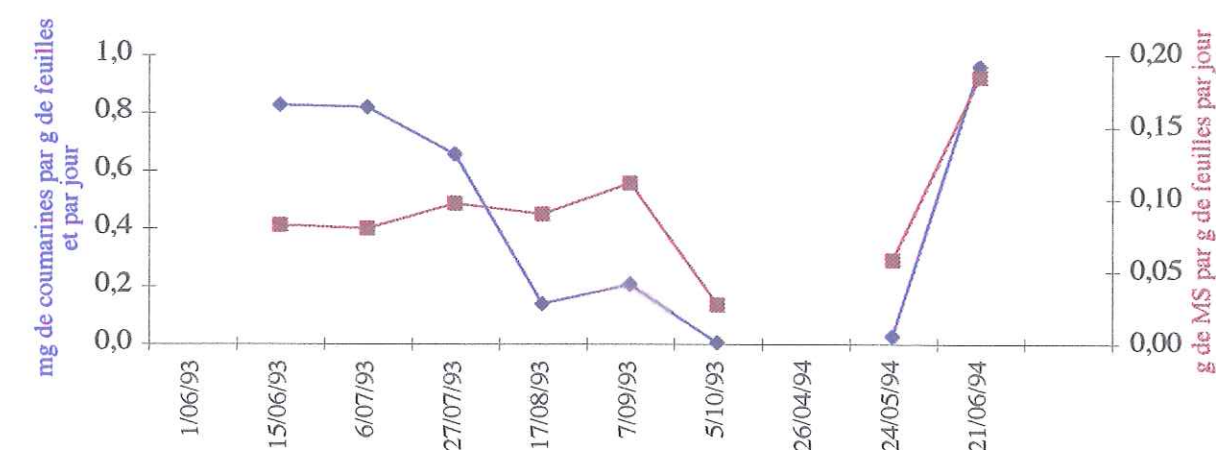


Figure 59 : Evolution de la production de matière sèche et de la teneur en coumarines par les feuilles par jour

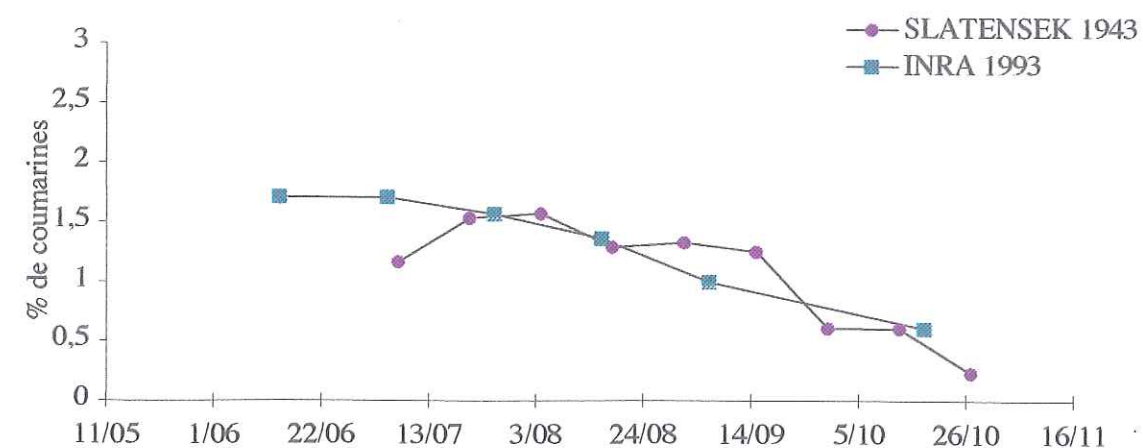


Figure 60 : Comparaison entre la teneur en coumarines des feuilles obtenues par SLATENSEK (1947) en 1943 et à l'INRA en 1993

précédemment posée, c'est-à-dire l'incapacité des racines du mélilot à synthétiser des coumarines.

Les expériences menées en culture *in vitro* de racines isolées de mélilot, à la lumière et à l'obscurité (**Tableau 8**), n'ont pas permis de produire des coumarines. En fait, les racines isolées poussent très peu à la lumière alors qu'elle se développent très bien à l'obscurité (**Figure 57**). Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par WEYGANT et WENDT (1959) qui ont conclu à la synthèse de coumarines dans les racines. Il est probable que, dans ce dernier cas, la présence de coumarines soit liée à leur migration des parties aériennes aux racines et ce, avant la mise en culture.

|                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><i>Les racines ne synthétisent pas de coumarines ni in situ ni in vitro.</i></p> |
|-------------------------------------------------------------------------------------|

Deux raisons majeures peuvent être avancées :

- ces organes ne disposent pas du potentiel enzymatique nécessaire à la synthèse de tels composés ;
- cette synthèse nécessite de la lumière, mais *in vitro* celle-ci inhibe leur croissance.

En dehors des contraintes imposées par la pharmacopée, l'exploitation des racines n'est pas envisageable en raison des difficultés de récolte et en raison des teneurs toujours relativement faibles constatées dans cet organe.

La **Figure 58** met en évidence la bonne corrélation existant entre les deux sites en 1993 en ce qui concerne la teneur en coumarines des feuilles d'un génotype donné, à une date donnée. De plus, la teneur en coumarines des feuilles des génotypes 112-4 et 45-4 récoltées dans le cadre du premier essai "dissection", positionnée sur ce graphique, vient confirmer le phénomène. Ainsi, plus les feuilles vieillissent, plus elles perdent leur capacité à synthétiser des coumarines. Ce phénomène est également mis en évidence sur la **Figure 59** qui présente pour la plante du génotype 112-4, sur les deux sites de culture :

- l'évolution de la production journalière de coumarines par les feuilles,
- la production journalière de matière sèche par les feuilles.

Ces graphiques mettent en évidence l'évolution similaire de la production de matière sèche et de la synthèse de coumarines par les feuilles. Les valeurs obtenues le 19/10/93 à Colmar peuvent s'expliquer par la concentration des coumarines dans la racine et la perte des feuilles à l'automne.

Ainsi, comme l'ont affirmé GELCINSKAJA et BORDUNOVA (1936), ce sont les organes jeunes et actifs (feuilles, bourgeons...) qui contiennent les teneurs les plus élevées de coumarines dans la plante. L'évolution de leur teneur dans les feuilles, au cours du cycle de développement du mélilot, telle que décrite par SLATENSEK (1947) est comparable à celle que nous avons obtenue. Nous avons tenté de superposer les deux résultats d'expérimentation (**Figure 60**). Ne

## Feuilles = Source de coumarines

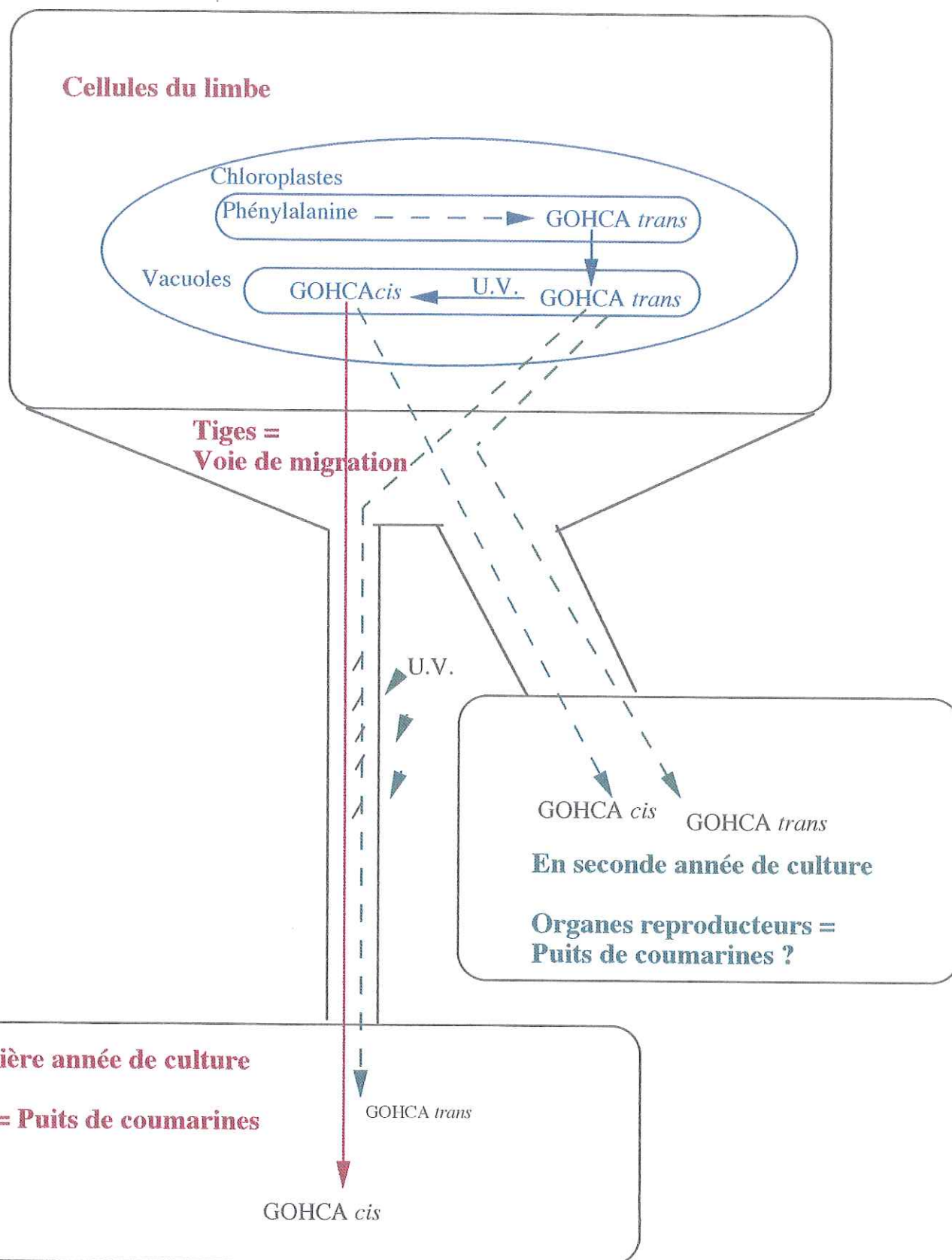


Figure 61 : Schéma de synthèse des connaissances bibliographiques (bleu) ou acquises dans le cadre de ces expérimentations (rose) et les hypothèses soulevées (vert)

connaissant ni le génotype des mélilots étudiés en 1947, ni la somme des températures reçues par les plantes aux différentes dates de récolte, il s'avère difficile de "caler" cette courbe de façon précise sur notre courbe de référence.

### 3.2.1.2.3 Conclusion

Un schéma tentant de rassembler les connaissances acquises et les interrogations restantes est présenté **Figure 61**. Sur ce schéma sont représentés à la fois les résultats décrits dans la littérature (en bleu), les phénomènes mis en évidence dans le cadre de cette étude ou confirmés (en rose) ainsi que les hypothèses soulevées (en vert ).

La phénylalanine entre dans les chloroplastes où elle est transformée en acide cinnamique *trans* puis ortho-hydroxylée en acide ortho hydroxycinnamique et glucosylée. Le GOHCA *trans* est isomérisé dans les vacuoles sous l'action des U.V. Si le GOHCA *trans* migre vers les racines, il est pratiquement totalement isomérisé avant l'arrivée sur son site de stockage. Le GOHCA *cis* pourrait migrer et être stocké avec les autres glucides de réserve. Si l'on effectue une comparaison de ce mécanisme avec le métabolisme primaire, ce sont donc

*les feuilles (plus particulièrement le limbe) qui sont les organes "source" de coumarines alors que les racines (et les fruits?) constituent des organes "puits" respectivement en fin de première et seconde années de culture.*

Il est donc possible de dire que

*la teneur en coumarines d'une plante est principalement fonction :*

- de son *génotype*,
- de son *âge*. L'âge de la plante détermine la proportion de ses différents organes et donc la teneur en coumarines de la plante entière.

Cette constatation nous amène donc à remettre en cause les protocoles classiquement utilisés pour étudier la variabilité génétique. Ainsi, comparer les populations au stade floraison peut constituer une source d'erreur. En effet, les plantes devraient plutôt être comparées lorsqu'elles ont un même âge. Cependant, la sélection à partir d'une seule récolte effectuée à un âge donné risquerait de favoriser des génotypes précoces. Pour comparer des populations de façon plus rigoureuse, il est proposé d'effectuer plusieurs récoltes (trois par origine) à des âges et des stades pouvant se "recouper" afin de définir leur potentiel réel de production.

Cette étude sur la synthèse et la migration des coumarines dans le mélilot a permis :

- de *confirmer certaines connaissances acquises ou controversées* dans la bibliographie :

- \* synthèse des coumarines dans les feuilles ;
- \* aucune synthèse de coumarines dans les racines ;

- de *mettre en évidence*:

- \* que la teneur en coumarines est liée à l'âge de la plante ;
- \* l'existence de mécanismes de migration des coumarines dans le mélilot : migration des coumarines des parties aériennes vers les racines la première année et vraisemblablement des feuilles vers les fruits la seconde année de culture. Ces mécanismes ne pourront être clairement démontrés que par un suivi de molécules marquées dans la plante ;

- *d'émettre des hypothèses concernant l'influence de certains facteurs environnementaux sur la teneur en coumarines du mélilot* :

- \* la lumière stimulerait la synthèse de coumarines ;

- de *construire de nouveaux axes de recherche* en vue d'augmenter les teneurs et rendements en coumarines du mélilot :

- \* mise en place d'un itinéraire technique favorisant la récolte d'organes jeunes (semis de printemps, plusieurs coupes,...) et permettant d'avoir une plus grande proportion de limbes et d'organes reproducteurs.

Lorsque les producteurs de mélilot sont rémunérés au kilogramme de matière sèche (de l'ordre de 10F Kg<sup>-1</sup> en 1995), ils ont pour unique objectif de produire un rendement maximal en matière sèche. D'autres conditions tendent à se développer, pour lesquelles la rémunération est fonction de la teneur en principes actifs. Cela implique alors à la fois la maîtrise des facteurs déterminant la qualité mais aussi des techniques culturales permettant une bonne production de matière sèche. Dans ce cas, il est nécessaire de :

- travailler avec *des variétés à forte teneur en coumarines*,

- *pratiquer les techniques agronomiques* :

- \* *favorisant le développement des organes de synthèse* (feuilles) et limitant la production d'organes dans lesquels a lieu une dilution (tiges) en intervenant sur la densité de peuplement, la fertilisation, l'irrigation ... ;

- \* *positionnant la date et la hauteur de coupe* afin de récolter des organes jeunes et physiologiquement actifs et *avant la migration des coumarines dans les racines* ;

- \* *permettant l'augmentation du rendement en matière sèche*.

Par conséquent, nous allons étudier dans un premier temps l'effet sur le rendement en coumarines de la date et la densité de semis puis des modalités de gestion de la parcelle par coupes successives.

| Influence de la lumière          | Qualité +<br>Quantité                                                                                     | Quantité                                                                   | Qualité                                                                                             |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| essais mis en place :            | Densité                                                                                                   | Ombrage                                                                    | Filtres : influence du rouge, rouge sombre et bleu                                                  |
| limites de ces expérimentations: | difficultés de dissocier les effets du vieillissement de la plante des effets de la qualité de la lumière | difficultés de dissocier le métabolisme primaire du métabolisme secondaire | difficultés d'obtenir une quantité de lumière suffisante pour une bonne production de matière sèche |

Tableau 9 : Synthèse des hypothèses posées concernant l'influence de la lumière sur la synthèse de coumarines et des expérimentations à mettre en place pour les éprouver.

### 3.2.2 INFLUENCE DE LA DENSITÉ DE PEUPLEMENT SUR LA SYNTHÈSE DE COUMARINES

#### *Objectifs :*

- *Tester l'influence de la densité de peuplement sur la teneur et le rendement en coumarines par plante et par unité de surface en vue de :*
  - \* *choisir une densité optimale en culture,*
  - \* *tenter de déterminer l'influence de la qualité de la lumière sur la synthèse de coumarines.*
- *Valider les propositions obtenues sur repiquage de printemps dans le cadre de l'essai synthèse et migration des coumarines, par des résultats sur semis d'automne.*

La densité de peuplement est un facteur qui intervient à la fois sur la morphologie des plantes, le rendement en matière sèche par hectare (MERREIN, 1983 ; HAY et WALKER, 1989) et parfois même sur la teneur en principes actifs (YAMADA, 1983 ; CHUNG, 1990 ; VANHAELEN, 1991). Les expérimentations mises en place visent à répondre à plusieurs questions.

La première d'ordre appliqué concerne la détermination de la densité de peuplement en vue de produire un rendement maximum en coumarines.

La seconde a pour but d'approfondir nos connaissances des facteurs régulant la synthèse de coumarines. Certains varient en fonction de la densité de peuplement, en particulier *la quantité et la qualité de lumière* (Tableau 9). En effet, plusieurs éléments nous amènent à poser l'hypothèse d'une régulation de la synthèse de coumarines par la lumière, à savoir :

- une forte teneur en coumarines dans les limbes des feuilles qui constituent des organes photosynthétiquement très actifs (influence de la *quantité* de lumière) ;
- une teneur faible en coumarines dans les feuilles de niveau inférieur (influence de la *qualité* de lumière).

Les variables constituées par la structure des plantes (hauteur, nombre de ramifications, proportion de chacun des organes), et les teneurs et rendements en coumarines ont été suivies au cours du développement de la plante.

#### 3.2.2.1 MATÉRIEL ET MÉTHODES

##### Choix des sites expérimentaux

L'essai sur semis d'automne a été mis en place à Luttenbach, celui sur repiquage de printemps dans un châssis sur le site de l'INRA de Colmar.

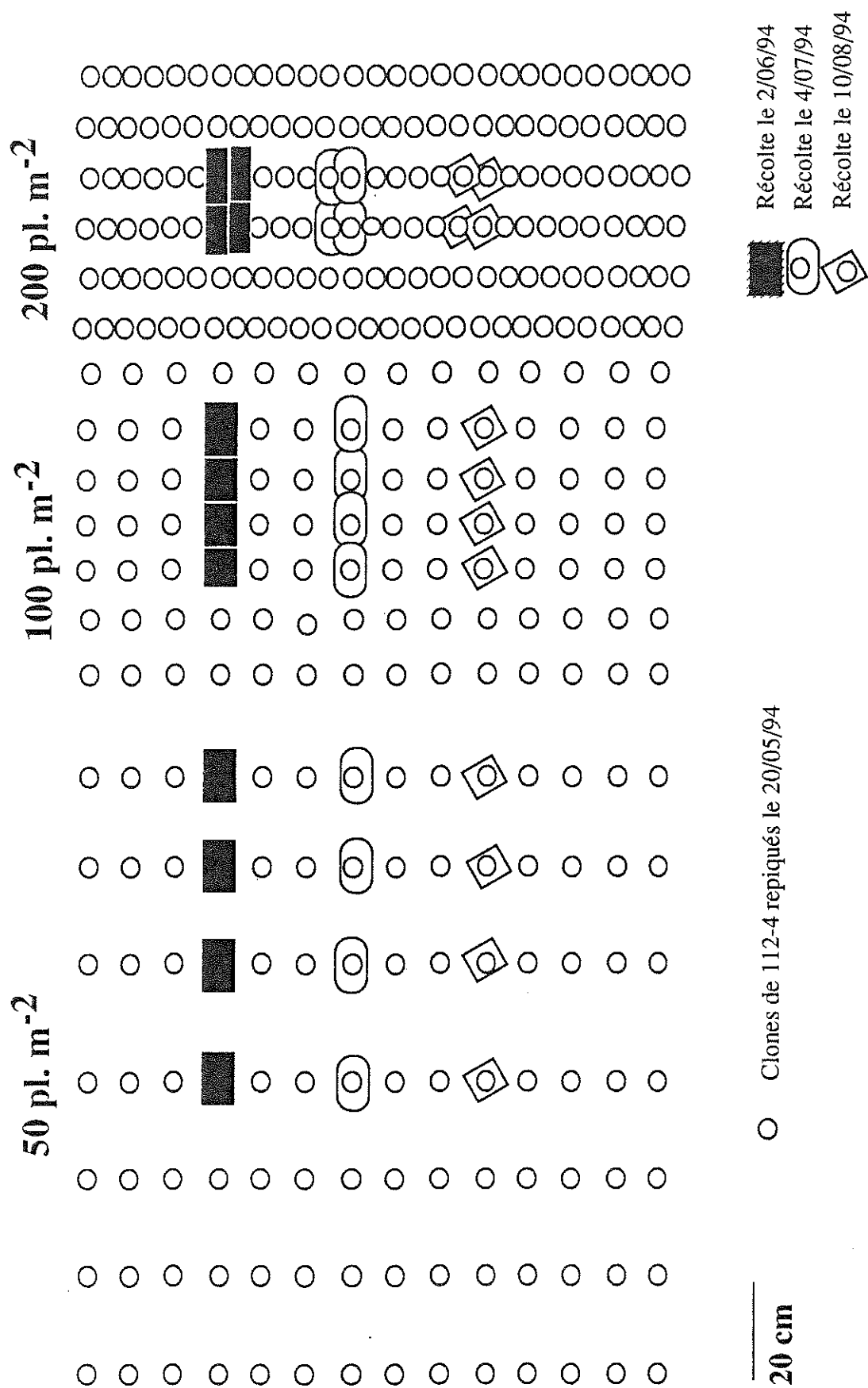


Figure 62 : Dispositif expérimental de l'essai "densité" sur repiquage de printemps

## Choix du matériel végétal et du dispositif expérimental

### **\* Semis d'automne**

Des graines issues de l'autofécondation du génotype 112-4 ont été scarifiées et semées le 18/08/93 à 20 Kg ha<sup>-1</sup> : 4 blocs de 4 lignes de 20 m de long ; entre blocs, 60 cm ; entre lignes, 20 cm. Le démariage\* des plantes pour obtenir une densité de 50, 100 et 150 pl. m<sup>-2</sup> a eu lieu le 25/03/94.

Trois récoltes de 4 x 7 plantes ont été effectuées aux dates suivantes :

- le 13/06/93
- le 28/06/94
- le 12/07/94.

### **\* Repiquage de printemps**

300 plantes de 112-4 issues de culture *in vitro* racinées et possédant 4 à 5 feuilles ont été sevrées le 28/04/94 en serre et repiquées le 20/05/94 dans un châssis à Colmar. Les plantes ont été repiquées et récoltées suivant le dispositif présenté **Figure 62**.

Trois récoltes de 4 x 1 plante ont été effectuées pour chacune des densités (50, 100 et 200 pl. m<sup>-2</sup>) aux dates suivantes :

- le 2/06/94 : dissection par organes, sans différencier les niveaux,
- le 4/07/94 : dissection par organes et par niveaux N1 et N2,
- le 10/08/94 : dissection par organes et par niveaux N1, N2 et N3.

Dans le cadre de cet essai, des mesures de PAR\*\* sont effectuées régulièrement à différents niveaux du couvert pour chacune des densités à l'aide d'un quantomètre (MACAM PHOTOMETRICS LIMITED LIVINGSTONE, SCOTLAND). Une trentaine de mesures ont été effectuées à chaque date (le 30/05/94, le 22/06/94 et le 9/08/94), par niveau dans le couvert et par densité. Les mesures sont effectuées une journée sans nuage au midi solaire. Les données obtenues sont exprimées en  $\mu\text{Einstein} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Dans le cas de ces deux essais "densité", chaque plante étudiée est prélevée entièrement (racines comprises) et mesurée. Le nombre des ramifications primaires est compté puis les plantes sont disséquées par organes et par niveaux lorsqu'elles mesurent plus de 60 cm.

Les étapes de séchage, broyage, extraction et dosage sont effectuées comme décrites précédemment (cf. 3.2.1.1.1 essai 2) .



\* les analyses de variances (ANOVA) sont effectuées séparément pour chacune des trois dates de récolte

### 3.2.2.2 RÉSULTATS

#### 3.2.2.2.1 Influence de la densité en semis d'automne

Les principaux résultats sont synthétisés dans les **Figure 63** et **Figure 64**, l'ensemble des résultats est présenté en Annexe 17. Dans cet essai, une répétition correspond à la dissection de 7 plantes. En effet, ces plantes étant issues de graines provenant de l'autofécondation du mélilot de génotype 112-4, il existe encore une certaine variabilité génétique entre les plantes.

##### 3.2.2.2.1.1 Stade et poids des plantes en fonction de la date de récolte et de la densité

La **Figure 63** présente la proportion d'organe par plante, le poids par organe par densité et par date de récolte et le rendement en matière sèche.

*Le 13/06/94*, les mélilots sont en début de floraison. Les organes reproducteurs sont constitués des bourgeons et des jeunes inflorescences. Les plantes mesurent toutes environ 1 m et pèsent de l'ordre de 7 g pour les densités 50 et 100 pl. m<sup>-2</sup> alors que pour la densité 150 pl. m<sup>-2</sup>, le poids par plante est inférieur (5,5 g). A cette date, à cette forte densité, il y a donc un phénomène de **compétition** qui s'exprime par un poids plus faible par plante. Ce déficit est compensé par le nombre de plantes par unité de surface lorsque l'on raisonne en rendement par m<sup>2</sup>. Dans ce cas, les densités 100 et 150 pl. m<sup>-2</sup> permettent de produire la même biomasse (environ 780 g m<sup>-2</sup>). A cette date, la proportion entre les différents organes des plantes est pratiquement identique quelle que soit la densité.

*Le 28/06/94*, les mélilots sont en pleine floraison et mesurent environ 1,2 m. La concurrence entre plantes est importante aux fortes densités. Le phénomène de compétition est déjà mis en évidence à la densité de 100 pl. m<sup>-2</sup>. Les mélilots cultivés à 50 pl. m<sup>-2</sup> pèsent presque le double de ceux cultivés à 150 pl. m<sup>-2</sup>. La proportion entre organes s'est modifiée par rapport à la date précédente mais reste constante aux différentes densités testées. La proportion de feuilles et de tiges diminue au profit des organes reproducteurs. Le rendement est maximal pour 150 pl. m<sup>-2</sup>.

*Le 12/07/94*, les plantes sont au stade "fin floraison" - "début de la formation des graines". A 150 pl. m<sup>-2</sup>, les mélilots cultivés sont plus petits du fait de la forte compétition entre les plantes. Cependant, ces plantes paraissent légèrement plus vertes et plus actives d'un point de vue physiologique que celles des densités 50 et 100 pl. m<sup>-2</sup> qui se dessèchent. En effet, à cette date, les mélilots commencent à dépérir, les feuilles des niveaux inférieurs (1 et 2) sont tombées. Plus de 50% du poids de la plante est constitué de tiges ligneuses et sèches. Le **compartiment "fleurs"** de la plante **est nettement plus développé aux faibles densités**. En effet, le nombre de ramifications est plus important lorsque les plantes sont plus espacées car, dans ce cas, le rapport rouge clair/ rouge sombre est plus élevé. **Cependant, le rendement en graines par unité de surface est le plus important à 100 pl. m<sup>-2</sup>.**



*Pour faire de la production de graines, il est conseillé de semer à 100 pl. m<sup>-2</sup>.*

Le rendement en matière sèche par m<sup>2</sup> est fonction de la densité de semis. Cependant comme montré précédemment dans la bibliographie à la Figure 7, la relation entre la production de matière sèche par unité de surface et la densité atteint un optimum ; c'est ce qui semble se passer à la fin du cycle de la plante pour les densités 100 et 150 pl. m<sup>-2</sup> où le rendement se stabilise autour de 10 T ha<sup>-1</sup>.

#### *3.2.2.2.1.2 Teneur en coumarines en fonction de la date de récolte et de la densité*

*Quelle que soit la date de récolte, il n'apparaît pas de différence significative des teneurs en coumarines en fonction des densités (Figure 64), à l'exception du 12/07/94 à 150 pl. m<sup>-2</sup> où la teneur en coumarines est légèrement supérieure. En effet, à cette densité, les plantes continuent à avoir une activité physiologique ; chacun de leurs organes possède une teneur en coumarines supérieure à celles obtenues sur des plantes cultivées à des densités inférieures. Les feuilles continuent à synthétiser des coumarines.*

Ces résultats obtenus sur semis d'automne viennent confirmer ceux acquis précédemment dans le cadre de l'essai "synthèse et migration" en repiquage de printemps. Ainsi nous pouvons constater :

- *une diminution de la teneur en coumarines dans la plante entière et dans les parties aériennes au cours du développement ;*
- *que la teneur en coumarines est indépendante du poids de la plante mais directement corrélée à son âge.* Les écarts types liés aux poids des plantes sont très importants alors que ceux concernant la teneur en coumarines sont faibles ;
- *une liaison entre la teneur en coumarines et le niveau dans le couvert végétal, ce phénomène étant plus particulièrement marqué dans les feuilles. Plus le niveau dans le couvert est élevé, plus la teneur en coumarines est forte.* De plus, les résultats obtenus à un même âge (le 13/06/94) laissent penser que la diminution de la teneur en coumarines dans le couvert végétal est *lié à un phénomène d'auto-ombrage* : les feuilles des niveaux N1 et N2 des plantes cultivées à 150 pl. m<sup>-2</sup> possèdent une teneur en coumarines plus faible que celles des mêmes plantes cultivées à des densités plus faibles ;
- *une forte teneur en coumarines dans les organes reproducteurs* (jusqu'à 3,7%) dont 28% de GOHCA *trans* au début de la floraison pour toutes les densités.



### 3.2.2.2.1.3 Rendement en coumarines en fonction de la date de récolte et de la densité

Le rendement en coumarines par m<sup>2</sup> est nettement lié à la densité. En effet, la teneur moyenne en coumarines étant pratiquement stable aux différentes densités testées, le rendement en coumarines est directement fonction du rendement en matière sèche par unité de surface.

Il apparaît à la première date de récolte aux fortes densités (100 à 150 pl. m<sup>-2</sup>), un important rendement en coumarines dans les feuilles, celui-ci diminuant au cours du développement de la plante alors que le rendement en coumarines des organes reproducteurs augmente.

Le suivi du rendement en coumarines par plante à une densité de 150 pl. m<sup>-2</sup> aux 3 dates de récolte :

- met en évidence qu'il n'y a plus de synthèse en coumarines entre le 13/06/94 et le 12/07/94 ou que celle-ci est compensée par une perte (feuilles tombant à terre) ;
- permet, comme précédemment dans le cadre de l'essai "synthèse et migration" des coumarines sur repiquage de printemps, de poser deux hypothèses :

- *une migration des coumarines (dont le GOHCA trans) des feuilles vers les organes reproducteurs.* La concentration importante trouvée dans ces organes (jusqu'à 3%) implique qu'ils possèdent une "force de puits" élevée. Cependant, dans le cas de la migration des coumarines la première année de culture vers les racines, le GOHCA trans n'était pas mobilisé ou était isomérisé avant d'atteindre les racines, alors que dans ce cas, il migrerait dans les organes reproducteurs avec le GOHCA cis ;

et /ou

- *une synthèse de coumarines dans les organes reproducteurs.* Mais le fait que le rendement en coumarines soit constant ou diminue entre la première et la dernière date de récolte implique que la synthèse de coumarines soit *compensée totalement par des pertes en coumarines* des feuilles tombées au sol. Cette hypothèse est peu plausible dans la mesure où les feuilles sénescentes sont celles des niveaux inférieurs (possédant une teneur en coumarines assez faible). Cependant, celles-ci n'ayant pas été récoltées et dosées, il n'est pas possible de conclure définitivement. Nous allons cependant tenter une approximation des pertes en coumarines liées à la chute des feuilles. Pour cela, nous calculons les pertes en coumarines dans le compartiment "feuille" entre le 13/06/94 et le 28/06/94 et entre le 28/06/94 et le 12/07/94 et les comparons à celles de la plante entière.

La perte en coumarines attribuée à la chute des feuilles serait dans ce cas :

- pour la première période (entre le 13/06/94 et le 28/06/94) de 10,66 mg pl<sup>-1</sup>,
- pour la seconde période de 4,06 mg pl<sup>-1</sup>.

Alors que la perte en coumarines dans la plante entière est :

- nulle pour la première période,
- de 6,3 mg pl<sup>-1</sup> pour la seconde période.

Ces derniers calculs tendent à confirmer l'hypothèse d'une migration des coumarines des feuilles vers les organes reproducteurs. Cependant, celle-ci ne pourra être validée que par le suivi de molécules marquées.

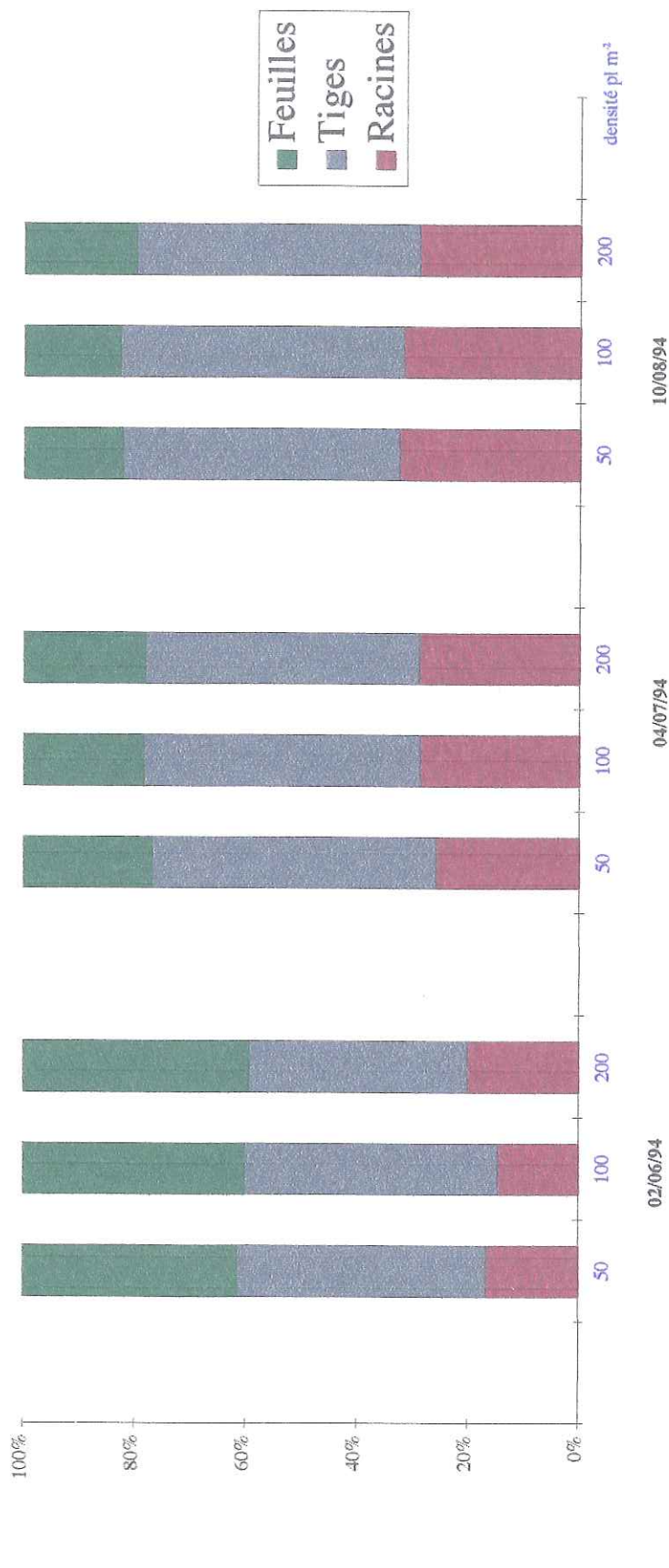
Dans l'étude précédente menée sur des plantes repiquées au printemps la première année, les coumarines migraient des parties aériennes vers les racines. Dans ce cas, les plantes étudiées sont en seconde année de culture, il n'y a plus de stockage d'assimilats dans les racines. ***Le puits le plus actif de la plante semble alors être les organes reproducteurs.***

Si l'on retient l'hypothèse d'une migration des coumarines des feuilles vers les fruits, le flux de coumarines entre les deux premières dates de récolte serait de l'ordre de 0,08 mg de coumarines par jour et par gramme de matière sèche de plante. Il est quatre fois supérieur au flux calculé entre les feuilles et les racines sur repiquage de printemps (cf. 3.2.1.2.2.4). Cette constatation pourrait éventuellement expliquer la forte proportion de forme *trans* du GOHCA dans les bourgeons. Le GOHCA *trans* plus rapidement mobilisé serait moins vite isomérisé en raison :

- de la rapidité du trajet entre les feuilles et les fruits,
- de la surface réduite des organes reproducteurs.

En effet, la réaction d'isomérisation est fonction de la quantité d'U.V. reçue par surface de plante. Une autre hypothèse susceptible d'expliquer ce phénomène est liée à la présence dans le mélilot de flavonoïdes pouvant jouer le rôle de protecteur d'U.V.

En ce qui concerne le rapport "% de GOHCA *trans* / coumarines", il décroît au cours de cette partie du cycle de la plante. Il est le 28/06/94 de l'ordre de 17% dans les bourgeons alors qu'il est de 15% dans la plante entière et passe le 12/07/94 à 9 % dans les bourgeons et 12 % dans la plante entière. Pour une densité de 150 pl. m<sup>-2</sup>, ce rapport est stable (respectivement de 16 % et 15 %) ce qui s'explique par le fait que la plante est encore physiologiquement active et poursuit la synthèse de coumarines.



| Hauteur en cm           | 02/06/94        | 04/07/94       | 10/08/94        |  |
|-------------------------|-----------------|----------------|-----------------|--|
| Nombre de ramifications |                 |                |                 |  |
| POIDS SECS              |                 |                |                 |  |
| Plante entière en g     | 50,00 ± 7,07    | 53,75 ± 4,79   | 47,5 ± 2,89     |  |
| ANOVA* plante entière   | 10,00 ± 1,83    | 11,25 ± 1,26   | 13,00 ± 1,41    |  |
| Parties aériennes       | 7,23 ± 3,96     | 7,51 ± 2,92    | 1,94 ± 0,7      |  |
|                         | 6,03 ± 3,44     | 6,42 ± 2,59    | 1,55 ± 0,43     |  |
| Racines                 | 1,2 ± 0,61      | 1,09 ± 0,37    | 0,39 ± 0,33     |  |
| Tiges                   | 3,24 ± 1,94     | 3,42 ± 1,39    | 0,76 ± 0,23     |  |
| Feuilles                | 2,79 ± 1,3      | 3,00 ± 1,2     | 0,79 ± 0,21     |  |
| ANOVA* feuilles         |                 |                | ab              |  |
| RENDEMENT MS m²         |                 |                |                 |  |
| Plante entière          | 361,38 ± 107,94 | 750,5 ± 292,37 | 387,00 ± 139,65 |  |
| ANOVA* plante entière   | 301,5 ± 171,91  | 641,5 ± 248,55 | 209,5 ± 86,98   |  |
| Parties aériennes       |                 |                |                 |  |

Figure 65 : Proportion d'organes par plante par date de récolte et par densité

\* les analyses de variances sont effectuées par date de récolte

Sur le plan agronomique, nous pouvons conclure que :

*Parmi les trois densités et dates de récolte testées sur semis d'automne, il faut semer à 100 pl. m<sup>-2</sup> et récolter mi-juin au début de la floraison.*

Cette technique permet d'effectuer une récolte :

- de matériel végétal à forte teneur en coumarines (parties aériennes à 1,04%),
- avec un rendement en coumarines maximum (7,5g m<sup>-2</sup>).

Cependant, il aurait été intéressant d'étudier l'influence de la densité à une date de coupe plus précoce sur semis d'automne puisque cette technique permettrait d'effectuer une seconde voire plusieurs autres récoltes. Ce mode de récoltes multiples sera testé ultérieurement. De plus, l'influence de la densité sur le rendement en coumarines pour des plantes en première année du cycle végétatif a également été mesurée. Bien que cette technique de production ne réponde pas aux normes de la pharmacopée française de 1989 (utilisation des sommités fleuries), elle permet toutefois de récolter des plantes jeunes après une saison de culture.

#### 3.2.2.2.2 Influence de la densité en repiquage de printemps

Cet essai mis en place et suivi de manière plus fine que précédemment a pour objectif de déterminer l'influence de la densité sur la teneur et le rendement en coumarines par date de récolte sur des plantes repiquées au printemps. Des mesures de PAR ont été effectuées dans le but de tester l'hypothèse d'une relation éventuelle entre la teneur en coumarines dans le couvert et le PAR par niveaux.

##### 3.2.2.2.2.1 Stade et poids des plantes en fonction de la date de récolte et de la densité

La **Figure 65** représente le poids et la proportion d'organes dans la plante, par date de coupe, à chaque densité.

*Le 2/06/94*, les plantes sont à l'état végétatif et mesurent environ 50 cm. L'influence de la concurrence entre plantes est importante à 200 pl. m<sup>-2</sup>.

*Le 10/07/94*, il y a un effet marqué de la compétition pour la lumière dès 100 pl. m<sup>-2</sup>.

*Le 10/08/94*, environ 10 % des plantes sont en fleurs.

Les plantes se développent régulièrement durant les deux mois de l'étude. Il faut pourtant noter que le 2/06/94 à une densité de 100 pl. m<sup>-2</sup>, le poids des plantes paraît particulièrement élevé. Ce résultat est difficile à expliquer mais il est vraisemblablement la conséquence d'un biais

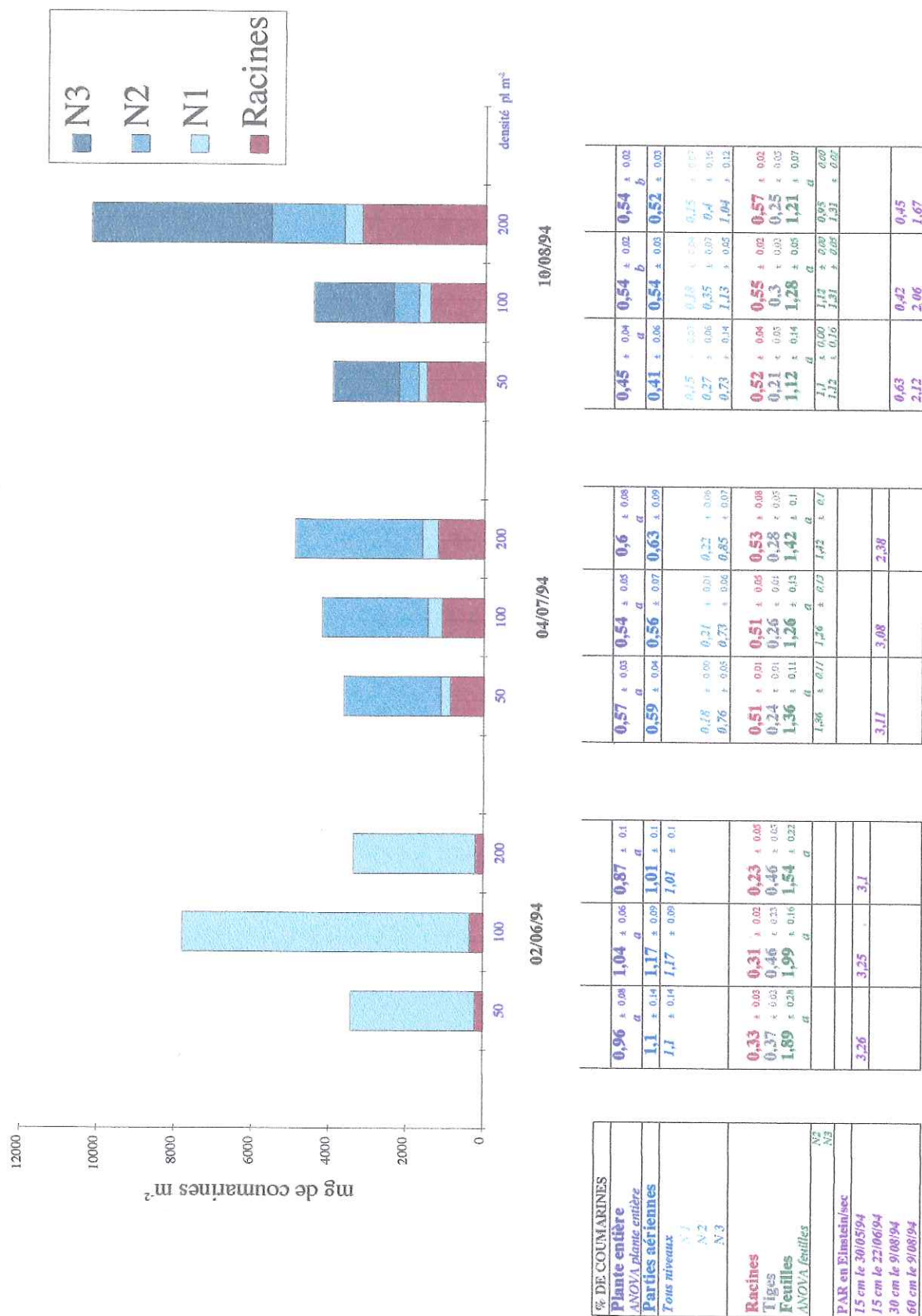


Figure 66 : Rendements et teneurs en coumarines par dates de récolte et par densité

\* les analyses de variances sont effectuées par date de récolte

expérimental, lié au dispositif choisi : les quatre plantes ont été prélevées non pas de façon aléatoire mais sur une même zone de terrain.

Cependant, même dans le cas de cette modalité, *la proportion entre organe est pratiquement stable quelle que soit la densité, à une date de récolte donnée*. Au cours de ces deux mois de culture, *le compartiment "feuilles" diminue en grande partie au profit du compartiment racinaire* alors que la hauteur des plantes est légèrement plus importante aux densités 50 et 100 pl. m<sup>-2</sup> dès juin. Ceci va à l'encontre des résultats trouvés dans la bibliographie. En effet, une densité élevée provoque généralement une croissance des plantes en hauteur, le rapport rouge sombre/rouge clair qui augmente dans le couvert ayant pour conséquence d'induire l'élongation des entre-nœuds. Dans cette étude, il y a bien une *élongation des entre-nœuds avec la densité mais le nombre d'entre-nœuds est inférieur à forte densité*. *La présence d'un facteur limitant le développement de la plante (stress hydrique, absence d'irrigation, déficit en azote...) pourrait en être la cause*. Ces facteurs limitants sont plus fortement exprimés à forte densité.

#### 3.2.2.2.2 Teneur en coumarines en fonction de la date de récolte et de la densité

La **Figure 66** représente le rendement en coumarines par niveaux.

Comme précédemment, il n'existe pas de différence significative de teneur en coumarines dans la plante entre densités, à une date donnée. La teneur en coumarines diminue au cours du temps dans les parties aériennes et augmente dans les racines.

*Le 02/06/94*, alors que la concurrence entre plantes est déjà importante pour 200 pl. m<sup>-2</sup>, les teneurs en coumarines des feuilles sont inférieures à celles des plantes à densité plus faible. Les mesures du 30/05/94 et du 22/06/94 montrent qu'à 15 cm de hauteur dans le couvert, le PAR est stable pour les deux premières densités alors qu'il diminue nettement à 200 pl. m<sup>-2</sup>.

*Le 4/07/94*, la teneur en coumarines est constante quoi que faible dans le niveau N1 pour les 3 densités testées tandis que le PAR diminue avec la densité.

*Le 9/08/94*, le PAR diminue avec le niveau dans le couvert. Il est approximativement identique pour 100 et 200 pl. m<sup>-2</sup> à 15 cm alors qu'à 60 cm, il est plus faible à 200 pl. m<sup>-2</sup>. Cependant, la teneur en coumarines du N1 est stable quelles que soient les densités, celle du N2 augmente avec la densité.

Il est donc difficile de conclure du fait des différences peu importantes du PAR entre densités (sont-elles suffisantes pour induire une modification de la synthèse de coumarines ?) et des faibles teneurs en coumarines présentes dans les niveaux inférieurs des plantes récoltées (sont-elles liées à un éventuel effet lumière et/ou âge ?).

### 3.2.2.2.3 Rendement en coumarines par m<sup>2</sup> en fonction de la date de récolte et de la densité

A 50 pl. m<sup>-2</sup>, le rendement en coumarines n'évolue pratiquement pas entre le 02/06/94 et le 10/08/94.

De la même manière, à 100 pl. m<sup>-2</sup>, le rendement en coumarines n'augmente pratiquement pas durant ces deux mois de culture, si l'on ne tient pas compte du résultat du 2/06/94 qui paraît être un artefact.

Par contre, à 200 pl. m<sup>-2</sup>, il y a un développement important des plantes entre le 2/06/94 et le 10/08/94, ce qui permet une augmentation notable du rendement en coumarines par unité de surface.

### 3.2.2.3 CONCLUSION

D'un point de vue appliqué, *la densité* :

- *n'a pas d'influence sur la teneur moyenne en coumarines, que ce soit sur semis d'automne ou repiquage de printemps.* En effet, dans ce cas, la densité n'intervient pas sur la proportion entre organes ;
- *intervient sur le poids, la hauteur et le nombre de ramifications des plantes.*

C'est pourquoi, il faut choisir en semis de printemps une densité forte (150 à 200 plantes m<sup>-2</sup>) afin d'augmenter le rendement en matière sèche par unité de surface. Des densités légèrement supérieures pourraient être testées, par exemple de l'ordre de 250 pl. m<sup>-2</sup> tout en sachant qu'une trop forte augmentation du peuplement en culture risque de poser des problèmes phytosanitaires ou agronomiques (risque de verse..).

Nos résultats viennent confirmer les données écophysiologiques acquises sur le mélilot notamment concernant la migration des coumarines des feuilles vers les racines la première année de culture et la forte teneur dans les organes reproducteurs.

Ils n'ont cependant pas permis de mettre en évidence une relation entre le PAR et la teneur en coumarines. Afin de tester de façon spécifique l'hypothèse d'une influence de l'intensité du rayonnement sur la synthèse de coumarines, nous pouvons, sur des plantes de même âge, faire varier le rayonnement par le biais d'ombrage.

### 3.2.3 INFLUENCE DE LA LUMIÈRE SUR LA SYNTHÈSE DE COUMARINES

De nombreuses études ont été menées concernant l'influence de la lumière (intensité, photopériode, qualité) sur la teneur en métabolites secondaires de différentes espèces. Ainsi, la lumière pourrait réguler certaines étapes de la voie de biosynthèse des coumarines. La PAL est connue pour réagir à certaines longueur d'ondes notamment les rouges, clair (660 nm) et sombre (730 nm), par le biais des phytochromes.

#### 3.2.3.1 QUANTITÉ DE LUMIÈRE : OMBRAGE

*Objectif : Déterminer l'influence de la quantité de lumière sur la synthèse de coumarines par le mélilot*

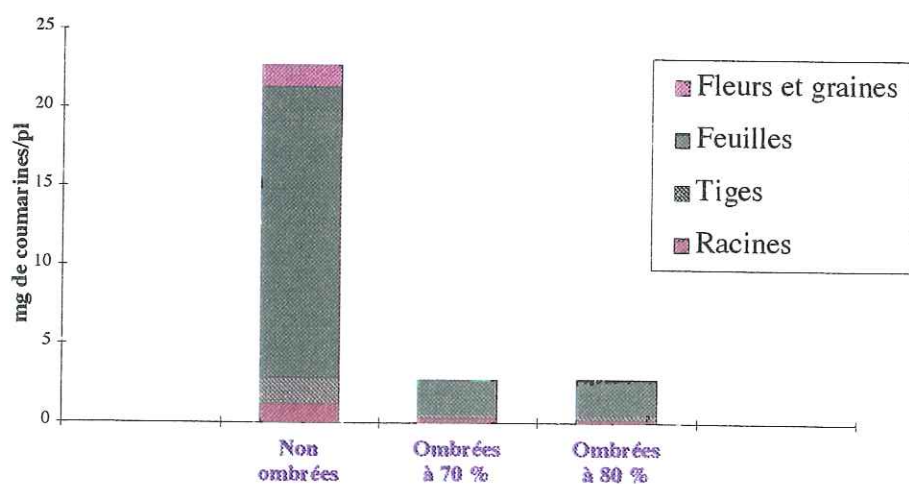
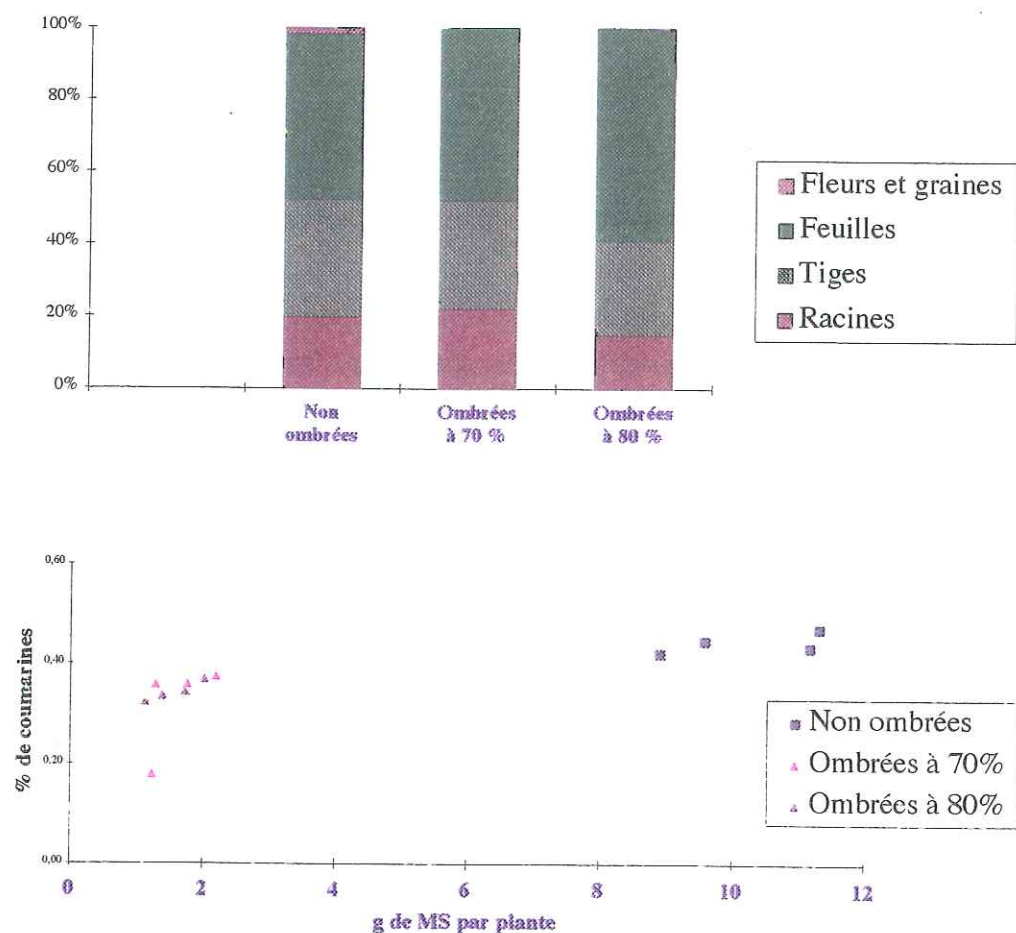
##### 3.2.3.1.1 Matériel et méthodes

Le matériel végétal : 32 boutures de génotype 112-4 ont été produites en serre.

Les modalités d'ombrage testées sont les suivantes :

- plantes non ombrées = témoin
- plantes ombrées à 70 %. Les plantes reçoivent 30% du PAR reçu par le témoin.
- plantes ombrées à 80 %. Les plantes reçoivent 20% du PAR reçu par le témoin.

Les filets noirs utilisés pour ombrer les plantes ne modifient pas la qualité de la lumière (DESMOTES-MAINARD, 1994). L'essai se déroule en serre chauffée, uniquement éclairée par la lumière solaire. Les plantes sont placées dans des pots de 10 cm de diamètre remplis de terreau de rempotage (terreau de tourbe de sphaigne NF U 44-551KLASMANN Substrat 2), à une densité de 25 pl. m<sup>-2</sup>. L'expérimentation est mise en place le 23/02/94 alors que les mélilots possèdent 11 ramifications primaires et 23 cm de hauteur. Les plantes sont arrosées régulièrement avec de la solution nutritive et sont récoltées le 30/03/94. Il n'y a pas de plantes de bordure. Chaque modalité est testée sur 8 plantes. Une répétition est constituée par la dissection de deux plantes.



|                     |              |             |             |
|---------------------|--------------|-------------|-------------|
| POIDS SECS          |              |             |             |
| Plante entière en g | 10,25 ± 1,19 | 1,64 ± 0,45 | 1,58 ± 0,39 |
| % DE COUMARINES     |              |             |             |
| Plante entière      | 0,44 ± 0,02  | 0,32 ± 0,09 | 0,34 ± 0,02 |
| Racines             | 0,11 ± 0,02  | 0,13 ± 0,01 | 0,14 ± 0,01 |
| Tiges               | 0,10 ± 0,02  | 0,13 ± 0,01 | 0,14 ± 0,01 |
| Feuilles            | 0,78 ± 0,03  | 0,54 ± 0,02 | 0,49 ± 0,03 |
| Fleurs + Graines    | 1,78 ± 0,01  |             |             |

Figure 67 : Influence de l'ombrage sur la proportion entre organes des plantes et la teneur, le rendement en coumarines

### 3.2.3.1.2 Résultats et discussion

Les poids secs, les rendements et teneurs en coumarines sont présentés **Figure 67**.

L'ombrage a une influence importante à la fois sur le poids des plantes et leur teneur en coumarines. Pour ces deux critères, il n'y a pas de différence significative entre l'ombrage à 70% et l'ombrage à 80%.

Le poids des plantes est 6 fois moins élevé sous ombrage alors que le rapport entre organes est pratiquement constant. Seules les plantes non ombrées ont fleuri. Un des facteurs induisant la floraison du mélilot est donc la quantité de lumière reçue par la plante.

Les racines et les tiges des plantes ombrées et non ombrées possèdent approximativement la même teneur en coumarines alors que les feuilles des plantes ombrées contiennent un pourcentage de coumarines de 35% inférieur à celui des plantes non ombrées.

*Une diminution du PAR entraîne une baisse de teneur en coumarines des feuilles.*

Ce résultat est en contradiction avec ceux de SLATENSEK (1947) qui trouve une légère augmentation de teneur en coumarines dans les feuilles des plantes ombrées.

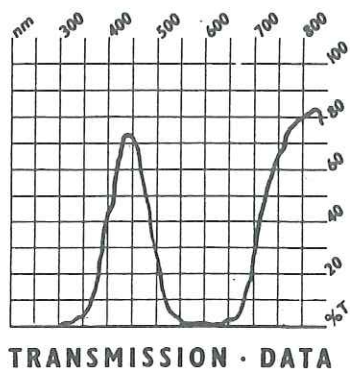
La source de coumarines est affectée par une diminution de rayonnement, ce qui laisse supposer un lien entre l'activité photosynthétique des plantes et la synthèse des coumarines. Cependant, il n'est pas possible de savoir si la baisse de teneur observée dans les feuilles ombrées est la conséquence :

- \* d'une baisse d'activité du métabolisme primaire : la synthèse de coumarines nécessite la présence de sucres. Ceux-ci sont produits par photosynthèse, limitée en cas d'ombrage. Le manque de glucose et/ou d'énergie constituerait alors un facteur limitant de la synthèse de coumarines ;

et / ou

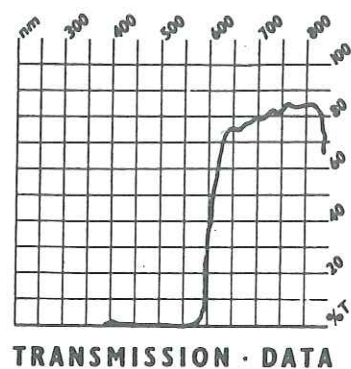
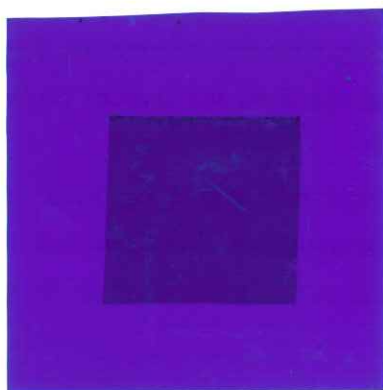
- \* d'une diminution de synthèse de coumarines, régulée directement par la quantité de lumière.

Néanmoins, la diminution de PAR dans le couvert ne semble pas être le seul facteur explicatif de la baisse de teneur (**Figure 67**). Sachant que le couvert végétal modifie la qualité de la lumière, nous allons tenter d'avancer dans la compréhension de ce mécanisme en testant 3 longueurs d'onde spécifiques, susceptibles d'intervenir sur la régulation de certaines enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des coumarines.



EFFECTS · FILTER

**132**  
MEDIUM·BLUE



EFFECTS · FILTER

**106**  
PRIMARY·RED

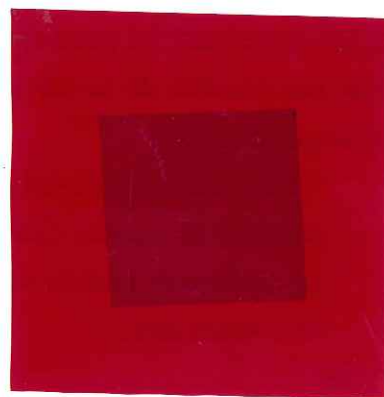


Figure 68 : Caractéristiques des filtres utilisés dans le cadre de l'essai sur la qualité de la lumière

### 3.2.3.2 QUALITÉ DE LUMIÈRE : FILTRES

*Objectif : Tester l'influence du rouge clair, du rouge sombre et du bleu sur la synthèse de coumarines*

#### 3.2.3.2.1 Matériel et méthodes

Deux essais ont été mis en place, le premier sous lumière artificielle en chambre climatique, le second à l'extérieur sous lumière solaire.

##### Protocole commun aux deux essais

Des plantes de génotype 112-4 racinées, issues de culture *in vitro* sont placées sous 4 types de filtres (Figure 68) :

- Noir,
- Rouge (Chris James n° 106) transmission de la lumière à partir de 660 nm : rouge clair,
- Bleu (Chris James n° 132) transmission de la lumière autour de 430 nm,
- Rouge + Bleu (association de ces deux filtres) transmission de la lumière à partir de 750 nm : rouge sombre.

Des trous de 4 mm de diamètre ont été réalisés de façon régulière et homogène dans ces filtres, afin que les plantes de chacun des traitements reçoivent la même quantité de lumière.

Des mesures de PAR sont effectuées à une hauteur de 20 cm sous chacun des filtres.

Quatre traitements avec des qualités de lumière différentes ont été testés avec ces quatre types de filtre. Pour chaque traitement, les plantes sont placées dans deux mini-serres accolées (largeur 40 cm, profondeur 60 cm, hauteur 60 cm) recouvertes du ou des filtre(s). Ceux-ci retombent de 40 cm de part et d'autre des mini-serres. Un espace de 20 cm est donc laissé afin de permettre une circulation d'air et éviter une augmentation de température sous les mini-serres. Les plantes sont disposées à une densité de 20 pl. m<sup>-2</sup>. Elles sont surélevées de 12,5 cm afin de ne recevoir que la lumière ayant traversé les filtres.

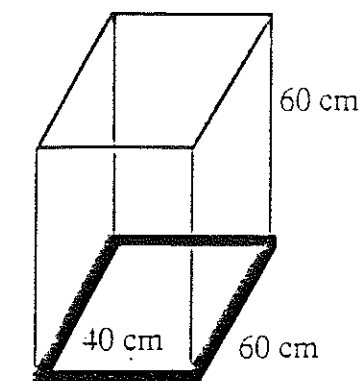
Les plantes sont arrosées régulièrement avec de la solution nutritive.

Elles sont récoltées 30 jours après la mise en place sous les filtres, mesurées et disséquées par organe. Les échantillons sont séchés, broyés, extraits et dosés.

\* En chambre de culture (essai 1), les plantes sont sevrées le 12/10/94 et coupées 3 semaines avant l'expérimentation mise en place le 3/04/95.

Les plantes sont cultivées sous les filtres dans une chambre climatique équipée de lampes ORSAM à vapeur de mercure (400 watt Power Start HQI-TA00 W/DH (qh3) 5900°K). Ces

Mini -serre



Mesures de PAR\*\*  
en micro Einstein par seconde

Avant d'avoir effectué les  
trous dans les filtres

|    |    |    |
|----|----|----|
| 37 | 37 | 37 |
|----|----|----|

|    |    |    |
|----|----|----|
| 23 | 23 | 23 |
|----|----|----|

|     |     |     |
|-----|-----|-----|
| 1.9 | 1.9 | 1.9 |
|-----|-----|-----|

|  |  |  |
|--|--|--|
|  |  |  |
|--|--|--|

Pourcentage d'absorption  
des filtres

Filtre rouge

76 %

Filtre bleu

84.6 %

Filtre rouge  
+ bleu

98.6 %

Filtre noir

Après d'avoir effectué les  
trous dans les filtres

|    |    |    |
|----|----|----|
| 50 | 48 | 50 |
|----|----|----|

|    |    |    |
|----|----|----|
| 50 | 50 | 50 |
|----|----|----|

|    |    |    |
|----|----|----|
| 46 | 49 | 48 |
|----|----|----|

|    |    |    |
|----|----|----|
| 49 | 48 | 48 |
|----|----|----|

Les mesures sont effectuées à 50 cm de la vitre séparant les lampes de la chambre climatique

Figure 69 : Conditions d'éclairage dans les essais concernant l'influence de la qualité de la lumière sur la teneur en coumarines

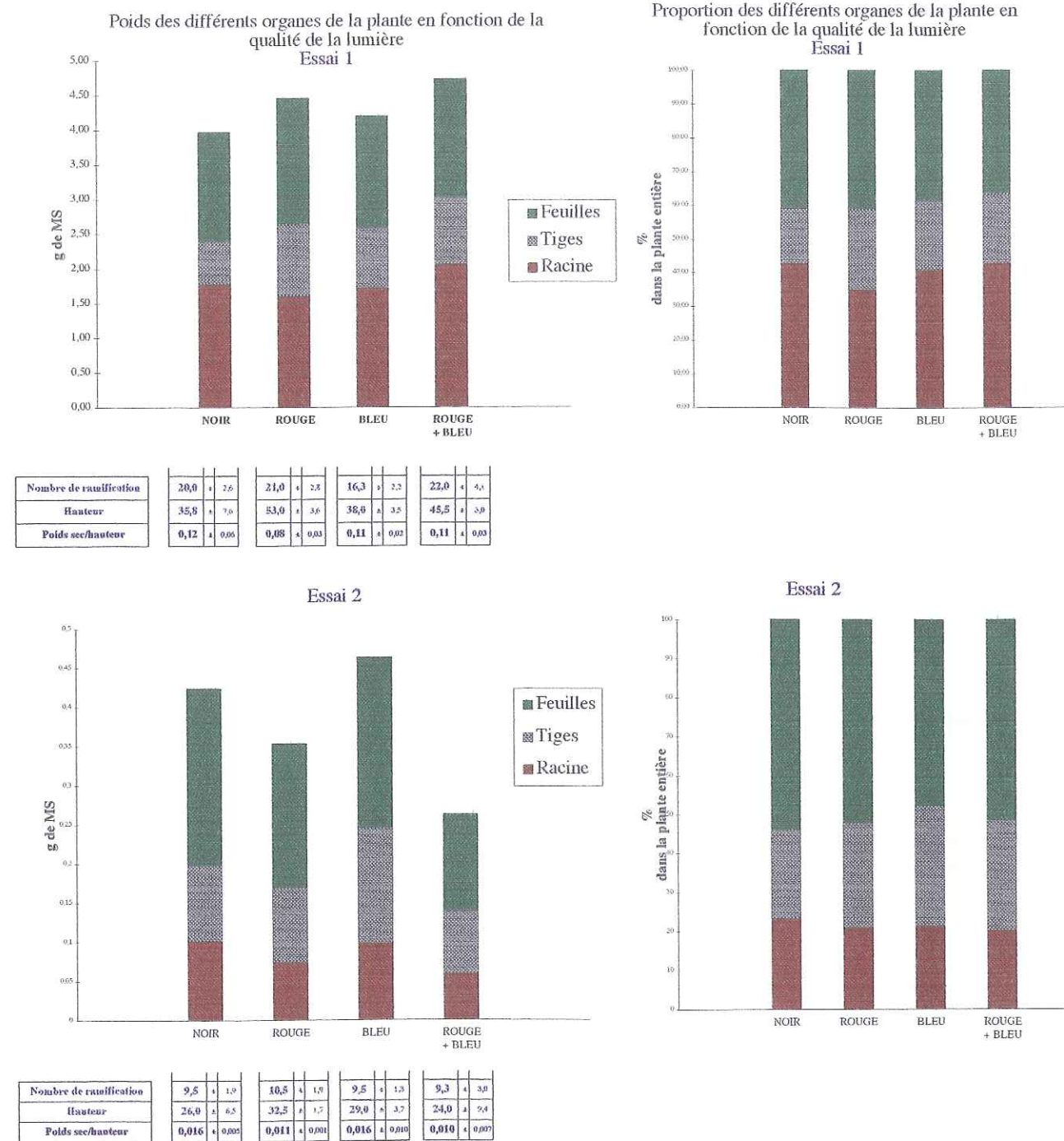


Figure 70 : Influence de la qualité de la lumière sur le poids sec des organes des plantes et sur leur proportion dans la plante

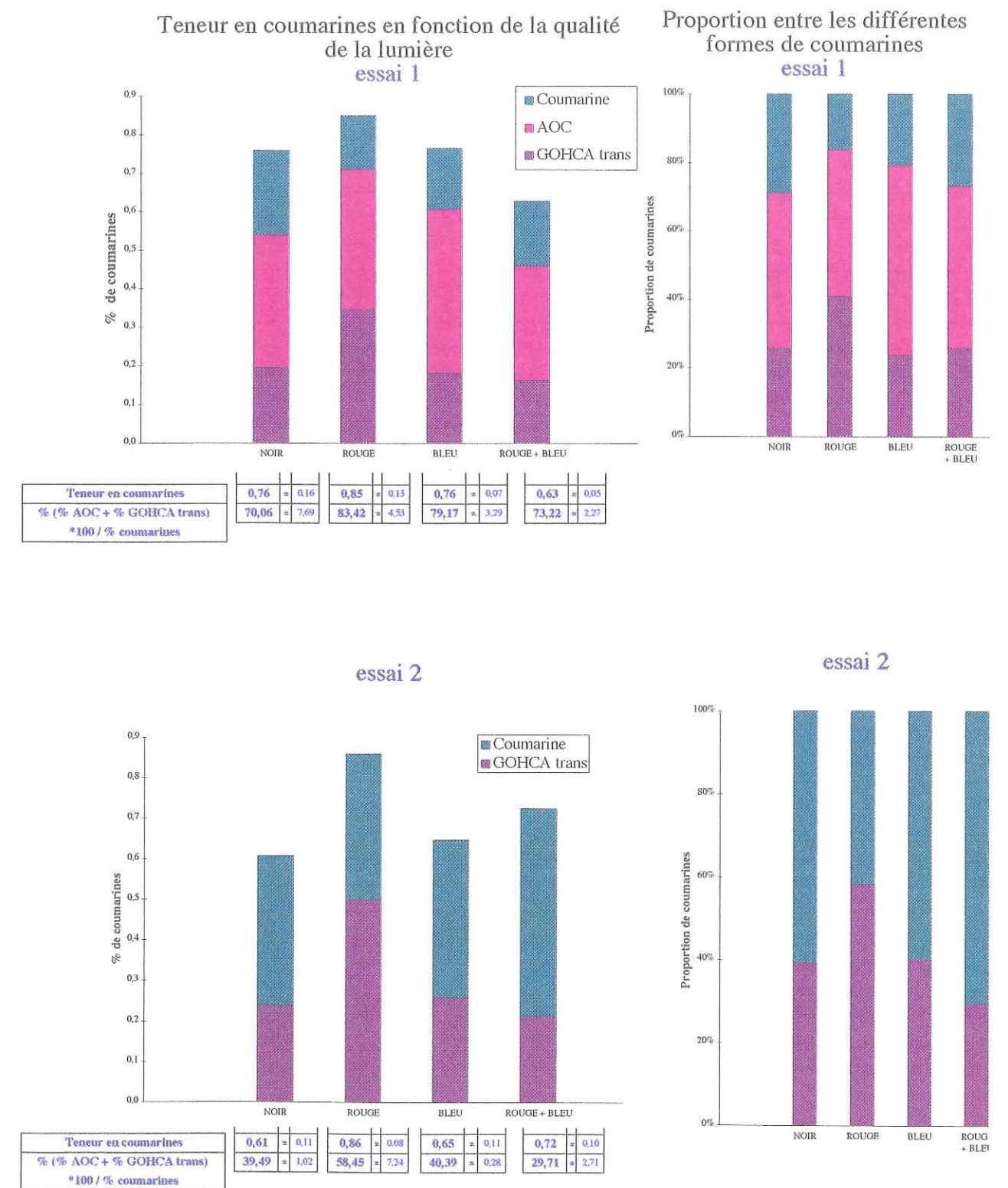


Figure 71 : Influence de la qualité de la lumière sur la teneur et la proportion de coumarines

lampes possèdent un spectre lumineux proche de celui de la lumière solaire. La photopériode est de 16 heures de jour à 22°C, 8 heures de nuit à 18°C. Les lampes sont placées à 25 cm au-dessus des filtres.

\* A l'extérieur (essai 2), les plantes sont sevrées le 10/08/95 dans des "fertil-pots" puis placées dans des pots de 10 cm x 10 cm x 10 cm. L'expérimentation est mise en place le 12/09/95 ; les plantes sont récoltées 30 jours après. Le 12/09/95, les mélilots mesurent 14 cm et possèdent 10 feuilles. La température moyenne à Colmar à cette période est de 18,0°C.

Le dispositif expérimental est présenté sur la **Figure 69**.

### 3.2.3.2.2 Résultats et discussion

Les trous dans les filtres ont permis de dissocier la qualité de lumière de la quantité. Cependant, chacun de ces filtres n'absorbe pas les rayonnements de la même manière : le filtre rouge absorbe moins la lumière que le filtre bleu qui lui-même laisse passer plus de rayonnement que l'association des filtres rouge et bleu. Davantage de trous ont donc été faits dans le filtre bleu et un nombre encore plus important dans l'association des filtres rouge et bleu. Il aurait fallu pouvoir disposer d'un spectroradiomètre pour mesurer précisément à la fois la quantité et la qualité de la lumière reçues par les plantes.

Dans le premier essai, tous les traitements reçoivent un PAR de  $50 \pm 2 \mu\text{Einstein m}^{-2}\text{s}^{-1}$  sous toutes les modalités.

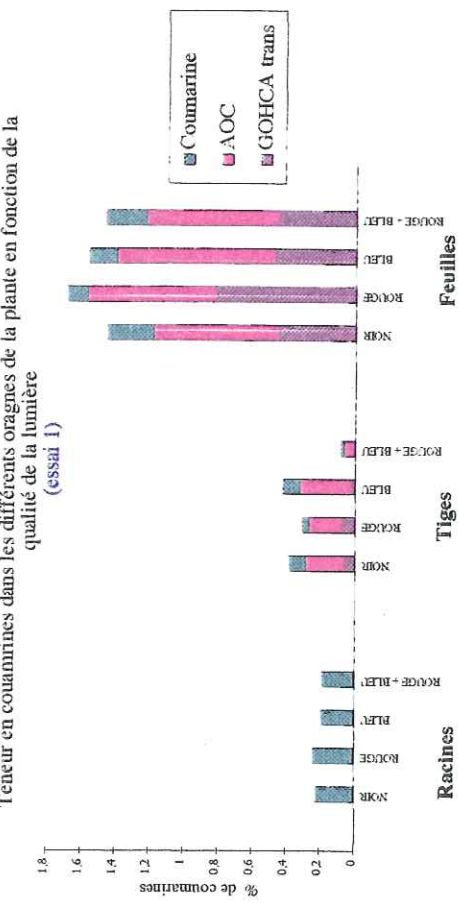
Dans le second essai, les plantes étant placées à l'extérieur sous le même dispositif expérimental, elles reçoivent toutes un PAR variable suivant le temps, de l'ordre de  $200 \mu\text{Einstein m}^{-2}\text{s}^{-1}$  au midi solaire, par temps découvert.

Dans ces deux essais, il n'y a pas de différence significative entre les modalités testées, pour le poids des plantes, leur hauteur et la proportion d'organe par plante (**Figure 70**), bien que, KASPERBAUER et BORTHWICK (1964) trouvent qu'un traitement au rouge sombre induit l'élongation des tiges.

*Les qualités de lumière testées n'interviennent ni sur la hauteur, ni sur la proportion d'organe par plante ni sur leur poids.*

La **Figure 71** présente le pourcentage de coumarines par plante, cultivées sous différentes conditions lumineuses.

Teneur en coumarines dans les différents organes de la plante en fonction de la qualité de la lumière (essai 1)



essai 2

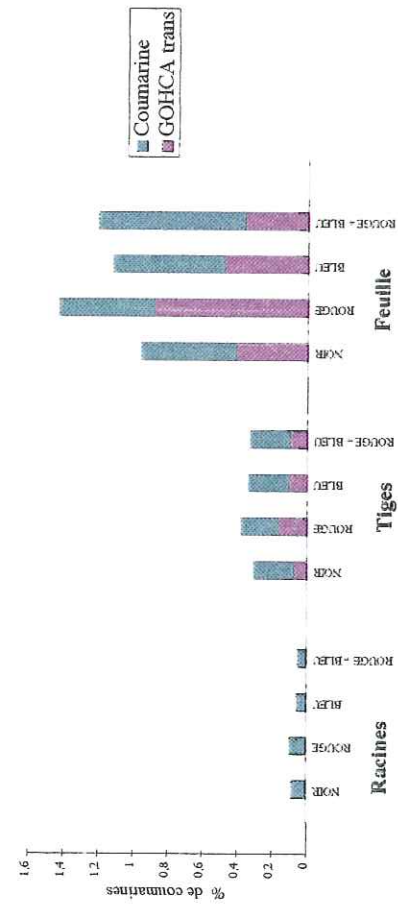


Figure 72 : Teneur et proportion en coumarines dans les différents organes de la plante suivant la qualité de la lumière

*Dans les deux essais, l'application de lumière rouge soit une augmentation du rapport rouge clair/rouge sombre a une influence positive sur la synthèse de coumarines.*

L'explication classiquement donnée à une augmentation de composés phénoliques à l'application de lumière rouge est une stimulation de l'activité PAL due à une activation des phytochromes par ces longueurs d'onde (Figure 6) (HUAULT, 1969 ; MOHR, 1969 ; NEUMANN, 1991 ; NEUMANN et SCHWEMMLE, 1993).

Un tel phénomène est difficile à mettre en évidence en fin de chaîne de biosynthèse du fait des différents modes de régulation existants. Pour montrer réellement l'influence de la lumière sur l'activité de la PAL et la synthèse de certains composés phénoliques, il faudrait doser dans les différents échantillons traités l'ARNm\*\* et l'activité de la PAL afin de définir à quel niveau (enzymatique ou transcription) s'effectue la régulation.

Les échantillons du premier essai ont été extraits à l'eau mais n'ont pu être dosés immédiatement, comme normalement, en raison d'un contretemps. Il s'est produit une hydrolyse du GOHCA *trans* en AOC.

Dans le cas du traitement avec de la lumière rouge, l'isomérisation *trans* / *cis* est plus faible que dans les autres cas. En effet, le spectre de transmission de ce filtre (Figure 68) montre qu'il ne laisse pas passer les U.V. Seuls les U.V. provenant des trous ont pu atteindre les plantes et ont permis cette réaction. Ce phénomène est également mis en évidence dans les feuilles et les tiges et est présenté **Figure 72**.

Le dosage des coumarines a été effectué par organe pour de déterminer si les longueurs d'onde testées ne favorisaient par leur migration. Il apparaît que les teneurs en coumarines dans les racines et les tiges ne sont pas modifiées par la qualité de lumière. Seules les feuilles traitées à la lumière rouge présentent une teneur supérieure en coumarines. Dans ce cas, la qualité de la lumière n'intervient pas sur la répartition des coumarines entre organes.

### 3.2.3.3 CONCLUSION

Ces expérimentations relatives à l'influence de la lumière sur la teneur en coumarines présentent un caractère plus fondamental que celles présentées précédemment. Les techniques simples utilisées pour étudier ces phénomènes ne nous ont pas permis de déterminer de façon précise l'existence de mécanismes de régulation de la synthèse de coumarines par la plante mais plutôt d'émettre des hypothèses qui devront être testées avec des outils plus fins d'enzymologie ou de biologie moléculaire.

Néanmoins, nous avons pu montrer que :

*la teneur en coumarines est dépendante du PAR reçu par les plantes.*

Cependant, il ne nous a pas été possible de déterminer si ce phénomène est lié à une réaction directe du métabolisme secondaire à la lumière ou si, du fait du manque de sucres et/ou d'énergie fournis par le métabolisme primaire, la synthèse de coumarines s'est trouvée limitée. Dissocier le métabolisme primaire du métabolisme secondaire paraît difficile. Une possibilité, envisageable, consisterait à enrichir l'atmosphère en CO<sub>2</sub>, pour améliorer l'efficacité de la photosynthèse. Cette méthode permettrait d'augmenter l'efficacité de la photosynthèse sans intervenir sur le rayonnement.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence

|                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------|
| <i>un effet positif de la lumière rouge sur la synthèse de coumarines</i> |
|---------------------------------------------------------------------------|

qui devra être validé et expliqué.

Dans ce chapitre consacré à l'étude de la voie d'amélioration agronomique des teneurs en coumarines du mélilot, nous avons déterminé quelques facteurs intervenant sur la teneur en coumarines des plantes.

Nous avons montré que les teneurs en coumarines sont fortes :

- dans les plantes jeunes,
- dans les feuilles ou les bourgeons,
- dans les niveaux supérieurs de la plante lorsqu'elle est bien développée.

Quant aux rendements en matière sèche par unité de surface, leur augmentation n'influe pas sur la teneur en coumarines des plantes.

Voyons maintenant comment ces résultats peuvent être appliqués dans le cadre de la mise au point d'un itinéraire technique approprié à cette culture.

### 3.2.4 CONSÉQUENCES AGRONOMIQUES

Pour produire du mélilot à forte teneur en coumarines, il faut récolter des plantes jeunes, peu ligneuses. Mais, dans ce cas, le rendement en matière sèche est faible. Cependant, les plantes coupées précocement peuvent reprendre leur croissance si elles disposent de suffisamment d'eau. Il est donc vraisemblablement possible d'effectuer plusieurs coupes sur une même parcelle de mélilot. Ce type de technique n'apparaît pas dans la bibliographie car l'objectif de toutes les expérimentations menées jusqu'à maintenant visait à diminuer les teneurs en coumarines. Avant de présenter les techniques d'obtention de mélilot à forte teneur en coumarines, nous allons étudier une des techniques susceptibles de favoriser la réaction d'hydrolyse du GOHCA *cis* par la  $\beta$  glucosidase.

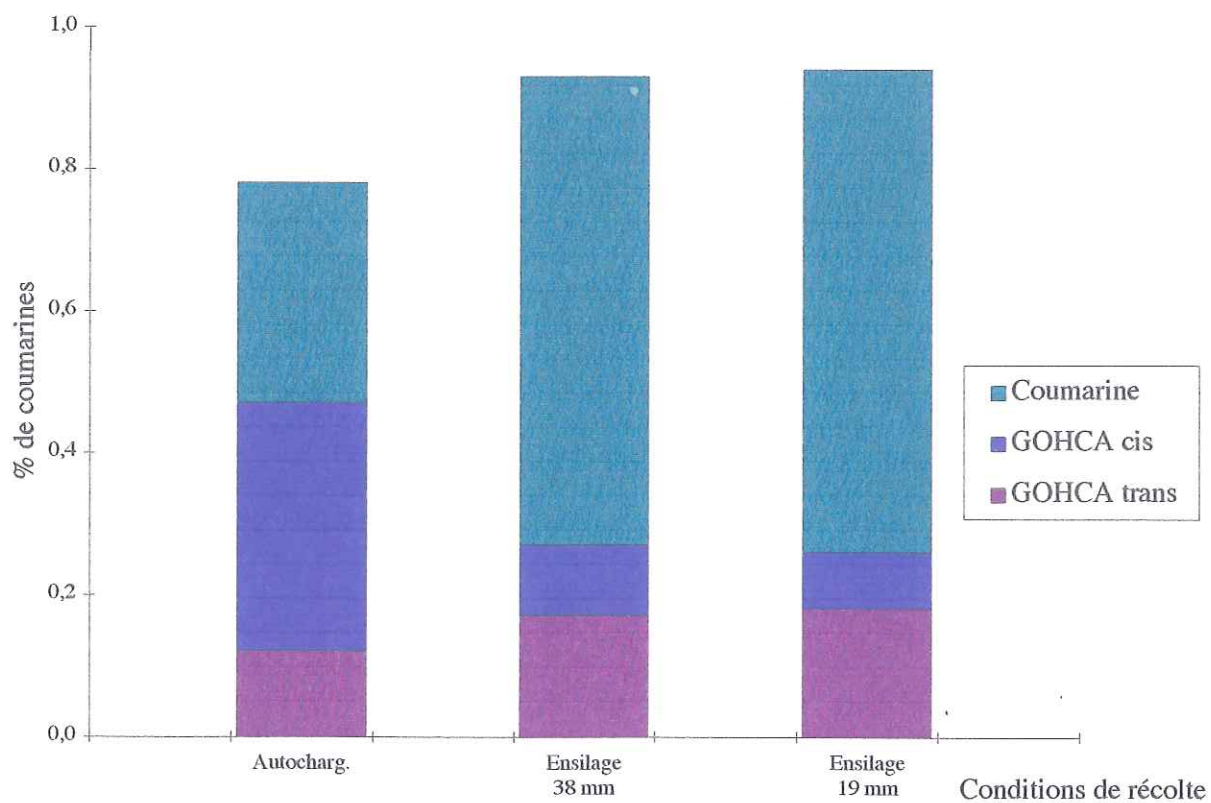


Figure 73 : Influence des conditions de récolte et de séchage sur la teneur des coumarines du mélilot

### 3.2.4.1 TECHNIQUES DE RÉCOLTE

*Objectif : Déterminer la meilleure technique de récolte permettant l'obtention de mélilot à forte teneur en coumarine libre.*

La récolte correspond à une étape de la filière où il est possible de mettre en contact le GOHCA *cis* et la  $\beta$  glucosidase afin de libérer la coumarine libre.

Cette expérimentation est menée à l'échelle agricole.

#### 3.2.4.1.1 Matériel et méthodes

Matériel végétal : semis d'automne d'une origine allemande (fournisseur BORNTRAGER) le 23/08/94 à Varize.

Trois modalités de récolte ont été testées sur une même parcelle au moyen :

- **d'une autochargeuse\*** le 12/06/95. Le mélilot a été coupé, endainé puis autochargé.

Cette technique de récolte nécessite la présence de deux personnes ;

- **d'une l'ensileuse\*** :

- le 13/06/95 récolte de morceaux de mélilot frais de **38 mm**;

- le 14/06/95 récolte morceaux de mélilot frais de **19 mm**.

Ce mode de récolte peut être effectué par une personne seule.

Pour chacune des techniques, le séchoir a été rempli pendant 5 heures à 80°C puis 12 heures à 60°C. La même quantité de mélilot a été récoltée et disposée sur la même surface de séchage.

L'épaisseur de la couche de matériel végétal disposée dans le séchoir était de :

- 90 cm pour la "modalité autochargeuse". Ce matériel n'est pas coupé, il est donc très volumineux et l'air y circule bien ;
- 25 cm pour la "modalité ensilage 38 mm" ;
- 20 cm pour la "modalité ensilage 19 mm".

L'extraction a été effectuée au méthanol sous reflux.

#### 3.2.4.1.2 Résultats et discussion

Les résultats de cet essai sont présentés **Figure 73**.

Les techniques de récolte éprouvées n'ont pas d'influence sur la teneur en coumarines alors qu'elles interviennent sur la transformation du GOHCA *cis* en coumarine libre. Cette hydrolyse est la plus importante en récoltant à l'ensileuse, quel que soit la taille des morceaux car cette

| Stades et dates de la première coupe | Hauteurs de la première coupe | Dates de la seconde coupe | Dates de la troisième coupe |
|--------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Bourgeonnement<br>30/05/94           | 5 cm<br>30 cm                 | 28/06/94                  | 25/07/94                    |
| Floraison<br>13/06/94                | 5 cm<br>30 cm                 | 28/06/94                  | 25/07/94                    |
| Pleine floraison<br>28/06/94         | 5 cm<br>30 cm<br>60 cm        | 25/07/94                  |                             |

Tableau 10 : Stades et hauteurs de coupes à Luttenbach en 1994

| Lieu       | Date 1ère récolte | Stade          | Date 2ème récolte | Stade          | Date 3ème récolte | Stade     |
|------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|-----------|
| Colmar     | 22/05/92          | Bourgeonnement | 19/06/92          | Bourgeonnement | 15/7/92           | Floraison |
| Luttenbach | 25/05/93          | Bourgeonnement | 22/06/93          | Floraison      | 27/07/93          | Floraison |
| Colmar     | 1/06/92           | Floraison      | 3/07/92           | Floraison      | 31/07/92          | Floraison |
| Luttenbach | 1/06/93           | Floraison      | 6/07/93           | Floraison      | 11/08/93          | Floraison |

Tableau 11 : Dates et stades de récolte à Colmar en 1992 et à Luttenbach en 1993

| Modalités de coupes | Date 1ère récolte | Stade et hauteur des plantes | Date 2ème récolte | Stade et hauteur des plantes | Date 3ème récolte | Stade et hauteur des plantes |
|---------------------|-------------------|------------------------------|-------------------|------------------------------|-------------------|------------------------------|
| A                   | 22/05/95          | Bourgeonnement<br>50 cm      | 27/06/95          | Bourgeonnement<br>60 cm      | 2/8/95            | Floraison<br>50 à 80 cm      |
| B                   | 23/05/95          | Bourgeonnement<br>50 cm      | 10/07/95          | Floraison<br>90 cm à 1 m     |                   |                              |
| C                   | 1/06/95           | Bourgeonnement<br>115 cm     | 12/07/95          | Floraison<br>60 à 70 cm      |                   |                              |
| D                   | 27/06/95          | Floraison<br>180 cm          |                   |                              |                   |                              |

Tableau 12 : Dates et stades de récolte à Varize en 1995

technique provoque une rupture des tissus et favorise donc un bon contact entre l'enzyme et son substrat.

La technique de *récolte à l'ensileuse* est conseillée car elle permet une bonne hydrolyse du GOHCA *cis* en coumarine libre.

De plus, cette technique facilite la récolte : une seule personne est nécessaire.

#### 3.2.4.2 DATES ET HAUTEUR DE COUPE SUR SEMIS D'AUTOMNE

*Objectif :*

*\* Définir le mode d'exploitation des parcelles (stades, hauteur et nombre de coupes sur une même parcelle) permettant de produire un rendement optimum en dérivés coumariniques*

##### 3.2.4.2.1 Matériel et méthodes

###### \* Stades et hauteurs de la première coupe

- Cet essai a été mis en place **en 1994 à Luttenbach** sur *semis d'automne* : parcelle de 10 m de long (4 blocs de 4 lignes espacées de 20 cm) semée avec l'origine 157 le 18/08/93 à 10 Kg ha<sup>-1</sup> 45 pl. m<sup>-2</sup> (récolte de 4 fois 0,64 m<sup>2</sup> par modalité testée).  
7 modalités de coupes ont été testées (**Tableau 10**).

Les secondes et troisièmes coupes ont été effectuées à 10 cm du sol. La récolte est manuelle.

###### \* Dates de coupes

Trois essais ont été mis en place sur *semis d'automne* :

- **en 1992 à Colmar** sur une parcelle de 14 m de long sur 3,5 m de large semée avec l'origine 111, le 26/08/91 à 17 Kg ha<sup>-1</sup> (récolte de 3 fois 1 m<sup>2</sup> par modalité testée) ;
- **en 1993 à Luttenbach** sur une parcelle de 8 m de long sur 2 m de large semée avec l'origine 111, le 20/08/92 à 20 Kg ha<sup>-1</sup> 45 pl. m<sup>-2</sup> (récolte de 3 fois 0,5 m<sup>2</sup> par modalité testée).

Par souci de simplification, ces deux expérimentations sont présentées conjointement. Pour ces deux essais, la parcelle de méliot est divisée en trois blocs. Les plantes sont récoltées manuellement aux dates présentées dans le **Tableau 11**, à une hauteur de 10 cm et séchées 12 heures à 60°C.



Figure 74 : Hauteur de coupes sur semis d'automne à Luttenbach

- *en 1995 à Varize* (48° 16' 40" N, 1° 37' 20" E) sur sol limoneux, semis avec une origine allemande (fournisseur BORNTRAGER) le 24/08/94 à 4 Kg ha<sup>-1</sup> 76 pl. m<sup>-2</sup>, parcelle irriguée (récolte mécanique de 500 m<sup>2</sup> par modalité de coupe testée, prélèvement dans le séchoir de 4 échantillons de 1 Kg de matière sèche par traitement).

Les plantes sont récoltées à l'autochargeuse aux dates présentées dans le **Tableau 12** et séchées 20 heures à 50°C. La hauteur de la première coupe s'effectue à 10 cm du sol pour les modalités de coupe A et B, à 25 cm pour la C et à 40 cm pour la parcelle D. Toutes les secondes coupes et la troisième coupe de la modalité A se font à 10 cm du sol.

### 3.2.4.2.2 Résultats et discussion

#### \* Définition des stades

Du fait de l'échelonnement et du recoupement des stades du mélilot, quelques précisions s'avèrent utiles :

- au bourgeonnement : 100% des plantes possèdent des bourgeons ;
- en début de floraison : environ 80% des plantes possèdent des fleurs ;
- à la floraison : 100% des plantes sont en fleurs, il reste beaucoup de bourgeons ;
- en pleine floraison : 100% des plantes sont en fleurs, les premières graines apparaissent.

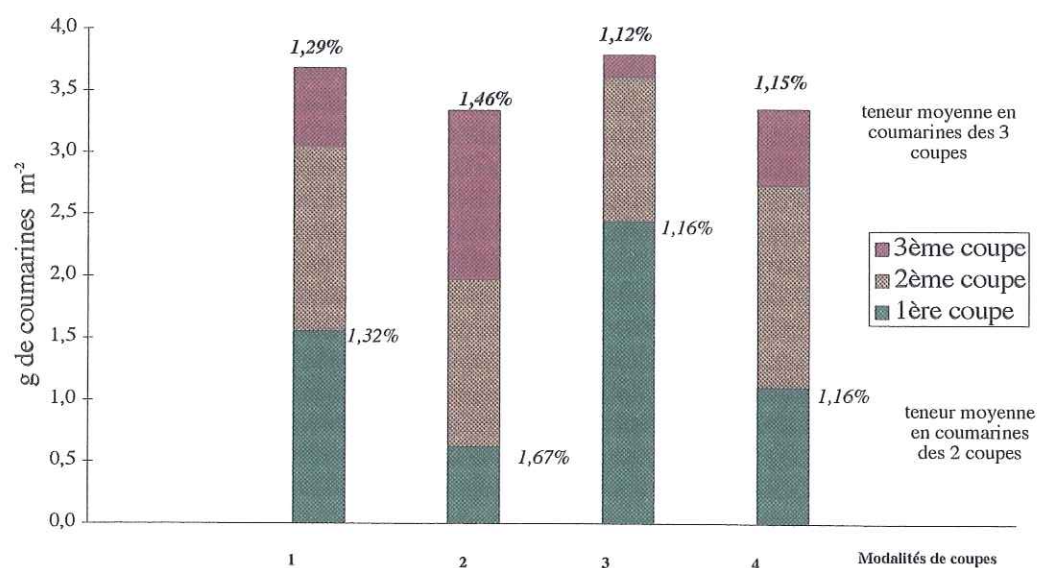
#### \* Stades et hauteurs de la première de coupe (Figure 74)

Au printemps 1994, la parcelle de mélilot de Luttenbach possédait une densité faible (45 pl. m<sup>-2</sup>) et hétérogène. En effet, elle avait subi des pertes durant l'hiver dues vraisemblablement à la mauvaise résistance au froid de cette origine et à une importante attaque de sitones au printemps. Ceci explique les fortes variations observées sur le rendement par répétition et ne permet pas de mettre en évidence d'éventuelles différences sur le rendement moyen par modalité de récolte.

Après la première coupe, les plantes récoltées à 30 cm reprennent mieux leur croissance que celles coupées à 5 cm. Le rendement des 2 premières coupes est plus important si la première coupe est effectuée à 30 cm plutôt qu'à 5 cm de hauteur.

Une première coupe trop basse élimine une grande partie des bourgeons axillaires susceptibles de se développer en pousses du fait de la levée de la dominance apicale provoquée par la récolte.

En seconde et en troisième coupe, les plantes sont en fleurs. L'induction à la floraison ayant été réalisée avant la première coupe, les coupes ne peuvent les faire "revenir" à un état végétatif alors qu'elles ont tendance à les "rajeunir" d'un point de vue physiologique. Ainsi dans le cas de coupes multiples, les tiges sont récoltées avant qu'elles ne soient trop ligneuses, les feuilles avant que leurs coumarines n'aient migrées et/ou n'aient été diluées, d'où les bonnes teneurs moyennes en coumarines obtenues lorsque l'on effectue 3 coupes sur une parcelle. Les plus



| Dates                                        |                |                 |                |                 |  |
|----------------------------------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|--|
| 1ère coupe                                   | 22/05/92       | 25/05/93        | 1/06/92        | 1/06/93         |  |
| 2ème coupe                                   | 19/06/92       | 22/06/93        | 3/07/92        | 6/07/93         |  |
| 3ème coupe                                   | 15/07/92       | 27/07/93        | 31/07/92       | 11/08/93        |  |
| Rendement en matière sèche g m <sup>-2</sup> |                |                 |                |                 |  |
|                                              | 284,03 ± 12,68 | 228,72 ± 20,17  | 337,64 ± 35,41 | 292,76 ± 31,6   |  |
| 1ère coupe                                   | 125,67 ± 16,71 | 30,81 ± 12,64   | 233,6 ± 44,59  | 112,19 ± 25,14  |  |
| 2ème coupe                                   | 108,49 ± 8,45  | 88,44 ± 5,5     | 83,17 ± 11,39  | 117,84 ± 17,11  |  |
| 3ème coupe                                   | 52,87 ± 5,06   | 109,47 ± 0,02   | 20,87 ± 4,07   | 53,03 ± 6,58    |  |
| % DE COUMARINES                              |                |                 |                |                 |  |
| 1ère coupe                                   | 1,24 ± 0,07    | 2,09 ± 0,28     | 1,04 ± 0,07    | 1,01 ± 0,24     |  |
| 2ème coupe                                   | 1,42 ± 0,05    | 1,52 ± 0,08     | 1,4 ± 0,08     | 1,29 ± 0,05     |  |
| 3ème coupe                                   | 1,19 ± 0,02    | 1,25 ± 0,13     | 0,87 ± 0,09    | 1,15 ± 0,1      |  |
|                                              | Colmar 1992    | Luttenbach 1993 | Colmar 1992    | Luttenbach 1993 |  |

Figure 75 : Coupes sur semis d'automne à Colmar en 1992 et à Luttenbach en 1993

fortes teneurs sont trouvées en première coupe dans les plantes récoltées au stade bourgeonnement ou floraison à une hauteur de 30 cm (3,16% et 2,33% de coumarines). Seules les parties les plus actives physiologiquement (feuilles jeunes et bourgeons) sont récoltées, les tiges ligneuses et à faible teneur en coumarines sont laissées sur la parcelle. Ceci explique le très faible rendement de ces premières récoltes lorsque la coupe est effectuée à 30 cm.

*Il est possible de produire du mélilot à 3% de coumarines en récoltant la partie supérieure des plantes au stade bourgeonnement mais le rendement en matière sèche donc en coumarines est très faible.*

Les modalités de récolte (première coupe à 30 cm au stade bourgeonnement ou début de floraison) conduisent à un fort rendement en matière sèche en seconde coupe (10 cm), avec des teneurs en coumarines plus faibles qu'à la première coupe car les tiges ligneuses sont récoltées. Le positionnement d'une première coupe en pleine floraison ne permet de faire que deux coupes. Les teneurs de la première coupe et les teneurs moyennes en coumarines sont alors plus faibles. Ce n'est pas le cas si la première coupe est effectuée à un stade plus précoce car l'âge moyen des organes récoltés est plus élevé.

*Sur semis d'automne, pour obtenir un bon rendement en matière sèche à forte teneur en coumarines (supérieure à 1%) tout en échelonnant la récolte et en répondant aux normes de la pharmacopée, il faut effectuer 3 coupes successives à 3 semaines ou 1 mois d'intervalle, la première devant être positionnée au stade bourgeonnement ou floraison, entre 5 et 30 cm de hauteur.*

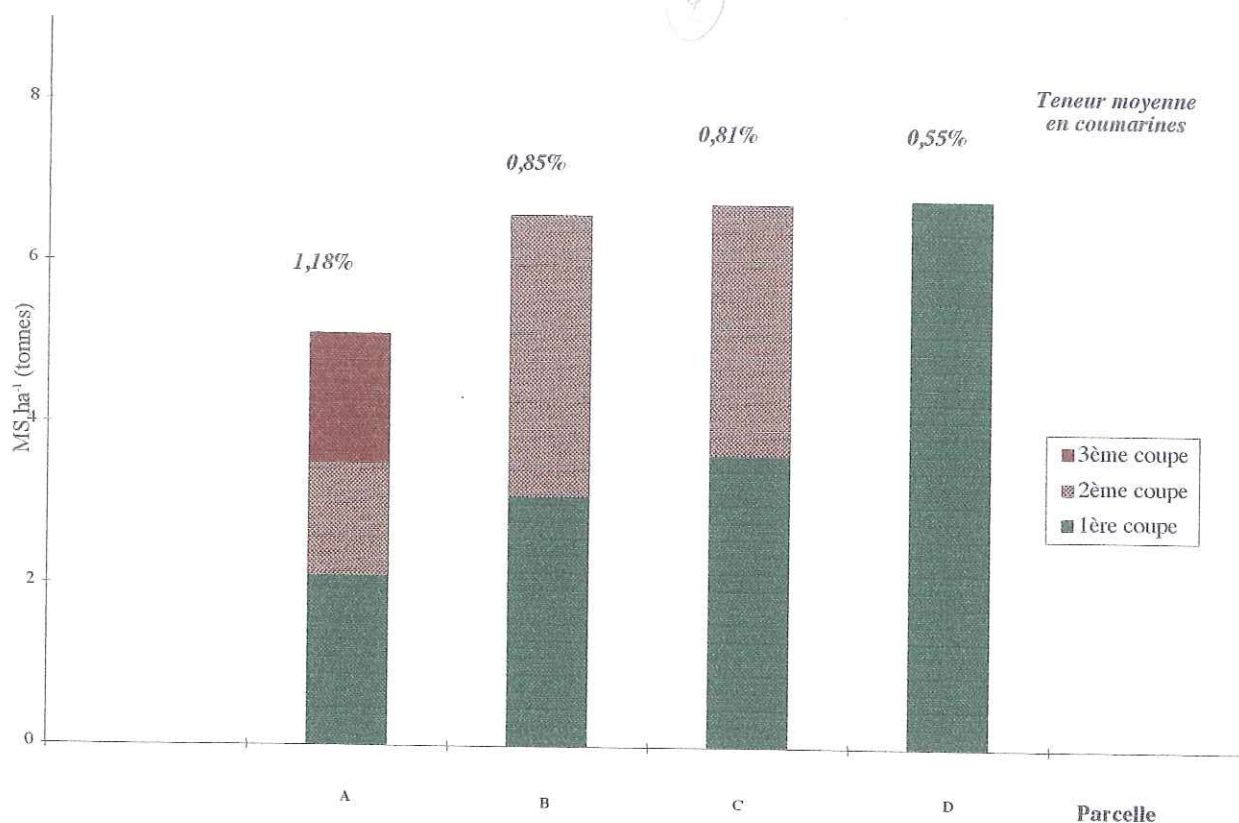
#### \* Dates de coupes

Les résultats des deux essais menés à Colmar en 1992 et à Luttenbach en 1993 sont présentés **Figure 75**.

En 1992 et 1993, les deux premières récoltes sont positionnées approximativement aux mêmes dates. La troisième coupe est légèrement plus tardive sur le site de Luttenbach en 1993.

Le rendement moyen en matière sèche des trois coupes est inférieur lorsque la première coupe a lieu lors du bourgeonnement. En effet, dans ce cas, les troisièmes coupes sont effectuées environ 15 jours plus tôt que lorsque la première coupe a lieu à la floraison. La modalité "première récolte au bourgeonnement" bénéficie de 15 jours de plus de production en matière sèche. Cependant, le rendement de la troisième coupe est faible (200 à 500 Kg ha<sup>-1</sup>).

En ce qui concerne les teneurs en coumarines par coupe ou en moyenne sur les trois coupes, elles sont toujours plus élevées (supérieures à 1%) lorsque la première coupe est précoce. En effet, les plantes récoltées sont plus jeunes donc à plus forte teneur.



| Dates                                     |             |             |             |             |
|-------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1ère coupe                                | 22/05/95    | 23/05/95    | 1/06/95     | 27/06/95    |
| 2ème coupe                                | 27/06/95    | 10/07/95    | 12/07/95    |             |
| 3ème coupe                                | 2/08/95     |             |             |             |
| Rendement g de coumarines m <sup>-2</sup> |             |             |             |             |
| 1ère coupe                                | 2,27 ± 0,12 | 3,35 ± 0,1  | 3,1 ± 0,32  | 3,76 ± 1,01 |
| 2ème coupe                                | 1,59 ± 0,39 | 2,25 ± 0,45 | 2,36 ± 0,4  |             |
| 3ème coupe                                | 2,14 ± 0,08 |             |             |             |
| Total                                     | 6,00 ± 0,38 | 5,6 ± 0,59  | 5,46 ± 0,44 | 3,76 ± 1,01 |
| % DE COUMARINES                           |             |             |             |             |
| 1ère coupe                                | 1,18 ± 0,07 | 0,85 ± 0,09 | 0,81 ± 0,07 | 0,55 ± 0,15 |
| 2ème coupe                                | 1,08 ± 0,06 | 1,08 ± 0,06 | 0,86 ± 0,09 | 0,55 ± 0,15 |
| 3ème coupe                                | 1,14 ± 0,28 | 0,64 ± 0,13 | 0,75 ± 0,13 |             |
|                                           | 1,34 ± 0,05 |             |             |             |

Figure 76 : Coupes sur semis d'automne de 1994 à VARIZE

Par contre,

*le rendement total en coumarines par parcelle est pratiquement identique quel que soit le mode de gestion de cette parcelle. Le choix du positionnement de la première coupe "au bourgeonnement" ou à la floraison s'effectuera donc suivant des critères d'ordre économique ou technique.*

Comme le facteur limitant de la chaîne de production industrielle de mélilot (à Varize) est le séchage, un échelonnement dans le temps des récoltes permettrait d'augmenter la production sans avoir à investir dans un nouveau séchoir. De plus, cette pratique échelonne dans le temps les travaux de récolte jusqu'à présent entièrement réalisés mi-juin, c'est-à-dire à la floraison.

Les résultats de l'essai "coupes sur semis d'automne", mené à Varize sont présentés **Figure 76**.

Quatre modalités de coupes ont été testées. Suivant le positionnement de la première coupe, une à trois coupes ont pu être effectuées sur la même parcelle. Les modalités B, C, D permettent le même rendement en matière sèche. Deux coupes donnent le même rendement en matière sèche qu'une seule coupe réalisée fin juin mais la teneur en coumarines augmente lorsque l'intervalle entre coupe diminue car les plantes récoltées sont plus jeunes. Si on effectue trois coupes consécutives sur la même parcelle, tous les mois (de fin mai à fin juillet), on peut à la fois doubler la teneur en coumarines du matériel récolté (par rapport à une seule coupe effectuée à la floraison) et échelonner le temps de travail. Cependant, dans ce cas, on diminue le rendement en matière sèche de 25%.

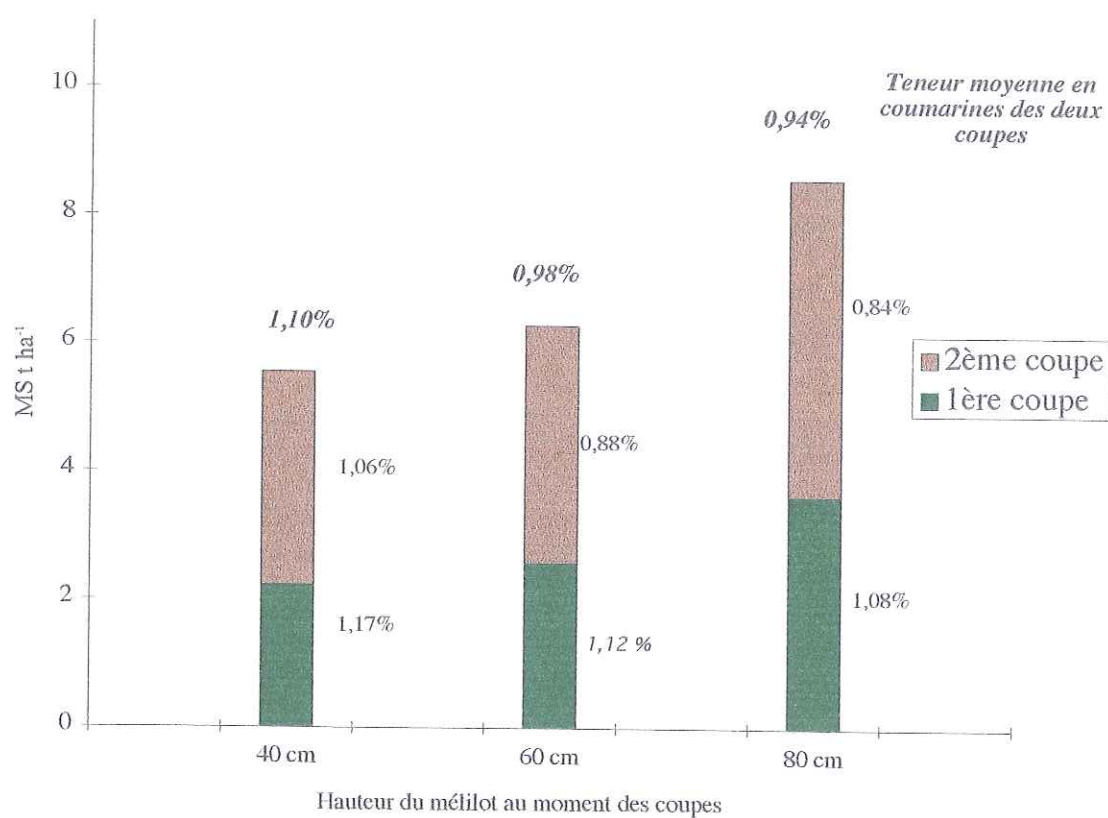
Ces résultats viennent confirmer ceux obtenus précédemment. En effet, nous concluons également que :

*sur semis d'automne, pour produire du mélilot à forte teneur en coumarines, il est conseillé de récolter précocement (avant le stade bourgeonnement) et d'effectuer plusieurs coupes à environ 1 mois d'intervalle.*

En 1996, une modalité de coupe plus précoce sera testée sur semis d'automne (première coupe à l'état végétatif) en envisageant une quatrième coupe.

*Suivant l'offre du marché, c'est-à-dire selon si le prix de vente tient compte ou non de la qualité, il sera possible de choisir entre la production d'un matériel à forte teneur en coumarines (supérieure à 1%) en 3 ou 4 coupes ou d'un matériel de moindre qualité en 2 coupes.*

Considérant les résultats déjà acquis sur repiquage de printemps (cf. 3.2.1.2), un autre itinéraire technique a été testé pour récolter du matériel végétal jeune et échelonner les récoltes.



| Dates                         |             |             |             |
|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| 1ère coupe                    | 30/06/95    | 10/07/95    | 18/07/95    |
| 2ème coupe                    | 21/08/95    | 6/09/95     | 15/09/95    |
| Rendement g de coumarines m-2 |             |             |             |
| 1ère coupe                    | 6,12 ± 0,27 | 6,15        | 8,10 ± 0,75 |
| 2ème coupe                    | 2,59 ± 0,41 | 3,27 ± 0,78 | 3,92 ± 0,64 |
|                               | 3,53 ± 0,22 |             | 4,18 ± 0,18 |
| % DE COUMARINES               |             |             |             |
| 1ère coupe                    | 1,1 ± 0,05  | 0,98        | 0,94 ± 0,09 |
| 2ème coupe                    | 1,17 ± 0,18 | 1,12*       | 1,08 ± 0,18 |
|                               | 1,06 ± 0,06 | 0,88 ± 0,21 | 0,84 ± 0,04 |

Figure 77 : Hauteur de coupe sur semis de printemps à VARIZE (essai 1)

\* valeur estimée

Bien que ne répondant pas aux normes de la pharmacopée française, la production de mélilot de qualité, à partir d'un semis de printemps exploité dès la première année, est envisagée.

#### 3.2.4.3 STADES DE COUPES SUR SEMIS DE PRINTEMPS

*Objectif :*

*\* Définir le stade de coupe optimal sur semis de printemps*

Les stades phénologiques *ante* bourgeonnement du mélilot n'étant pas définis de façon précise, la hauteur servira de critère de référence.

##### 3.2.4.3.1 Matériel et méthodes

Deux essais ont été mis en place sur *semis de printemps* en 1995 à Varize avec une origine allemande (fournisseur BORNTRAGER) semée le 31/03/95. La parcelle est irriguée. Les récoltes ont été effectuées sur 500 m<sup>2</sup> par modalité de coupe testée, à l'autochargeuse à une hauteur de 10 cm du sol (prélèvement de 4 échantillons de 1 Kg de matière sèche dans le séchoir par traitement).

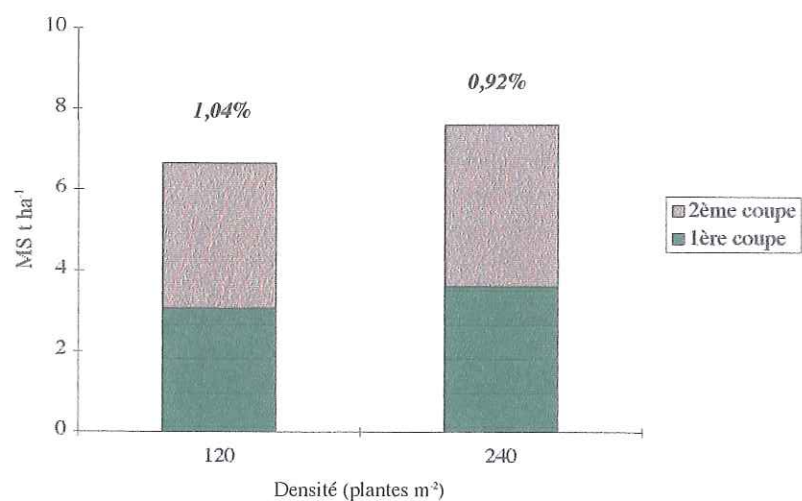
\* Essai 1 : On effectue chacune des deux coupes lorsque les plantes ont atteint respectivement 40, 60 et 80 cm aux deux coupes. Elles se font toujours à 10 cm du sol. La densité dans cet essai est de 136 pl. m<sup>-2</sup>.

\* Essai 2 : Deux coupes sont effectuées. La première lorsque les plantes mesurent 80 cm, la seconde lorsqu'elles ont 60 cm soit respectivement le 20/07/95 et le 6/09/95 sur des parcelles de densités 120 et 240 pl. m<sup>-2</sup>.

##### 3.2.4.3.2 Résultats et discussion

Les résultats du premier essai sont présentés **Figure 77**. Les échantillons de mélilot de la récolte effectuée sur des plantes de 60 cm n'ont pu être prélevés. Du fait de la bonne homogénéité de ces résultats, nous nous permettons d'extrapoler la valeur moyenne de la teneur en coumarines à ce stade de coupe à partir des deux valeurs qui l'encadrent. Nous lui attribuerons donc arbitrairement une teneur de 1,12%.

Le rendement en matière sèche est le plus important lorsque les plantes sont coupées quand elles atteignent 80 cm. Cependant, la teneur moyenne du matériel végétal récolté est alors très légèrement inférieure. Cette modalité donne un bon rendement à l'hectare la première année (plus de 8 tonnes de matière sèche).



| Dates                            |             |             |
|----------------------------------|-------------|-------------|
| 1ère coupe                       | 20/07/95    | 21/07/95    |
| 2ème coupe                       | 6/09/95     | 6/09/95     |
| Rendement<br>g de coumarines m-2 |             |             |
| 1ère coupe                       | 3,46 ± 0,11 | 3,5 ± 0,26  |
| 2ème coupe                       | 3,46 ± 0,07 | 3,48 ± 0,36 |
| % DE COUMARINES                  |             |             |
| 1ère coupe                       | 1,13 ± 0,04 | 0,97 ± 0,07 |
| 2ème coupe                       | 0,96 ± 0,02 | 0,87 ± 0,09 |

Figure 78 : Coupes sur semis de printemps à VARIZE

Cette expérimentation sera poursuivie en 1996, ces plantes devant continuer à se développer en seconde année de culture.

L'exploitation du *semis de printemps* permet d'échelonner le travail et de rallonger la période de production du mélilot, la deuxième et dernière récolte se tenant le 6/09/95.

*Sur semis de printemps, il est conseillé d'effectuer 2 coupes lorsque les plantes atteignent 80 cm.*

Ces conditions permettent de récolter plus de 8 T ha<sup>-1</sup> de mélilot de bonne qualité (teneur en coumarines supérieure à 0,9%), tout en échelonnant les dates de récoltes.

Cependant, pour déterminer le réel intérêt du semis de printemps, il faudrait vérifier si le rendement en coumarines obtenu sur une parcelle de semis de printemps coupée deux fois la première année et éventuellement trois fois la seconde année est supérieur à celui provenant de trois à quatre coupes sur semis d'automne.

*Dans le cas d'un rendement identique ou supérieur et dans la mesure où cela peut être accepté par la pharmacopée, il serait conseillé de semer au printemps une partie de la surface consacrée au mélilot sur l'exploitation.*

En vue d'augmenter les rendements sur semis de printemps, deux densités ont été comparées (**Figure 78**). Il n'y a pas de différences significatives entre les densités testées pour les rendements moyens en matière sèche et en coumarines.

La conclusion définitive de cette étude sera donnée par rapport aux résultats obtenus en seconde année de culture en 1996. En effet, la population semée à la densité de 240 pl. m<sup>-2</sup> a tendance à donner un pourcentage de GOHCA *trans* plus élevé que la densité 120 pl. m<sup>-2</sup> (vraisemblablement du fait d'un auto-ombrage plus important à forte densité) la première année.

#### 3.2.4.4 CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons pu appliquer les données écophysiologiques obtenues préalablement (cf. 3.2) et transposer les résultats acquis de l'échelle expérimentale à l'échelle agricole.

La pharmacopée française préconise l'utilisation des *sommités fleuries* de mélilot vraisemblablement en raison :

- d'une bonne détermination de l'espèce à la floraison, ce qui limite les risques de falsification ;
- d'une bonne teneur en coumarines dans ces organes.

Nous avons pu cependant montrer que la qualité du mélilot issu d'un semis de printemps récolté en première année, au stade végétatif est pratiquement aussi bonne que celle d'un mélilot provenant d'un semis d'automne récolté à la floraison.

| Essai          | Semis            | Densité<br>pl. m <sup>-2</sup> | Nombre<br>de<br>coupes | Modalité<br>1ère coupe | Rendement<br>en T ha <sup>-1</sup><br>par modalité | Teneur<br>en<br>coumarine<br>libre | Indice de<br>productivité<br>en coumarine<br>libre |
|----------------|------------------|--------------------------------|------------------------|------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------|
| <b>Coupes</b>  | <b>automne</b>   | 76                             | 3                      | le 22/05/95            | 5,1                                                | 0,99                               | <b>165</b>                                         |
|                |                  |                                | 2                      | le 23/05/95            | 6,59                                               | 0,71                               | <b>153</b>                                         |
|                |                  |                                | 2                      | le 1/06/95             | 6,74                                               | 0,68                               | <b>150</b>                                         |
|                |                  |                                | 1                      | le 27/06/95            | 6,8                                                | 0,45                               | <b>100*</b>                                        |
| <b>Hauteur</b> | <b>printemps</b> | 136                            | 2                      | 40 cm                  | 5,55                                               | 0,99                               | <b>179</b>                                         |
|                |                  |                                | 2                      | 60 cm                  | 6,28                                               | 0,85                               | <b>174</b>                                         |
|                |                  |                                | 2                      | 80 cm                  | 8,58                                               | 0,81                               | <b>227</b>                                         |
| <b>Densité</b> | <b>printemps</b> | 120                            | 2                      |                        | 6,65                                               | 0,9                                | <b>196</b>                                         |
|                |                  | 240                            | 2                      |                        | 7,61                                               | 0,78                               | <b>194</b>                                         |

Tableau 13 : Synthèse économique des essais menés à Varize. Les calculs sont effectués sur la base des prix du marché en 1995.

\* l'indice est calculé à partir du revenu dégagé par une récolte "classique" : récolte à la floraison sur semis d'automne. Cependant, la donnée utilisée dans ce cas intègre déjà l'amélioration de la teneur en coumarine libre apportée par l'optimisation des techniques de séchage.

Ce mode de production couplé (semis d'automne et semis de printemps) permettrait de produire du mélilot de mi-mai à début septembre.

L'agriculteur peut également jouer sur la date et la hauteur de coupe et ainsi :

- disposer d'une grande souplesse de production suivant un choix de rendement ou de qualité,
- échelonner ses interventions en fonction du temps disponible,
- valoriser ses investissements (installation de séchage, broyage...).

*Les résultats des études sur l'exploitation de la parcelle de mélilot en coupes multiples, sur semis d'automne ou de printemps, donnent au producteur un outil d'aide à la décision. En effet, à partir des contraintes techniques (temps de travail, disponibilité du séchoir..) et économiques (meilleure marge brute par hectare liée au prix du mélilot, aux coûts de récolte et de séchage, aux subventions accordées aux jachères...), il peut déterminer l'itinéraire technique le mieux adapté.*

Dans le cas d'une rémunération du mélilot dépendant de sa teneur en coumarine libre, il est possible de comparer les différents itinéraires techniques en fonction du revenu qu'elles dégagent. Une synthèse économique des essais menés à Varize est ainsi présentée

**Tableau 13.**

En attendant les résultats complémentaires de 1996, on peut temporairement conclure que :

*le meilleur itinéraire technique (indépendamment des critères de la pharmacopée) consiste à effectuer 2 coupes à 10 cm du sol, sur des plantes mesurant 80 cm en première année d'un semis de printemps.*

*Si on tient compte des contraintes imposées par la pharmacopée, 3 coupes peuvent être effectuées à un mois d'intervalle, sur un semis d'automne, la première coupe étant positionnée au stade du bourgeonnement.*

Ces résultats seront "affinés" en 1996, notamment dans le choix d'une densité optimale et d'une coupe à l'état végétatif, en semis d'automne.

*Le choix d'un itinéraire technique adapté nous a permis par des moyens agronomiques, de doubler les teneurs en coumarines et d'atteindre ainsi les objectifs fixés pour cette étude : la production à l'échelle industrielle de mélilot à plus de 0,7% de coumarine libre en maintenant voire en augmentant le rendement en matière sèche.*

### 3.3 CONCLUSION GÉNÉRALE

Le mélilot (*Melilotus officinalis* L.) est une plante médicinale dont l'extrait entre dans la composition de quelques médicaments vasculotropes. La qualité de cet extrait est définie en fonction de sa teneur en coumarine libre. C'est pourquoi l'industrie pharmaceutique recherche de la drogue dont la teneur en principe actif est la plus élevée possible. Cependant, la coumarine libre n'existe pas en tant que telle dans le mélilot frais ; elle est stockée dans les vacuoles sous forme de GOHCA *trans* et *cis*. La somme de ces deux glucosides exprimée en coumarine libre est appelée dans ce travail dérivés coumariniques, la somme des dérivés coumariniques et de la coumarine libre, notée coumarines. Le GOHCA *trans* est isomérisé sous l'action des U.V. en GOHCA *cis* qui peut être hydrolysé (au moment ou après la récolte) par une  $\beta$  glucosidase intercellulaire en coumarine libre.

Le programme de recherche sur le mélilot a débuté en 1990 avec pour objectif la maîtrise de la production de matière sèche renfermant 0,7% de coumarine libre.

\* La première partie de ce travail a consisté à mettre au point, à l'échelle expérimentale, des techniques visant à optimiser la valorisation des dérivés coumariniques produits dans le mélilot et à caractériser et sélectionner le matériel végétal. L'activité pharmacologique des dérivés coumariniques étant à ce jour inconnue et dans la mesure où l'ensemble des travaux pharmacologiques concerne la coumarine libre, nous avons considéré que la forme recherchée et active est la coumarine libre. Dans ce cas, la valorisation de l'ensemble des dérivés coumariniques contenus dans le matériel frais implique :

- l'isomérisation du GOHCA *trans* en GOHCA *cis*,
- l'hydrolyse du GOHCA *cis* en coumarine libre,
- la maîtrise des pertes avant l'extraction, notamment durant le séchage.

L'étude de l'influence du séchage sur la teneur en coumarine(s) nous a permis de valider des résultats obtenus en séchoir ventilé :

- un séchage à 25°C provoque des pertes en coumarines ;
- 60°C constitue une température optimale de séchage, en raison des faibles pertes et d'une hydrolyse quasi complète du GOHCA *cis*.

De plus, nous avons montré que la lyophilisation et le séchage aux micro-ondes n'induisent pas de pertes en coumarines. Toutefois, dans ce dernier cas, la  $\beta$  glucosidase est dénaturée, les coumarines présentes dans le mélilot sec sont alors à 97% sous forme de glucosides.

Le mode d'extraction joue également un rôle sur la teneur et la forme des coumarines contenues dans la drogue. Les techniques classiquement utilisées, d'une part sous-estiment souvent la teneur en coumarine libre (du fait de la polarité des solvants), d'autre part ne permettent pas le dosage du GOHCA *cis*. Une technique simple, rapide et reproductible a été mise au point. Elle assure l'extraction de l'ensemble des coumarines et une bonne transformation du GOHCA *cis* en coumarine libre.

La mise au point de ces conditions d'extraction a permis :

- de mieux connaître le devenir des glucosides au cours de la vie de la plante,
- de suivre l'effet des facteurs du milieu sur la teneur en coumarine libre et en ses deux glucosides.

\* La seconde partie de cette étude a consisté dans un premier temps à vérifier et approfondir les connaissances sur l'écophysiologie du mélilot, afin de mettre au point dans un second temps des techniques culturales en vue de l'obtention d'un matériel répondant à la qualité recherchée. Certains résultats comme ceux concernant le site de synthèse des coumarines confirment ce qui est décrit dans la littérature. D'autres constituent une avancée dans la compréhension des mécanismes de synthèse et de migration des coumarines dans la plante.

- Ainsi, la forte variation de poids observée entre les plantes issues de multiplication végétative *in vitro*, repiquées *in situ* et récoltées à des dates différentes, nous a permis de mettre en évidence que, pour un génotype donné, la teneur en coumarines est fonction de l'âge de la plante. Elle est indépendante de son poids. En effet, à un âge donné, la plante possède un rapport entre organes constant (indépendant de son poids) et une teneur en coumarines définie pour chaque organe.

Cette constatation nous a donc amenés à remettre en cause les techniques utilisées pour étudier la variabilité génétique.

- De plus, nous avons pu montrer que les coumarines migrent sous forme de glucosides, en fin de première année de culture, des feuilles vers les racines. En seconde année, les coumarines synthétisées dans les feuilles migreraient vers les fruits. Il existe donc, comme dans le cas des métabolites primaires, des relations "source" - "puits" entre les organes. Du fait de la similitude des organes "sources" et des organes "puits" des réserves carbonées et des coumarines, on peut penser que les dérivés coumariniques sont mobilisés avec les autres glucides. Ces données pourraient être confirmées et affinées par le suivi de molécules marquées dans la plante.

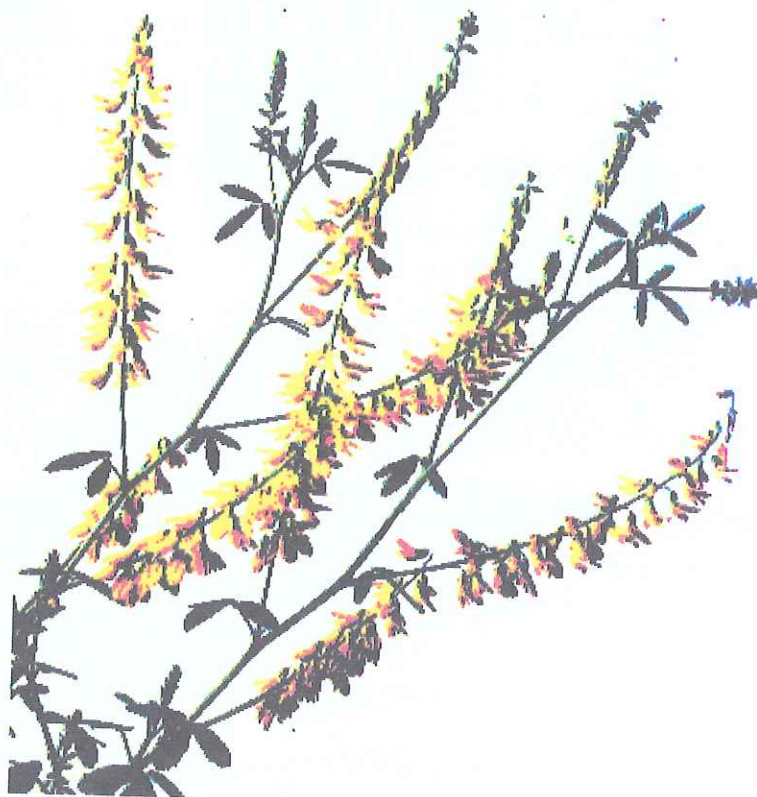
- A plusieurs reprises au cours de ces recherches, nous avons mis en évidence que les organes photosynthétiquement actifs, notamment les feuilles, jouaient un rôle important dans la synthèse de coumarines. Il semble que cette synthèse soit à la fois influencée par la quantité et la qualité de la lumière. Cependant, il n'a pu être déterminé si la baisse de teneur observée sur des plantes ombrées est liée à une action directe de la lumière sur la synthèse des coumarines ou à une action indirecte sur le métabolisme primaire. Cependant, nous avons montré que l'application de lumière rouge augmente légèrement la teneur en coumarines. L'augmentation du rapport rouge clair / rouge sombre pourrait intervenir par le biais des phytochromes sur la régulation de la PAL mais cette hypothèse reste à tester.

- Néanmoins, nous avons montré que la densité en culture (qui peut modifier la qualité de la lumière) n'intervient pratiquement pas sur la teneur en coumarines.

\* La troisième partie de ce travail a permis de valider et d'appliquer à l'échelle industrielle les résultats obtenus au niveau expérimental. Ainsi, nous sommes arrivés à transformer environ 95% du  $\beta$  GOHCA *cis* en coumarine libre, en effectuant une récolte à l'ensileuse et en utilisant une température élevée (80°C) lors de la première phase du séchage. Ces deux techniques favorisent le contact enzyme - substrat. La production de matériel végétal à forte teneur en coumarines a été obtenue par un système de coupes multiples, effectuées sur une même parcelle. Cette technique permet non seulement récolter des plantes ou des parties de plantes "jeunes", (donc à forte teneur en coumarines) mais également d'échelonner la récolte. L'augmentation du rendement en matière sèche par unité de surface est possible en optimisant les densités (une forte densité de 100 à 150 pl. m<sup>-2</sup> est conseillée) : le matériel végétal récolté dans ces conditions possède une teneur en coumarine libre supérieure à 0,7%.

Les objectifs fixés au début de ce programme de recherche ont été atteints. Nous avons pu valider sur l'exemple du mélilot une démarche d'amélioration de la qualité d'une plante médicinale (Figure 1). Pour cela, il s'est avéré indispensable de créer un lien entre différentes disciplines. Ce type d'étude nécessite en effet, une vue globale sur l'ensemble de la filière et implique de pouvoir comprendre et maîtriser de nombreux facteurs influençant la qualité aux différents niveaux d'organisation impliqués (du champ à la molécule). Cependant, cette démarche connaît des limites, son succès réside en grande partie dans l'existence de connaissances (ou dans la possibilité de les acquérir suffisamment rapidement en début de programme de recherches) sur les molécules recherchées, leur voie de biosynthèse et leur mode de dosage. A l'heure où les recherches sont souvent pointues, l'intérêt et l'avenir de cette démarche sont liés à sa capacité d'intégrer les problèmes rencontrés par chacun des acteurs de la filière et d'en comprendre les fondements afin de proposer des solutions pratiques dans le but de produire de façon maîtrisée des molécules intéressant la thérapeutique.

# Bibliographie



- (1986). Steinklee *Meliloti herba*. Dtsch. Apoth. Ztg. 126, 620.
- AKESON, W. R., GORZ, H. J., and HASKINS, F. A. (1963). Effect of genotype and growth stage on distribution of melilotic acid, o-coumaric acid, and coumarinic acid in *Melilotus alba* Desr. Crop Sci. 3, 167- 171.
- ALIBERT, G. (1977). Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. Physiol. Veg. 15, 279- 301.
- ALLEN, J. P. (1959). Physiology and biochemistry of defense. In "Plant pathology", Vol. 1, . 435-467. Academic Press, New York.
- ALLEN, O., and ALLEN, E. K. (1981). "The Leguminosae. A source book of characteristics, uses and nodulation," The University of Wisconsin Press, Madison.
- ALLORGE, L., and PLUMEL, M. M. (1984). De la préparation des herbiers à celle des plantes médicinales au moyen du four à micro-ondes. Ann. Pharm. Fr. 42, 4, 313- 315.
- ARORA, N. D. (1970). Chemical composition and correlation studies of *Melilotus alba* and *parviflora*. H.A.U. J. Res. 1, 97-100.
- ASHTON, W. M., and JONES, E. (1959). Coumarin and related compounds in sweet vernal. J. Br. Grassl. Soc. 14, 47-54.
- BEHR, G. (1957). Kritische Untersuchungen zur Bestimmung von Cumarin, Melilotsäure und Cumarsäure in Pflanzenteilen. Angewandte Botanik 31, 3, 63- 72.
- BENNETT, J. W. (1995). From molecular genetics and secondary metabolism to molecular metabolites and secondary genetics. Can J Bot 73, 917-924.
- BERKENKAMP, B. (1971). Effect of coumarin on some pathogens of sweetclover. Can. J. Plant Sci. 51, 299-303.
- BERNATH, J. (1976). Effects of light intensity and spectrum composition on the formation of steroidal alkaloids. Herb. Hung. 15, 43.
- BERNATH, J., and TETENYI, P. (1979). The effect of environmental factors on growth, development and alkaloid production of poppy (*Papaver somniferum* L.) I. Responses to daylength in light intensity. Biochem. Physiol. Pflanzen. 174, 468.
- BERNATH, J., and TETENYI, P. (1979). Alteration in compositional character of poppy chemotaxa affected by different light and temperature conditions. Planta Med. 36, 230.
- BERNATH, J., and TETENYI, P. (1980). Alteration in compositional character of poppy chemotaxa affected by different light and temperature conditions. Acta Hort. 96, 91-99.
- BERNATH, J., and TETENYI, P. (1981). The effect of environmental factors on growth, development and alkaloid production of poppy (*Papaver somniferum* L.) II. Interaction on light and temperature. Biochem. Physiol. Pflanzen. 176, 599-605.
- BERNATH, J. (1991). Variation in essential oil spectrum of *Salvia* species affected by environment. Herb. Hung. 30, 1, 35-46.
- BEZANGER-BEAUQUESNE, L., PINKAS, M., TORCK, M., and TROTIN, F. (1990). *Melilotus officinalis*. In "Plantes médicinales des régions tempérées" (Maloine, ed.), . 188-189, Paris.
- BOLLER, T., and ALIBERT, G. (1983). Photosynthesis in protoplasts from *Melilotus alba* : Distribution of products between vacuole end cytosol. Z. Pflanzenphysiol. 110, 231-238.
- BOLWELL, G. P., BELL, J. N., CRAMER, C. L., SCHUCH, W., LAMB, C. J., and DIXON, R. A. (1985). L-Phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris* . Characterization and differential induction of multiple forms from elicitor-treated cell suspension cultures. Eur. J. Biochem. 149, 411- 419.
- BONNIER, G. (1990). Papillonacées. In "La grande flore en couleurs de Gaston Bonnier" (Belin, ed.), . 216-247, Paris.
- BOS, R., VAN PUTTEN, F. M. S., TITTEL, G., and WOERDENBAG, H. J. (1995). Annual congress on medicinal plant research. In "Isolation and characterization of secondary natural products", 68.
- BOURGAUD, F. (1990). Etude de la biologie de plantes du genre *Psoralea* (Légumineuses) productrices de furocoumarines à intérêt pharmaceutique. Essais de cultures *in vitro*, Thèse Nancy.
- BOURGAUD, F., POUTARAUD, A., and GUCKERT, A. (1994). Extraction of coumarins from plant material (Leguminosae). Phytochem. Anal. 5, 127- 132.
- BOURGAUD, F., BOUQUE, V., MARCHAL, S., INNOCENTI, G., F., D. A., and GUCKERT, A. (1995). Development of an enzyme immunoassay to detect and quantify psoralen and bergametin in plants. Phytochemical Analysis 6, 306-312.

- BOYAT, A., KAHN, F., and PANOUILLE, A. (1991). Adaptation de quatre types de variétés de maïs aux fortes densités de peuplement. In "Physiologie de la production du maïs". C.R. coll. 'La vie du maïs'. AGPM, Pau, 335-343.
- BRINK, R. A. (1934). A non-bitter variety of *Melilotus*. Science 79, 301.
- BROWN, S. A. (1977). Biochemistry of the coumarins. In "Biochemistry of plant phenolics", 249-285.
- BROWN, S. A. (1981). Coumarins. In "The biochemistry of plants . A comprehensive treatise" (E. E. CONN, ed.), Vol. 7, . 269-300. Academic Press.
- BRUNETON, J. (1993). In "Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales ." (Lavoisier, ed.), 915 p, Paris.
- CAMM, E. L., and TOWERS, G. H. N. (1973). Phenylalanine ammonia-lyase, a review. Phytochemistry 12, 961-973.
- CANUT, H., ALIBERT, G., and BOUDET, A. M. (1984). Isolation and biochemical characterisation of a cytosolic fraction from sweet clover protoplasts. Z. Pflanzenphysiol. 114, 3, 247-253.
- CAPITANIO, R., GENTINETTA, E., and MOTTO, M. (1983). Grain weight and its components in maize inbred lines. Maydica 28, 365-379.
- CASLEY-SMITH, J. R. (1982). Human trials of the benzo-pyrone in high-oedemas. Folia Angiol. 30, 31, 313-327.
- CASTANEDA, J. L., and QUINTERO, A. (1991). Regulation of phenylalanine ammonia-lyase PAL EC 3.2.1.5 activity by light in *Gomphrena globosa* tissue culture. Phyton 52, 2, 151-154.
- CESKA, O., CHUDHARY, S. K., WARRINGTON, P. J., and J., A.-S. H. M. (1987). Photoactive furocoumarins in fruits of some Umbellifers. Phytochemistry 26, 165-169.
- CHAMPIGNY, M. L. (1982). Relation entre photosynthèse et nutrition azotée. C. R. Seances Acad. Sci. 68, 882-891.
- CHAPPELL, J., and HAHLBROCK, K. (1984). Transcription of plant defence genes in response to UV light or fungal elicitor. Nature 311, 76-78.
- CHARTIER, M., ALLIRAND, J. M., and VARLET-GRANCHET, C. (1992). Le bilan radiatif d'un couvert végétal : ses composantes et leurs mesures. Cah. Techn. INRA 29, 17-40.
- CHUNG, B. (1990). Effects of plant population density and rectangularity on the growth and yield of poppies (*Papaver somniferum*). J. Agric. Sci. 115, 239-245.
- CLIQUET, J. B. (1990). Étude par l'utilisation des isotopes lourds, de la capacité de stockage de la tige de maïs pendant la montaison puis de la remobilisation de ces réserves vers l'épi. In "Compte rendu du colloque Physiologie et production Pau", Vol. 1, pp. 245- 251.
- COHEN, A. J. (1979). Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. Food Cosmet. Toxicol. 17, 277-289.
- COSSON, L. (1966). Influence of light on ontogenic variations of alkaloids in *Datura tatula*. J. Nat. Prod. 29, 19-25.
- COSSON, L. (1969). Effect of light on the ontogenic variations in scopolamine and hyoscyamine levels of *Datura metel* leaves. Phytochemistry 8, 2227-2233.
- COSSON, L., and KUNTMANN-COUGOUL, N. (1979). Regulation and metabolism of tropane alkaloids (hyoscamine and scopolamine) in *Dubiosa myoporoides* R. Br. and *Datura* cultivated in controlled conditions. Herba Hung. 18, 135-141.
- CRUICKANSHANK, I. A. M. (1963). Phytoalexins. Ann. Rev. phytopathol. 1, 351-374.
- CUNHA, A. (1988). Purification, characterization and induction of L-phenylalanine ammonia-lyase in *Phaseolus vulgaris*. Eur. J. Biochem. 178, 1, 243-248.
- CZAPPEK, F. (1913-1921). "Biochemie der Pflanzen," G. Fischer, Gena.
- CZICHI, U., and KINDL, H. (1977). Phenylalanine ammonia-lyase and cinnamic-acid hydrolases as assembled consecutive enzymes on microsomal membranes of cucumber cotyledons : cooperation and subcellular distribution. Planta 134, 2, 133-143.
- DELAVEAU, P. (1984). Mélilot. Tempo medical Mars, 69.
- DESMONS, F., and SIMONS, M. (1975). A propos de l'action d'une préparation associant extrait de mélilot et rutine hydrosoluble sur les troubles trophiques des membres inférieurs d'origine vasculaire. Lille médical 3, 20, 76-78.
- DESMOTES-MAINARD (1994). Effets de rayonnements faibles et de températures basses à la méiose sur la fertilité gamétique du blé tendre d'hiver, Thèse INA Paris - Grignon.
- DOMBROWICZ, E. (1991). Phenolics acids in herb *Melilotus officinalis*. Pharmazie 46, 156-157.

- DURAND, R. (1969). Signification et portée des sommes de températures. Bull. Techn. Info. 238, 185-190.
- ENGELSMA, G. (1972). A possible role of divalent manganese ions in the photoinduction of phenylalanine ammonia-lyase. Plant Physiol. 50, 599-602.
- ENGELSMA, G. (1979). Effect of daylength on phenol metabolism in leaves of *Salvia occidentalis*. Plant Physiol. 63, 765-768.
- ENRIQUEZ, R. G., ROMERO, M. L., ESCOBAR, L. I., P., J.-N., and REYNOLDS, W. F. (1984). Hight performance liquid chromatographic study of *Casimiroa edulis*. II. Determination of furocoumarins. J. Chromatogr. 287, 209-214.
- FOLDESI, D., and SVAB, J. (1969). Herba Hung. 8, 81-92.
- FOLDESI, D. (1975). An experiment of producing medicinal plant drugs by microwave energy. Herba Hung. 14, 2, 75-81.
- FOLDI, M., and ZOLTAN, O. T. (1965). La thrombophlébite expérimentale et sa thérapie. Arzneim. Forsch. 15, 8, 901-903.
- FOLDI, M., and ZOLTAN, O. T. (1970). Das Lernvermögen bei der experimentellen lymphogenen Encephalopathie unter dem Einfluss von Cumarin aus *Melilotus officinalis*. Arzneim. Forsch. 20, 11A, 1614-1633.
- FOLDI-BORCOK, E., BEDALL, F. K., and RAHLFS, V. W. (1971). The anti-inflammatory and anti-edema effects of coumarin from *Melilotus officinalis*. Arzneim. Forsch. 21, 2025-2030.
- FOURY, A. (1954). Distinction des espèces étudiées dans le genre *Melilotus* Mill. Cah. Rech. Agron. 3, 178-200.
- FRANZ, C. (1975). Influence of ecological factors on the essential oils and flavonoids of two camomile cultivars. Effect of light and temperature. Planta Med. 27, 46-52.
- GANTET, P. (1993). Light and developmental regulation of the anp-controlled anthocyanin phenotype of bean pods. Theor. Appl. Genet. 87, 1-8.
- GARNIER, G., L., B.-B., and G., D. (1961). *Melilotus officinalis* L. In "Ressources médicinales et flore française", 786-790. Vignot frères, Paris.
- GEISSMAN, T. A., and CROUT, D. H. G. (1969). "Organic chemistry of secondary plant metabolism," Freeman, Cooper and Co., San Francisco.
- GELCINSKAJA, R. B., and BORDUNOVA, M. A. (1936). Breeding coumarin free sweet clover. Herb. Abstr. 6, 116.
- GENGENBACH, B. G., HASKINS, F. A., and GORZ, H. J. (1969). Genetic studies of induced mutant in *Melilotus alba*. I. Short-internode dwarf, curled leaf, multifoliolate leaf and cotyledonary branching. Crop Sci. 9, 607-610.
- GESTNER, B., and CONN, E. E. (1974). The 2-Hydroxylation of trans-cinnamic acid by chloroplasts from *Melilotus alba* Desr. Arch. Biochem. Biophys. 163, 617-624.
- GILCHRIST, D. G., HASKINS, F. A., and GORZ, H. J. (1970). Comparison of protein constituents relating to  $\beta$ -glucosidase activity in BB and bb inbred lines of *Melilotus alba*. Genetics 66, 339-347.
- GIRARDIN, P., TOLLENAAR, M., and DELTOUR, A. (1985) Effect of temporary N starvation in maize leaf senescence. Can. J. Plant Sci. 54, 4 819-829
- GIRARDIN, P., TOLLENAAR, M., and MULDOON, J. F. (1985). Effect of temporary N starvation on leaf photosynthetic rate and chlorophyll content of maize. Can. J. Plant Sci. 65, 491-500.
- GIRARDIN, P. (1992). Leaf azimuth in maize canopies. Eur. J. Agron. 1, 92-97.
- GIRARDIN, P., and TOLLENAAR, M. (1994). Effects of intraspecific interference on maize leaf azimuth. Crop Sci. 34, 151-155.
- GOLPEN, B. P., GREENSHIELDS, J. E. R., and WHITE, W. J. (1956). Selection techniques in screening for coumarin-deficient sweet clover plant. Can. J. Bot. 34, 711-719.
- GOLPEN, B. P., GREENSHIELDS, J. E. R., and BAENZIGER, H. (1957). The inheritance of coumarin in sweetclover. Can. J. Bot. 35, 583-593.
- GOLPEN, B. P. (1971). Yukon sweetclover. Can. J. Plant Sci. 51, 178-179.
- GOLPEN, B. P. (1971). Polara, a low coumarin of sweetclover. Can. J. Plant Sci. 51, 249-251.
- GOLPEN, B. P. (1979). Sweetclover production in Western Canada. (A. Canada, ed.), 1-13, Ottawa.
- GOLPEN, B. P. (1981). Norgold - a low coumarin yellow blossom sweetclover. Can. J. Plant Sci. 61, 1019-1021.

- GORZ, H. J., and HASKINS, F. A. (1962). Translocation of coumarin across a graft union in sweetclover. *Crop Sci.* 2, 255-257.
- GORZ, H. J., and HASKINS, F. A. (1964). Occurrence of o-hydroxycinnamic acid in species of *Melilotus* and *Trigonella*. *Crop Sci.* 4, 193-196.
- GORZ, H. J., and HASKINS, F. A. (1969 a). Absence of dominance of the Cu gene in influencing o-hydroxycinnamic acid content in *Melilotus alba*. *Crop Sci.* 9, 79-81.
- GORZ, H. J., and HASKINS, F. A. (1969 b). Contamination in Denta sweetclover during successive generations of seed increase. *Crop Sci.* 9, 367-369.
- GORZ, H. J., and HASKINS, F. A. (1971). Cross-fertilisation in *Melilotus alba*. *Crop Sci.* 11, 767-768.
- GORZ, H. J., HASKINS, F. A., MANGLITZ, G. R., SMITH, R. R., and VOGEL, K. P. (1992). Registration of N28 and N29 sweetclover germplasms. *Crop Sci.* 32, 510-511.
- GOUD, K. V. (1991). Photoregulation of phenylalanine ammonia-lyase is not correlated with anthocyanin induction in morphogenetic mutants of tomato. *Plant Cell Physiol.* 32, 8, 1251-1258.
- GREENWOOD, D. J. (1990). Decline in percentage N of C3 and C4 crops with increasing plant mass. *Ann. Bot.* 66, 425-436.
- GRIGG, G. W. (1978). Genetic effects of coumarins. *Mutat. Res.* 47, 161-181.
- GRONING, R., and JANSKE, U. (1987). Disinfestation of dried plant material by microwaves. *Pharm. Ind.* 49, 2, 197-200.
- GUIAMET, J. J. (1989). Modulation of progressive leaf senescence by the red, far red ratio of incident light. *Botanical gazette* 150, 2, 148- 151.
- GUPTA, S. (1974). The distribution of total alkaloids and major components in the different organs of *Datura metel* var *fastuosa* at various stages of growth. *Planta Med.* 23, 370-376.
- HAHLBROCK, K. (1976). Coordinated induction and subsequent activity changes of two groups of metabolically interrelated enzymes. Light-induced synthesis of flavonoid glycosides in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense*. *Eur. J. Biochem.* 61, 199-206.
- HAHLBROCK, K., and SCHEEL, D. (1989). Physiology and molecular biology of the phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40, 347 - 369.
- HAMDI, S., CRECHE, J., GARNIER, F., MARS, M., DECENDIT, A., GASPAR, T., and RIDEAU, M. (1995). Cytokinin involvement in the control of coumarin accumulation in *Nicotiana tabacum*. Investigations with normal and transformed tissues carrying the isopentyl transferase gene. *Plant Physiol. Biochem.* 33, 283-288.
- HAMMOUDA, F. M., RIZK, A. M., SEIF EL-NASR, M. M., ABOU-YOUSSEF, A. A., GHALEB, H. A., MADKOIR, M. K., PHOLAND, A. E., and WOOD, G. (1983). Flavonoids and coumarins of *Melilotus*. *Phytotherapia* 54, 249-255.
- HANDA, S. S., CHAWLA, A. S., and SHARMA, A. K. (1992). Plants with antiinflammatory activity. *Fitoterapia* 63, 1, 3-31.
- HARBORNE, J. B. (1977). In "Introduction to ecological biochemistry" (A. Press, ed.), London.
- HARBORNE, J. B., and INGHAM, J. L. (1978). Biochemical aspects of the coevolution of higher plants with their fungal pathogens. In "Biochemical aspect of plant and animal coevolution" (Harborne, ed.), . 343-405. Academic Press, London.
- HARBORNE, J. B. (1980). Plant phenolics. In "Secondary plant products" (Springer-Verlag, ed.), 337-341, Berlin Heidelberg New York.
- HARBORNE, J. B. (1989). Plants phenolics. Significance and role of phenylpropanoids. In "Methods in plant biochemistry" (Harborne, ed.), Vol. 1, . 79-85. Academic press.
- HARVEY, J. L. (1970). Patterns of assimilate translocation in *Trifolium repens*. *J. Br. Grassl. Soc.* 6, 181-186.
- HASKINS, F. A., and GORZ, H. J. (1961). A reappraisal of relationship between free and bound coumarin in *Melilotus*. *Crop Sci.* 1, 320-323.
- HASKINS, F. A., WILLIAMS, L. G., and GORZ, H. J. (1964). Light-induced *trans* to *cis* conversion of  $\beta$  glucosyl o-hydroxycinnamic acid in *Melilotus alba* leaves. *Plant Physiol.* 39, 777-781.
- HASKINS, F. A., and GORZ, H. J. (1965). Absence of dominance of the B gene in influencing  $\beta$  glucosidase activity in *Melilotus alba*. *Genetics* 51, 733-738.
- HASKINS, F. A., and KOSUGE, T. (1965). Genetics control of the metabolism of o-hydroxycinnamic acid precursors in *Melilotus alba*. *Genetics* 52, 1059-1068.

- HASKINS, F. A., and GORZ, H. J. (1970). Rapid detection of o-hydroxycinnamic acid and  $\beta$  glucosidase in *Melilotus alba*. Crop Sci. 10, 479-481.
- HASKINS, F. A., GORZ, H. J., and LEFFEL, R. C. (1972). Form and level of coumarin in Deer's tongue, *Trilisa odoratissima*. Econ. Bot. 26, 44-48.
- HASKINS, F. A., and GORZ, H. J. (1973). Influence of tissue drying on o-hydroxycinnamic acid content in sweetclover. Crop Sci. 13, 477-481.
- HAY, R. K. M., and WALKER, A. J. (1989). "An introduction to the physiology of crop yield," Longman.
- HEGNAUER, R. (1975). Secondary metabolites and crop plants. In "Crop genetic resources for today and tomorrow", . 249-265.
- HIGO, S., NAKAMURA, Y., and KAWASAKI, M. (1978). Effect of Esberiven ointment on wound healing. Oyo Yakuri 15, 2, 231-240.
- HODDINOTT, J., and HALL, L. M. (1982). The responses of photosynthesis and translocation rates to changes in the ratio of light. Canadian J. Bot. 60, 1285-1291.
- HONVATH, I. (1977). Effect of the spectral composition of light on dry matter production in *Solanum dulcamara* L. Ecotypes of different origin. Acta Agron., Acad. Sci. Hung. 26, 345-354.
- HOSEL, W., and CONN, E. E. (1982). The aglycone specificity of plant  $\beta$ -glucosidase. Trends Biochem. Sci. 7, 6, 219-221.
- HUAULT, C. (1969). L'action du phytochrome sur la régulation de la synthèse de la phénylalanine ammonia-lyase chez la plantule de moutarde (*Sinapis alba* L.) : un problème de biologie moléculaire, Thèse Rouen.
- INCONNU (1981). Le charançon du mélilot (*Sitonia cylindricolis*). Insect identification sheet 65, 1.
- INGHAM, J. L. (1976). Fungal modification of pterocarpin phytoalexins in *Melilotus alba* and *Trifolium pratense*. Phytochemistry 15, 1489-1495.
- INGHAM, J. L. (1978). Phytoalexin production by high- and low-coumarin cultivars of *Melilotus alba* and *Melilotus officinalis*. Can. J. Bot. 56, 2230-2233.
- ISELY, D. (1954). Keys to Sweet Clover (*Melilotus*). In "Proceedings of the Iowa academy of science", Vol. 61, . 119-131.
- IVANOVA, O. A. (1983). Influence de la longueur du jour sur les caractères morphologiques et biochimiques des espèces de mélilot. Tekh. Byull. Vses. Ordena 131, 43-47.
- IVIE, G. W. (1978). Linear furocoumarins (psoralens) from seeds of Texas *Ammi majus* L. (Büschop's Weed). J. Agric. Chem. 26, 1394-1403.
- JAQUIN-DUBREUIL, A. (1989). Comparison of the effects of a microwave drying method to currently used methods on the retention of morphological and chemical leaf characters in *Nicotiana tabacum* L. samsun. Taxon 38, 4, 591-596.
- JAYNES, T. A., HASKINS, F. A., GORZ, H. J., and KLEINHOF, A. (1972). Solubility of  $\beta$ -glucosidase in homogenates of sweetclover leaves and bean hypocotyls. Plant Physiol. 49, 277-279.
- JOHNSON, I. J. (1952). Effectiveness of recurrent for general combining ability in Sweetclover, *Melilotus officinalis*. Agron. J. 44, 476-481.
- JORRIN, J., and DIXON, R. A. (1989). Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). II Purification, characterization and induction of phenylalanine ammonia-lyase isoforms from elicitors-treated cell suspension cultures. Plant Physiol. 92, 447-455.
- JORRIN, J. (1990). L phenylalanine ammonia-lyase from sunflower hypocotyls: modulation by cinnamic acids. J. Plant Physiol. 136, 4, 415-420.
- KANG, S. S. (1987). Soyasapogenols B and E from *Melilotus officinalis*. Arch. Pharm. Res. 10,1, 9-13.
- KANG, S. S. (1988). Saponins and flavonoids glycosides from yellow sweetclover. Arch. Pharm. Res. 11, 3, 197-202.
- KANG, S. S., and WOO, W. S. (1988). Melilogenin, a new sapogenin from *M. officinalis*. J. Nat. Prod. 51, 335-338.
- KARNICK, C. R. (1972). The effect of photoperiod on steroidal sapogenins and other constituents in *Dioscorea deltoidea* Wall. Ann. Bot. 36, 605-610.
- KASPERBAUER, M. J., and BORTHWICK, H. A. (1964). Photoreversibility of stem elongation in *Melilotus alba* Desr. Crop Sci. 4, 42-44.
- KINDL, H. (1971). On the ortho-hydroxylation of aromatic carboxylic acids in higher plants. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 78-84.

- KLEINHOF, A. (1966). Relationship of phenylalanine ammonia-lyase activity to o-hydroxycinnamic acid content in *Melilotus alba*. Plant Physiology 41, 1276-1279.
- KLEINHOF, A. (1967). Trans-O-hydroxycinnamic acid glucosylation in cell-free extracts of *Melilotus alba*. Phytochemistry 6, 1313-1318.
- KOMOR, E. (1983). Phloem loading and unloading. Prog. Bot. 45, 68-75.
- KOSUGE, T., and CONN, E. E. (1959). The metabolism of aromatic compounds in higher plants I- Coumarin and O-coumaric acid. J. Biol. Chem. 234, 8, 2133-2137.
- KOSUGE, T., and CONN, E. E. (1961). The metabolism of aromatic compounds in higher plants III. The  $\beta$ -glucosides of o- coumaric, and melilotic acids. J. Biol. Chem. 236, 6, 1617-1621.
- KOSUGE, T. (1961). Studies on the identity of bound coumarin in sweet clover. Arch. Biochem. Biophys. 95, 211-218.
- KOUKOL, J., and CONN, E. E. (1961). J. Biol. Chem. 236, 2692.
- LAKE, B. G. (1994). Studies on the acute effects on coumarin and some coumarin derivatives in the rat. Food chem. Toxicol. 32, 4, 357-363.
- LAMB, C. J., and RUBERY, P. H. (1976). Photocontrol of chlorogenic acid biosynthesis in potato tuber discs. Phytochemistry 15, 665-668.
- LAMIABLE, D. (1993). Sensitive high performance liquid chromatographic method for the determination of coumarin in plasma. J. Chromatogr. 620, 2, 273-277.
- LANGUILLAT, N. (1989). Étude en double aveugle contre placebo de l'activité veinotonique d'Esberiven : évolution de l'hémodynamique musculaire des membres inférieurs appréciée grâce au xénon 133. Act. Med. Int. Angiologie 88, 5, 1-4.
- LEE, S., and ARONOFF, S. (1967). Boron in plants : a biochemical role. Science 158, 798-799.
- LEMAIRE, G. (1991). Nitrogen distribution within a lucerne canopy during regrowth : relation with light distribution. Ann. Bot. 68, 483-488.
- LIU, P. (1973). Influence of translocation on photosynthetic efficiency of Phaseolus vulgaris L. Plant Physiol. 52, 412-415.
- LOVKOVA, M. Y. (1981). "Biosintez i Metabolizm Alkaloidov v Rastenyakh (Alkaloid Biosynthesis and Metabolism in Plants)," Nauka, Moscow.
- LUCKNER, M. (1969). "Der Sekundärstoffwechsel in Planze und Tier," VEB G. Fischer, Jena.
- MACIAS, F. A. (1994). Potential allelopathic lupane triterpenes from bioactive fractions of Melilotus messanensis. Phytochemistry 36, 6, 1369-1379.
- MANGLITZ, G. R. (1976). Interactions between insects and chemical components of Sweetclover. J. environ. Qual. 5, 4, 347-352.
- MANN, J. D. (1978). Production of solasodine for the pharmaceutical industry. Adv. Agron. 30, 207-245.
- MARGNA, U. (1977). Review: Control at the level of substrate supply. An alternative in the regulation of the phenylpropanoid accumulation in plant cells. Phytochemistry 16, 419-426.
- MARSHALL, M. E. (1994). An updated review of the clinical development of coumarin (1-2 benzopyrone) and 7- hydroxycoumain. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 120, 39- 42.
- MATSUMOTO, Y. (1962). A dual effect of coumarin, olfactory attraction and feeding inhibition on the vegetable weevil adult, in relation to the uneatability of sweetclover leaves. Studies on the host plant determination of the leaf-feeding insects VI. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 6, 141-149.
- MAXON, S. R., and HURST, S. J. (1983). A comparison of methods distinguish seeds of yellow sweetclover (*Melilotus officinalis* Lam.) and white sweetclover (*M.alba* Medik.). Newsl. Assoc. off. Seed Anal. 57, 1, 46-53.
- McCLURE, W. (1977). The physiology of phenolic compounds in plants. In "Biochemistry of phenolic compounds in plants", . 525-556.
- MERREIN, A. (1983). Rôles des relations source-puits et de la compétition intraspécifique dans l'évolution de l'activité assimilatrice du tournesol au cours de son cycle de développement. Agronomie 3, 10, 1045-1051.
- MILLSPAUGH, C. F. (1974). *Melilotus* Sweet clover. In "Americain medicinal plant", . 49-52.
- MIYASE, T., OHTSUBO, A., UENO, A., NORO, T., KUROYANAGI, M., and FUKUSHIMA, S. (1982). Studies on the pterocarpanes from *Melilotus alba* Desr. Chem. Pharm. Bull. 30, 1986-1991.
- MOHR, H. (1969). "Photomorphogenesis," Wilkins M.B., Mcgraw-Hill, Londres.

- MOORBY, J. (1974). Investigations of carbon transport in plant. 2- The effect of light and darkness and sink activity on translocation. J. Exp. Bot. 25, 88, 937-944.
- MORITZ, O., and FROHNE, D. (1967). "Einführung in die pharmazeutische Biologie," Stuttgart.
- MORTIER, F. (1990). Préparation des extraits destinés à l'évaluation pharmacologique. In "Actes du 1er Colloque Européen d'Ethnopharmacologie", . 199-204.
- MOTHES, K., and KALA, H. (1955). Die Wursel als Bildungsstätte für Cumarine. Naturwissenschaften 42, 159.
- MOTHES (1980). "Historical Introduction," Springer/Ed. Bell, E.A. and Charlwood, B.V., Berlin.
- MOULIA, B. (1988). Contribution à l'étude de la photomorphogénèse du trèfle (*Trifolium repens* L.) en conditions contrôlées, D.E.A.
- MOURSI, M. A., and AHMED, S. S. (1973). Pharmazie 28, 58-64.
- MURAV'eva, V. I., KONDRATENKO, P. T., and BRINK, N. P. (1970). Chem. Abstr. 72, 714.
- MURRAY, R. D. H. (1982). The natural coumarins. Occurence, chemistry and biochemistry. (J. W. S. Ltd, ed.).
- NASH, D. P., DAVIS, E. A., HOM, R. K., and KARUSKTIS, K. K. (1991). Structure activity relationships of the substituted coumarins as photosynthetic electron transport inhibitors. In "Thirty-fifth annual meeting of the biophysical society", . 24-28, San Francisco.
- NEUMANN, G. (1991). L phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase in seedlings of *Oenothera* plasmotype dependent regulation and tissue specific distribution. J. Plant Physiol. 138, 3, 263-269.
- NEUMANN, G., and SCHWEMMLE, B. (1993). Flavonoids from *Oenothera* seedlings identification and extranuclear control of their biosynthesis. J. Plant Physiol. 142 2, 135-143.
- NGUYEN, C. (1992). Contribution à l'étude de la production de psoralène (Furocoumarine) par la culture in vitro de plantes du genre *Psoralea* (Leguminosae), Thèse NANCY.
- NISHIKAWA, M., YAMASHITA, A., ANDO, K., and MITSUHIRO, S. (1981). The suppressive effect of *Melilotus* extract on the thermal edema of rats. Folia Pharmacol. Jpn. 81 3, 193-209.
- NOSOV, A. M. (1994). Functions of plant secondary metabolites in vivo and in vitro. Russ. J. Plant Physiol. 41, 6, 767 -771.
- OBA, K., CONN, E. E., CANUT, H., and BOUDET, A. M. (1981). Subcellular localization of 2-( $\beta$ -D-glucosyloxy)-cinnamic acids and related  $\beta$ - glucosidase in leaves of *Melilotus alba* Desr. Plant Physiol. 68, 1359-1363.
- OURISSON, G. (1985). Ordre ou désordre. Champs du monde 3, 44-51.
- PAECH, K. (1950). "Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe," Springer-Verlag, Berlin.
- PARIS, R., and MOYSE, H. (1967). Mélilots. In "Précis de matière médicale" (Masson, ed.), 391-392, Paris.
- PAVLOV, P., and ILIEVA, S. (1972). Certain biochemical alterations in the initial developmental phases of clary sage (*Salvia sclarea* L.) Plants grown under different illuminations. Rasteniev Nauki 10, 13-19.
- PAYNE, J. (1987). Production of hyoscyamine by hairy root cultures of *Datura stramonium*. Planta Med. 53, 474-478.
- PETROVA, M. V. (1983). Anatomical structure of the vegetative organs in sweet clover species. Tekh. Byull. Vses. Ordena 131, 47-56.
- PILLER, N. B. (1977). An integration of the modes of action of coumarin An explanation of its effectiveness as a thermally injured tissue. Arzneim. Forsch. 27, 6, 1135-1138.
- PLOUVIER, V. (1963). Sur la recherche des hétérosides flavoniques dans quelques groupes botaniques. C. R. Séances Acad. Sci. 257, 25, 4061-4063.
- PODBIELKOWSKA, M., PIWOCKA, M., WASZKOWSKA, E., WALEZA, M., and ZOBEL, A. M. (1995). Effect of coumarin and its derivatives on mitosis and ultrastructure of mersitematic cells. Int. J. Pharmacol. 33, 7-15.
- PONELEIT, C. G., and EGLI, D. B. (1979). Kernel growth rate and duration in maize as affected by plant density and genotype. Crop Sci. 19, 385-388.
- POULTON, J. E., MCCREE, D. E., and CONN, E. E. (1980). Intracellular localization of two enzymes involved in coumarin biosynthesis in *Melilotus alba*. Plant Physiology 65, 171- 175.

- RANJEVA, R. (1977). Autorégulation cellulaire du métabolisme des phénylpropanoïdes. *Physiol. Veg.* 15, 2, 303-312.
- RATABOUL, P., and ALIBERT, G. (1983). Étude des mécanismes impliqués dans le transfert intravacuolaire de l'acide o-coumarique chez *Melilotus alba* (Desr.). *Bull. liais. gr. Polyphénols* 11, 166-173.
- REPPPEL, L., and WAGENBRETH, D. (1958). Untersuchungen über den Gehalt an Cumarinen und diesen verwandten Säuren in Propfungen zwischen *Melilotus albus* Med. und *Trigonella foecum-graecum* L. *Flora* 146, 212-227.
- RHODES, M. J. C. (1994). Physiological roles for secondary metabolites in plants : some progress, many outstanding problems. *Plant Mol. Biol.* 24, 1-20.
- RICHTER, G. (1993). Composés phénoliques. In "Métabolisme chez les végétaux Physiologie et biochimie" (P. p. u. Romandes, ed.), . 317-339, Lausanne, SUISSE.
- ROBERTS, H. A., and BODDRELL, J. E. (1985). Seed survival end seasonal pattern of seedling emergence in some Leguminosae. *Ann. Appl. Biol.* 106, 125-132.
- ROBIN, C. (1987). Rôle de la position de la feuille dans l'assimilation et le transport du carbone chez le trèfle blanc (*Trifolium repens* L.). *Agronomie* 7, 8, 599- 605.
- ROBIN, C. (1992). Photoporphogenesis of white clover (*Trifolium repens* L.) : phytochrome mediated effects on <sup>14</sup>C-assimilate partitioning. *Eur. J. Agron.* 1, 4, 235-240.
- ROMBI, M. (1991). Le mélilot. In "100 plantes médicinales composition, mode d'action, intérêt pharmaceutique".
- ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A., and KIEWER, W. M. (1986). Effects of exogenous factors on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of anthocianins and total phenolics in grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 4, 275-280.
- RUDORF, W., and SCHWARZE, P. (1958). Beiträge zur Zuchtung eines coumarinfreien Steinklees und Untersuchungen über Coumarin und verwandte Verbindungen. *Z. Pflanzenzücht.* 39, 245- 274.
- RYBNIKAR, A., and MINAR, J. (1985). Following the effect of coumarin, esculin and esculetin on the growth and mineral nutrition of peas. *Biologia* 15, 7, 379-388.
- SALEH, M. (1973). Effects of light upon quantity and quality of *Matricaria chamomilla* oil. *Planta Med.* 4, 337-340.
- SANDAL, P. C., and JOHNSON, I. J. (1953). Mechanisms of self- and cross-incompatibility in sweetclover, *Melilotus officinalis* Lam. *Agron. J.* 45, 91-101.
- SANDERSON, M. A. (1986). Dicoumarol concentrations in sweetclover hay treated with preservatives and spoiled hay of high- and low-coumarin cultivars of sweetclover. *Anim. Feed Sci. Technol.* 14, 221-230.
- SANO, Y. (1977). The pollination systems of *Melilotus* species. *Oecol. Plant.* 12, 4, 383-394.
- SCHLOSSER - SZIGAT, G. (1962). *Naturwiss.* 44, 17-18.
- SCHNEPF, E. (1969). "Sekretion und Exkretion bei Pflanzen," Springer-Verlag, Berlin.
- SCHON, W. J. (1966). Über die stereospezifische  $\beta$ -glucosidase in bitterstoff-frein Mutaten bei *Melilotus alba*. *Angew. Bot.* 40,112, 38-54.
- SCHRODER, W., and BOHM, H. (1995). Once more : secondary metabolite concentrations in whole plants and in cell cultures derivated therefrom. *J. Plant Physiol.* 145, 126-130.
- SCHULZ, A. (1993). Sink strength : the importance of the distance between phloem and receiver cells. *Plant Cell Environ.* 16, 1031-1032.
- SEVENET, T. (1994). "Plantes, molécules et médicaments," CNRS Editions Nathan/Ed. Nathan CNRS, Paris.
- SHILLING, W., CRAMPTON, R. F., and LONGLAND, R. C. (1969). Metabolism of coumarin in man. *Nature* 221,15, 664-665.
- SHIMAMOTO, K., and TAKAORIS, S. (1965). Pharmakologische Untersuchungen mit einem *Melilotus*-extrakt. *Arzneim. Forsch.* 15, 897-899.
- SHIMOMURA, J. S., TAKAORIS, S., and SHIMAMOTO, K. (1965). Effects of *Melilotus* extract on the increased capillary permeability and oedema caused by phlogistic agents in the rabbit and the rat. *Acta Med. Univ. Kioto* 39, 170-179.
- SIGRIST, J. L. (1984). "Les coumarines : aspect chimique, botanique et thérapeutique," Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, U.E.R. Louis Pasteur Strasbourg.
- SIMON, J. P., and GOODALL, D. W. (1968). Relationship in annual species of *Medicago*. *Austr. J. Bot.* 16, 89-100.
- SLATENSEK, J. M. (1947). Some causes for variation of coumarin content in sweetclover. *Agron. J.* 39, 596-605.

- SMIRNOV, A. M., and KUZOVKINA, I. N. (1974). The peculiarity of coumarin biogenesis in isolated roots of sweet clover (*Melilotus albus*). *Phytomorphology* 22, 278-281.
- SMITH, H. B. (1927). *Am. J. Bot.* 14, 129-146.
- SMITH, W. K. (1943). Propagation of chlorophyll-deficient sweetclover hybrids as grafts. *J. Hered.* 34, 135-140.
- SMITH, W. K. (1948). Transfer from *Melilotus dentata* to *M. alba* of genes for reduction in coumarin content. *Genetics* 33, 124-125.
- SMITH, W. K., and GORZ, H. J. (1965). Sweetclover improvement. *Adv. Agron.* 17, 163-231.
- SMITH, D. (1975). Sweetclover. In "Forage management in the north", . 125-132. Kendall, Dubuque, I.A.
- SMITH, H. (1982). Light quality, photoperception and plant strategy. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 481-518.
- SMITH, C. G. (1994). Tissue and subcellular immunolocalisation of enzymes of lignin synthesis in differentiating and wounded hypocotyl tissue of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Planta* 192, 2, 155-164.
- SPECHT, J. E., GORZ, H. J., and HASKINS, F. A. (1976). Genetic regulation of flavonoid content in seeds and seedlings of *Melilotus alba*. *Phytochemistry* 15, 133-134.
- STAFFORD, H. A. (1974). The metabolism of aromatic compounds. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 25, 459-486.
- STEVENSON, T. M., and CLAYTON, J. S. (1936). Investigations relative to the breeding of coumarin free Sweetclover (*Melilotus*). *Can. J. Res.* 14, 153-165.
- STEVENSON, G. A. (1969). An agronomic and taxonomic review of the genus *Melilotus* Mill. *Can. J. Plant Sci.* 49, 1, 1-20.
- STOCKER, J. R., and BELLIS, D. M. (1962). The biosynthesis of coumarin in *Melilotus alba*. *J. Biol. Chem.* 237, 2303-2305.
- SUVOROV, V. V. (1937). Cultivation of sweet clover and its prospects in USSR. *Herb. Abstr.* 12, 299.
- SVENSSON, S. B. (1971). The effect of coumarin on root growth and root histology. *Physiol. Plant.* 24, 446-470.
- TAITO, O. S. (1964). Naturally occurring coumarins and related physiological activities. *J. Pharm. Sci.* 53, 3, 231-264.
- TANIYA, L. I. (1986). Inhibitory effects of GA, 2,4-D and coumarin on root formation in leaf and stem cuttings of *Phaseolus vulgaris*. *Fiziol. Rast.* 33, 5, 951-957.
- TETENYI, P. (1991). Biological preconditions for cultivation and processing of medicinal plants. In "The medicinal plant industry", . 33-41. CRC Press Inc.
- TOMAS-BARBERAN, F. A. (1995). Capillary electrophoresis : a new technique in the analysis of plant secondary metabolites. *Phytochem. Anal.* 6, 177-192.
- TORCK, M., L., B.-B., and ROBELET, A. (1971). Recherches sur les flavonoïdes des Légumineuses II. Etudes pharmacologiques. *Ann. Pharm. Fr.* 29, 297-304.
- TOWERS, G. H. N., and WAT, C.-K. (1979). Phenylpropanoid metabolism (a review). *Planta Med.* 37, 2, 97-114.
- TURKINGTON, R. A., CAVERS, P. B., and REMPEL, E. (1977). The biology of Canadian weeds *Melilotus alba* Desr. and *M. officinalis* (L.) Lam. *Can. J. Plant Sci.* 58, 523-537.
- TUTIN, T. G. (1968). Leguminosae. In "Flora Europea", . 148-150. University Press, Cambridge.
- UFER, M. (1934). Methods and results in breeding sweetclover. *Jahrg.* 12, 255-258.
- UTRUP, L. J. (1993). Five nodulation mutants of white sweetclover (*Melilotus alba* Desr) . Infection thread development and nodule organogenesis. *Plant Physiol.* 103, 3, 925-932.
- VAN DE CASTEELE, K., VAN SUMERE, C. F., and GEIGER, H. (1983). Separation of phenolics (benzoic acids, cinnamic acids, phenylacetic acids, quinic acid esters, benzaldehydes and acetophenones, miscellaneous phenolics) and coumarins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chrom.* 258, 111-124.
- VANHAELEN, M. (1991). Climatic and geographical aspects of medicinal plant constituents. In "The medicinal plant industry" (C. P. Inc, ed.), . 59-75.
- VILLENEUVE, F., and ABRAVANEL, G. (1982). General scheme of the analysis of phenolic compounds in plant extracts by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 234, 131-140.
- VOGEL, A. (1820). *Gibb. Ann. Physik.* 64, 161.

- VONANGERER, E. (1994). Antitumor activity of coumarin in prostate and mammary cancer models. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 120, 14-16.
- WALTERS, D. G., LAKE, B. G., and COTTRELL, R. C. (1980). High-performance liquid chromatography of coumarin and its metabolites. *J. Chromatogr.* 196, 501-505.
- WEBSTER, G. T. (1955). Interspecific hybridization of *Melilotus alba* \* *M. officinalis* using embryo culture. *Agron. J.* 47, 3, 138-142.
- WEYGAND, F., and WENDT, H. (1959). Über die Biosynthese des Cumarins. *Zeitschrift für naturforschung C* 14, 421.
- WHITE, W. J., and HORNER, W. H. (1940). Investigation concerning the coumarin content of sweet clover II. Sources of variation in tests for coumarin content. *Sci. Agron.* 21, 29-35.
- WHITEHEAD, I. M., and THRE FALL, D. R. (1992). Production of phytoalexins in plant tissue cultures. *J. Biochem.* 26, 63-81.
- WIERMANN, R. (1981). Secondary plant products and cell and tissue differentiation. In "The biochemistry of plants" (E. E. Conn, ed.), Vol. 7, . 85-116. Academic Press, Inc.
- WIERZCHOWSKA-RENKE, K., ZOBEL, A. M., and GLOWNIAK, K. (1995). Annual congress on medicinal plant research. In "Cultivation of plants", . 45.
- WIJESEKERA, R. O. B. (1991). Plant-derived medicines and their role in global health. In "The medicinal plant industry", 1-9. CRC Press Inc.
- WORNER, M., and SCHREIER, P. (1990). Volatile constituents of sweet clover (*Melilotus officinalis* L. Lam.). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 190, 425-428.
- YAMADA, H. (1983). Ecology and cultivation of Swertia plant. XII Study on planting density in cultivation of *S. japonica*. *Shoyakugaku Zasshi* 37, 115-121.
- ZAPROMETOV, M. N. (1988). Photoregulation of secondary metabolism in plants. *Sov. Plant Physiol.* 34, 561-571.
- ZENK, M. H. (1967). Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 80, 573-591.
- ZENK, M. H. (1991). Chasing the enzymes of secondary metabolism : plant cell cultures as pot of gold. *Phytochemistry* 30,12, 3861-3863.
- ZHELEZNOV, A. V., and DEJNEKO, E. V. (1983). Étude des variations de teneur en coumarine chez des populations de mélilot bisannuel. *S' kh. Biol.* 2, 39-40.
- ZRYD, J. P. (1992). Génétique de la régulation de la production des métabolites secondaires. In "La génétique des métabolites secondaires et la sélection des plantes médicinales et aromatiques" (Mediplant, ed.), Centre de recherches sur les plantes médicinales et aromatiques.
- ZUCKER, M. (1965). Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiol.* 40, 5, 779-784.